



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO ANTIFUNGICA, FARMACOGNÓSTICA E
TOXICOLÓGICA SAZONAL DE *Petiveria alliacea* L.
(PHYTOLACCACEAE)**

Fábio Rodrigues de Oliveira

BELÉM - PA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO ANTIFUNGICA, FARMACOGNÓSTICA E
TOXICOLÓGICA SAZONAL DE *Petiveria alliacea* L.
(PHYTOLACCACEAE)**

Autor: Fábio Rodrigues de Oliveira

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde de Andrade

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cristina Baetas Gonçalves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Oliveira, Fábio Rodrigues.

Avaliação antifúngica, farmacognóstica e toxicológica sazonal de *Petiveria alliacea* L. (PHYTOLACCACEAE)/ Fábio Rodrigues de Oliveira; orientadora, Marcieni Ataíde de Andrade. — 2012

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2012.

1. *Petiveria alliacea*. 2. Mucuracaá. 3. *Aspergillus*. 4. Plantas medicinais - Toxicidade. 5. Farmacognosia - Estudo. 5. Antifúngicos. I. Título.

CDD: 22. ed. : 615.321

Folha de Aprovação

Fábio Rodrigues de Oliveira

Avaliação antifúngica, farmacognóstica e toxicológica sazonal de *Petiveria alliacea* L. (PHYTOLACCACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Prof^a. Dr^a. Marcieni Ataíde de Andrade (PPGCF / UFPA)
Orientadora

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luis Fernandes Vieira (ICS / UFPA)

Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro (PPGCF / UFPA)

Aprovado em: 20 de Dezembro de 2012.

Dedico este trabalho à Deus, à meus pais Paulo e Marlete Oliveira, que sempre me incentivaram e me ensinaram o verdadeiro significado da integridade e às minhas orientadoras, Marcieni Andrade e Ana Cristina Baetas, pelos ensinamentos, dedicação e amizade

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por toda força, saúde, por sempre ter me ajudado abrindo muitas portas ao longo de minha vida e por ter colocado em meu caminho todas as pessoas destes agradecimentos.

À minha querida Mãe, Marlete Oliveira, por toda ajuda, apoio, confiança, companheirismo e AMOR dedicados a mim, e por ser um exemplo de profissional farmacêutico o qual terei prazer em seguir ao longo de minha carreira.

Ao meu Pai, Paulo Oliveira, meus avós, Arlete Almeida, Raimundo Oliveira (*in memorian*) e Rosalina de Oliveira e meu irmão Ruan Oliveira, que também foram de importância sem igual nesta caminhada, por terem me amparado sempre que precisei e por não me deixar esquecer em nenhum minuto que a FAMÍLIA é nosso melhor refúgio.

À minha querida orientadora, Prof^ª. Dr^a Marcieni Andrade que com sua serenidade, simpatia e amizade me ajudou nesta caminhada, sempre me ensinando, apoiando, respeitando minhas decisões e lutando junto comigo ao longo do percurso.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^a Ana Cristina Baetas, que foi um anjo enviado por Deus a minha vida, que me deu todo o apoio no início da minha vida acadêmica, me fazendo enxergar minhas verdadeiras aptidões, sendo amiga e companheira nas horas mais difíceis.

Ao professor Dr. Flávio de Vasconcelos pelos ensinamentos e pela grande parceria nos experimentos de toxicidade.

Ao laboratório Central de extração da UFPA, na pessoa do Prof. Dr. Alberto Cardoso Arruda e Prof^ª Dr^a. Mara Silvia Pinheiro Arruda, que gentilmente nos cederam o espaço e toda estrutura necessária para a preparação dos extratos.

Ao laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da UFPA, na pessoa da Prof^ª. Dr^a Marta Monteiro que me acolheu e foi de grande importância para a finalização do trabalho.

Aos amigos dos laboratórios de Farmacognosia e Bromatologia da UFPA que atuaram ativamente no desenvolvimento deste projeto, João Paulo Bastos, Rodrigo

Castro. Amarilúcia Silva e Klaylton Lopes, pela valiosa colaboração que foi fundamental.

Ao grande amigo Gedeão Oliveira por todo apoio e amizade sincera, sempre estando disposto colaborar na melhoria deste trabalho, e também a Ademar Melo, Izabelle Camões, Antônio Taylon, amigos que estiveram sempre comigo, sorrindo, chorando e me ajudando ao longo do percurso.

A Karla Paiva, Luciana Kahwage, Carlos Aguiar, Paula Ledo e Sávio Monteiro, amigos fiéis com os quais eu pude e sei que sempre poderei contar por toda minha vida.

Aos professores que contribuíram para minha formação, compartilhando conhecimentos e experiências, que certamente serão muito bem aproveitados ao longo dessa nova fase de minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pela bolsa concedida e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto

Fábio Rodrigues de Oliveira

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar e
A certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Do medo uma escola,
Do sonho uma ponte
Da procura um encontro”
(Fernando Pessoa)*

RESUMO

AVALIAÇÃO ANTIFUNGICA, FARMACOGNÓSTICA E TOXICOLÓGICA SAZONAL DE *Petiveria alliacea* L. (PHYTOLACCACEAE)

O estudo das plantas medicinais desperta grande interesse científico, principalmente devido às mesmas serem consideradas fontes potenciais de moléculas bioativas com estrutura diferenciada e mecanismo de ação inovador. A importância de pesquisas voltadas para a descoberta e produção de novos fitoterápicos deve-se a grande contribuição que estes vêm apresentando diante de diversas patologias. A espécie *Petiveria alliacea* é uma planta medicinal utilizada amplamente pela população da região amazônica e destaca-se por apresentar diversas alegações de uso e ainda algumas classes de metabólitos com comprovadas ações terapêuticas. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os parâmetros farmacognósticos sazonais da espécie, o potencial antifúngico dos extratos produzidos em diferentes períodos de coleta sobre espécies de *Aspergillus* e a toxicidade dos mesmos *in vitro* e *in vivo*. Na avaliação farmacognóstica sazonal de *P. alliacea*, utilizando métodos descritos na Farmacopéia Brasileira, os resultados demonstraram parâmetros reprodutíveis para o controle de qualidade da droga vegetal, não havendo diferença na presença dos constituintes químicos do pó e do extrato hidroalcoólico, sendo observada a presença de saponinas, açúcares e alcaloides em toda a planta e nos extratos da raiz apenas sesquiterpenolactonas e depsídeos/depsidonas. Os resultados do método da microdiluição realizadas com extratos das raízes de dois períodos, evidenciaram fraca atividade antifúngica *in vitro*, porém não foi observado nenhum efeito dos extratos das partes aéreas. A atividade citotóxica, avaliada pelo método colorimétrico MTT, demonstrou que o extrato hidroalcoólico da raiz dos dois períodos não reduz a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas. Também não foram detectados sinais de toxicidade aguda do extrato na dose de 5000mg/kg em camundongos. Estes dados são considerados relevantes e o estudo em questão evidenciou que *P. alliacea* é uma espécie medicinal promissora, porém investigações mais detalhadas são necessárias para que sejam confirmadas suas várias alegações de uso e para que a planta seja utilizada no desenvolvimento de um novo agente fitoterápico.

Palavras-chave: *Petiveria alliacea*, Mucuracaá, *Aspergillus*, Estudo farmacognóstico, antifúngico, Avaliação de toxicidade.

ABSTRACT

A SEASONAL ANTIFUNGAL, PHARMACOGNOSTICAL AND TOXICOLOGICAL EVALUATION OF *Petiveria alliacea* L. (PHYTOLACCACEAE)

The study of medicinal plants raised great scientific interest, mainly due to them being considered as potential sources of bioactive molecules with differentiated structure and new mechanism of action. The importance of research focused on the discovery and production of new herbal medicines should be the great contribution they have presented before diverse pathologies. The species *Petiveria alliacea* is a medicinal plant widely used by the population of the Amazon region and stands out for presenting various claims and still use some classes of metabolites with proven therapeutic actions. This study aimed to evaluate seasonal pharmacognostical parameters, antifungal potential of the extracts produced at different sampling times on *Aspergillus* species and toxicity of these *in vitro* and *in vivo*. In the evaluation of seasonal Pharmacognostical, *P. alliacea*, using Brazilian Pharmacopeia methods the results demonstrated reproducible parameters for quality control of the plant drug, there was no difference in the presence of the chemical constituents of hydroalcoholic and dust, revealing the presence of saponins, alkaloids and sugars across the plant and root extracts and only sesquiterpenolactones depsides. The results of microdilution method performed with extracts from the roots of two periods, showed weak antifungal activity *in vitro*, but did not observe any effect of extracts of the aerial parts. The cytotoxicity was evaluated by MTT colorimetric method, showed that the hydroalcoholic extract of the root of the two periods did not reduce cell viability in any of the concentrations tested, and was any signs of acute toxicity of the extract at a dose of 5000 mg/kg in mice. These data are considered relevant and the current study showed that *P. alliacea* is a promising medicinal species, but further investigations are required for its various allegations are confirmed and usage for the plant to be used in developing a new phytotherapeutic agent.

Keywords: *Petiveria alliacea*, Mucuracaá, Pharmacognostical assay, *Aspergillus*, antifungal, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Fiálides de <i>Aspergillus sp.</i>	23
Figura 02	Estruturas de <i>A.fumigatus</i> visualizadas através de microscopia de luz	25
Figura 03	Colônia de <i>A. fumigatus</i>	25
Figura 04	Aspectos macroscópicos da espécie <i>A. flavus</i>	28
Figura 05	Imagem ilustrativa da espécie <i>P. alliacea</i> L	40
Figura 06	Estruturas das substâncias isoladas de <i>P. alliacea</i>	43
Figura 07	Estrutura química do S-óxido de tiobenzaldeído	47
Figura 08	Estrutura química do S-benzil-fenilmetanotiosulfonato	48
Figura 09	Esquema de distribuição das concentrações na placa de microdiluição ..	56
Figura 10	Resultado da técnica de pour plate para extrato de partes aéreas de <i>P. alliacea</i> L de ambos os períodos contra <i>A. fumigatus</i>	68
Figura 11	Resultado dos testes com extrato das raízes de <i>P. alliacea</i> de ambos os períodos contra <i>A. fumigatus</i>	68
Figura 12	Resultado dos testes com extrato das raízes de <i>P. alliacea</i> de ambos os períodos contra <i>A. flavus</i>	69
Figura 13	Resultado dos testes com extrato das raízes de <i>P. alliacea</i> de ambos os períodos contra <i>A. niger</i>	70
Figura 14	Viabilidade celular de macrófagos após incubação com o extrato RPC nas concentrações de 100 – 1,56 mg/mL	73
Figura 15	Viabilidade celular de macrófagos após incubação com o extrato RPS nas concentrações de 100 – 1,56 mg/mL	74
Figura 16	Variação ponderal dos animais avaliada durante 14 dias dos grupos tratados com extratos de <i>P. alliacea</i> na dose de 5000 mg/kg	75
Figura 17	Consumo de alimento avaliado durante 14 dias dos grupos tratados com extratos de <i>P. alliacea</i> na dose de 5000 mg/kg	75
Figura 18	Consumo de água avaliado durante 14 dias dos grupos tratados com extratos de <i>P. alliacea</i> na dose de 5000 mg/kg.....	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01	Constituintes químicos isolados de <i>Petiveria alliacea</i>	42
Quadro 02	Atividade antimicrobiana de extratos de <i>P.alliacea</i>	46
Quadro 03	Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de <i>P. alliacea</i> de dois períodos de coleta	67
Quadro 04	Valores de CIM e CFM para os extratos hidroalcoólicos 70% das raízes de <i>P. alliacea</i> contra <i>Aspergillus sp.</i>	70
Quadro 05	Resultado da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de <i>P. alliacea</i> L.	72
Quadro 06	Resultado da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das raízes de <i>P. alliacea</i> L.	72
Tabela 01	Resultado dos testes farmacognósticos obtidos através das partes aéreas de <i>P. alliacea</i> L. em dois períodos de coleta	71
Tabela 02	Resultado dos testes farmacognósticos obtidos através das raízes de <i>P. alliacea</i> L. em dois períodos de coleta	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
AHPA	<i>American Products Herbal Association</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CFM	Concentração Fúngica Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D50	Diâmetro Médio
DL50	Dose Letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
g	Gramas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IEC	Instituto Evandro Chagas
IgE	Imunoglobulina E
mL	Mililitros
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Partes aéreas
PAPC	Partes Aéreas Período Chuvoso
PAPS	Partes Aéreas Período Seco
PC	<i>Período Chuvoso</i>
PS	Período Seco
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPC	Raízes Período Chuvoso
RPS	Raízes Período Seco
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
	2.1 Objetivo Geral	19
	2.2 Objetivo Específico	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
	3.1 Importância Clínica dos Fungos	21
	3.2 Plantas Medicinais	31
	3.3 Família Phytolaccaceae	36
	3.4 Gênero <i>Petiveria</i>	37
	3.5 <i>Petiveria alliacea</i> L.	38
	3.6 Toxicologia de Plantas Medicinais	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
	4.1 Coleta e Identificação do material vegetal	53
	4.2 Limpeza, secagem e trituração do material vegetal	53
	4.3 Preparo do extrato	53
	4.4 Avaliação antifúngica	54
	4.5 Avaliação farmacognóstica	57
	4.6 Prospeção fitoquímica do extrato	62
	4.7 Avaliação da toxicidade	62
	4.8 Análise estatística	65
5	RESULTADOS	66
6.	DISCUSSÃO	78
7.	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

A elevada prevalência de infecções fúngicas está diretamente relacionada a fatores como o aumento no número de pacientes imunossuprimidos, doenças crônicas a exemplo do câncer, transplantes de medula ou órgãos sólidos, uso de corticosteróides, os quais deixam os pacientes mais susceptíveis aos patógenos (VARGAS NETO, 2004).

Dentre os causadores destas infecções, *Aspergillus spp.* se apresentam como o gênero mais comum nas infecções fúngicas invasivas, porém apenas algumas espécies são patogênicas ao homem, a exemplo do *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, causando doenças como a aspergilose invasiva (ENOCH et al. 2006).

A aspergilose invasiva se manifesta como causa fatal comum dentre os pacientes, embora os agentes antifúngicos modernos se apresentem eficazes nos testes *in vitro*. Com isso, a mortalidade de imunodeficientes, pacientes com leucemia ou transplantados chega a 50% devido a fatores como: atraso no diagnóstico ou eficácia limitada das terapias antifúngicas *in vivo* (LIONAKIS, 2005).

Os fármacos disponíveis atualmente para a terapêutica contra fungos, de certa forma, estão se tornando cada vez mais ineficazes devido à resistência a estes agentes. Além de se tornar um desafio para os clínicos, devido à grande quantidade de reações adversas e toxicidade que estes fármacos desencadeiam no organismo (SARTORI, 2005).

Por este motivo, grupos de pesquisa e a indústria farmacêutica buscam novos agentes antimicrobianos com estruturas ativas ou com atividades complementares às drogas já existentes, sendo este tipo de pesquisa bastante incentivada pelo surgimento de doenças como a AIDS e o aparecimento de microrganismos multirresistentes (VARANDA, 2006).

Produtos de origem natural são responsáveis por cerca de 40% dos fármacos disponíveis na terapêutica e estudos que contribuam para obtenção de fármacos naturais, poderão servir como modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos e mais específicos contra bactérias, fungos ou vírus, podendo até reduzir a incidência de efeitos adversos ao hospedeiro (CALIXTO e YUNES, 2001).

Atualmente, produtos de origem natural têm sido bastante utilizados, porém esta prática pode ser prejudicial, pois muitas vezes seu verdadeiro potencial farmacológico e toxicológico é desconhecido (BEDNARCZUK et al. 2010).

O Brasil possui cerca de 56.000 espécies vegetais, a maior biodiversidade do planeta e de todas as espécies estudadas grande parte possui importância econômica, alimentar ou medicinal, porém muitas têm potencial tóxico (ANDRADE et al. 2001), as quais devem ser utilizadas de maneira cautelosa para que sejam minimizados tais riscos realizando estudos de caracterização biológica e pesquisa sobre os efeitos colaterais oriundos de produtos naturais têm sido intensificados (VARANDA, 2006).

Dentre os critérios para seleção de uma espécie vegetal para estudo, a abordagem etnofarmacológica destaca-se por possuir maior probabilidade de descoberta de substâncias ativas, pois permite conhecer o histórico de uso terapêutico tradicional de alguma espécie vegetal por um determinado grupo étnico (MACIEL et al. 2002).

Dentre às várias espécies com alegações de uso popular, destaca-se a *Petiveria alliacea* L., pertencente a família *Phytolaccaceae*, conhecida popularmente por tipi, mucuracaá, guiné, é utilizada na medicina tradicional como antirreumática, antiespasmódica, antifúngica e diurética (LORENZI, 2002). Porém, Nunes et al. (1983 *apud* XIMENES, 2008) descrevem quadros toxicológicos que podem estar relacionados ao uso contínuo desta espécie.

Para garantir a eficácia e segurança de medicamentos oriundos de produtos naturais, também é necessário que seja feito o controle de qualidade das matérias primas vegetais, e para isso os documentos oficiais (farmacopéias) estabelecem protocolos e técnicas para identificação, descrição, avaliação da pureza e quantificação de princípios ativos, pois, constituintes químicos das plantas variam consideravelmente, dependendo de fatores sazonais, genéticos, nutricionais, edáficos, como diferentes técnicas de cultivo, condições de colheita e manejo pós-colheita (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

Este trabalho visa investigar a atividade antifúngica de extratos de *P. alliacea* L. na busca por novos agentes ativos contra os agentes que causam as aspergiloses, tal como avaliar os parâmetros farmacognósticos e toxicológicos desta espécie e suas variações nos dois períodos sazonais da Amazônia.

2. OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar de forma sazonal a atividade antifúngica, os parâmetros farmacognósticos e a toxicidade da espécie *Petiveria alliacea* L.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a coleta das partes aéreas e raízes de *P. alliacea* nos dois períodos sazonais Amazônicos (seco e chuvoso).
- Preparar o extrato hidroalcoólico de ambas as partes de *P. alliacea* dos dois períodos pelo processo de maceração.
- Determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima dos extratos hidroalcoólico de *P. alliacea* L. contra *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*.
- Avaliar os parâmetros farmacognósticos das partes aéreas e raízes da espécie dos dois períodos de coleta, através de técnicas Farmacopeias e não-farmacopeicas.
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos *in vitro* pelo método de MTT.
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos em camundongos.

3. REVISÃO DE LITERATURA



3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância clínica dos fungos

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos amplamente distribuídos na natureza, podem ser encontrados nos mais variados habitat, como ar, água, terra, animais e alimentos. Suas espécies sofrem variações conforme a localidade, estação do ano, grau de umidade do ar, dentre outros fatores. Estes ao apresentarem um só núcleo são denominados leveduras e, se apresentarem vários, são fungos filamentosos e formam micélio (SIDRIM e MOREIRA, 1999; TRABULSI et al. 2000).

Os fungos, de maneira geral, são organismos presentes no meio ambiente, desta forma, ao entrarem em contato com o ser humano e animais podem causar doenças denominadas micoses que são divididas em infecções superficiais, subcutâneas e sistêmicas, as quais englobam doenças humanas comuns, que possuem distribuição mundial, tendo como fatores que aumentam sua susceptibilidade, o calor e umidade, até infecções mais graves e debilitantes (HAZEN, 1995; HAY, 2006).

Nas últimas décadas as infecções fúngicas assumiram maior importância, principalmente devido o aumento da população de risco, que inclui pessoas com sistema imune comprometido, transplantados, pacientes com doenças hematológicas, queimados, recém-nascidos com baixo peso, dentre outros (WARNOCK, 2007; MASCHMEYER e HAAS, 2008; SABLE et al. 2008).

Um exemplo de infecções fúngicas superficiais são as dermatofitoses, as quais possuem como agentes causadores os dermatófitos, que são fungos filamentosos, septados e hialinos pertencentes aos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, possuindo semelhanças taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e imunológicas (GUPTA et al. 2005).

Os dermatófitos são fungos restritos a pele, tal como cabelos e unhas, pois necessitam de queratina para seu crescimento e não são encontrados em mucosas. A transmissão entre humanos pode ocorrer a partir da veiculação destes agentes oriundos do solo ou de animais ou até mesmo indiretamente por meio de materiais contaminados, a exemplo de artigos de tapeçaria, escovas de cabelo, chapéus, dentre outros. Porém, os organismos antropofílicos são responsáveis pela maioria

das infecções de pele e sua transmissão ocorre através de contato direto, exposição as células esfoliadas ou por meio de cortes na pele de imunodeficientes (HAINER, 2003).

As micoses subcutâneas, representadas por doenças como o micetoma, esporotricose, cromoblastomicose, também conhecidas como micoses de inserção, pois os microrganismos responsáveis são oriundos do ambiente externo e acometem o tecido subcutâneo e a derme após uma lesão do tecido (HAY, 2006).

Nas últimas décadas, micoses invasivas e oportunistas se tornaram um importante problema de saúde pública e a incidência deste tipo de doença tem crescido bastante, em grande parte devido ao aumento da população de risco, a exemplo dos portadores de HIV (CLARK e HAJJEH, 2002).

Dentre as causas mais conhecidas de micoses oportunistas, estão infecções por espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. A estimativa anual de infecções por estes patógenos é de 72 – 228 infecções por milhão de habitantes para espécies de *Candida*, 30–66 por milhão de habitantes para *C. neoformans* e 12–34 por milhão de habitantes para as espécies de *Aspergillus* (PFALLER et al. 2006).

3.1.1 *Aspergillus* Sp.

O gênero *Aspergillus* contém mais de 200 espécies e foi primeiramente descrito pelo micologista P.A. Micheli e pelo Padre Florentino em 1729 (AMAIKE e KELLER, 2011). Possuem vasta distribuição na natureza, sendo a via aérea a fonte de contágio mais comum, e que emergiu como causa de infecção grave com risco de vida em pacientes com sistema imune comprometido, representados por portadores de HIV em estágio avançado, neutropênicos e imunodeficientes primários, assim como pacientes que sofreram transplante de pulmão e de medula óssea (SALES, 2009).

Espécies de *Aspergillus* são comuns em todo o mundo e seus conídios estão presentes no ar, solo e em materiais em decomposição, podendo sobreviver a extremas condições climáticas e de equilíbrio ácido-base (KRADIN e MARK, 2008). Desta maneira, esses conídios estão constantemente sendo inalados e o resultado da infecção depende de fatores mais relacionados ao hospedeiro do que fatores de virulência ou patogenicidade de cada espécie (PFALLER et al. 2006).

O *Aspergillus* são claramente visualizados em cortes histológicos corados por histoquímica, apresentando uma coloração cinza-preto. As hifas medem entre de 2,5-4,5 de diâmetro e exibem septações freqüentes, que quando ausentes, podem ser confundidos com *Zygomycetes* spp. As hifas são dicotômicas, com ângulos de 45°, e os corpos de frutificação são compostos de uma vesícula e camadas de fiálides (Figura 01) que produzem os conídios, que se desenvolvem a partir do micelio em áreas de elevada tensão de oxigênio (KRADIN e MARK, 2008).

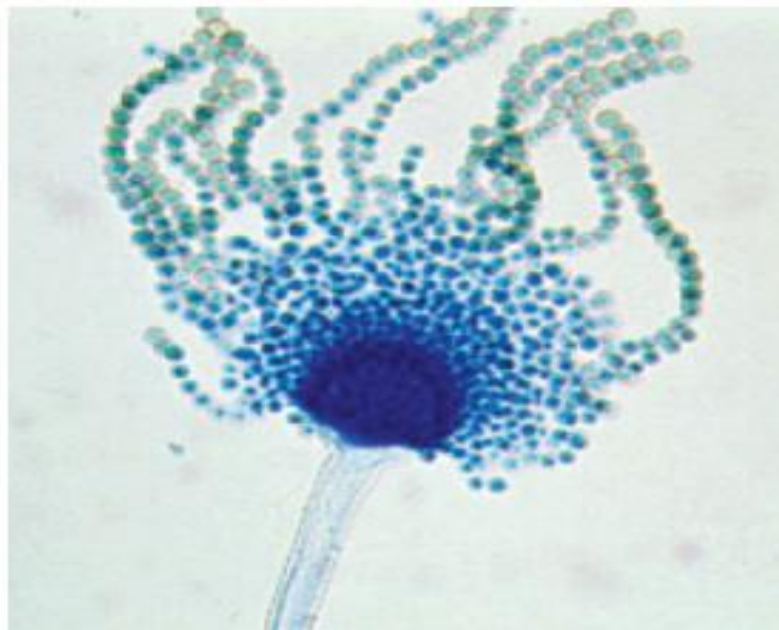


Figura 01 - Fiálides de *Aspergillus* sp.
Fonte: Hedayati et al. 2007.

A reprodução geralmente ocorre por mitose, originando esporos assexuais, pigmentados chamados conídios que são essenciais para a difusão generalizada dessas espécies (ADAMS et al. 1998).

Os conídios formados são pequenos, medem entre 2 e 10 μm de diâmetro, de caráter hidrofóbico, e após inalação pelo hospedeiro, germinam de maneira rápida, formando hifas que são potencialmente angioinvasivas, devido a presença de proteases que mediam a destruição tecidual, diminuem a resposta imunológica e podem desencadear manifestações alérgicas (BARNES e MARR, 2006). Macrófagos alveolares são as primeiras linhas de defesa contra os conídios aspirados, no entanto, no estágio de hifas, a defesa é mediada principalmente por neutrófilos (SEGAL e WALSH, 2006).

O *Aspergillus* é encontrado na vegetação em decomposição e podem ser identificados de acordo com suas características morfológicas básicas, a exemplo da

cor, formato da cabeça conidial e do conidióforo, formato das vesículas, número de fiálides e formato das “células de pé” (LOYOLA, 2006). Existem aproximadamente 300 de *Aspergillus* e apenas oito destas são responsáveis por infecções, causando uma variedade de anormalidades pulmonares que variam, de acordo com a extensão da proliferação, em comensais das vias aéreas à invasão do pulmão e seus vasos sanguíneos, podendo levar à sepse e morte (KRADIN e MARK, 2008).

Esse fungo apresenta uma grande variedade de fatores de virulência, como a endotoxina, fatores tipo heparina e ácido oxálico. As respostas histológicas desencadeadas pelo hospedeiro ao entrarem em contato com as hifas refletem seu nível de imunocompetência. As infecções invasivas ocasionadas pelo fungo são caracterizadas por necrose tecidual acompanhada por exsudados neutrofílicos, sendo comum a presença de inflamação granulomatosa com formação de células gigantes, eosinófilos e macrófagos. Também podem acarretar granulomas não necrotizantes sarcóides nas paredes de bolas fúngicas não invasivas (KRADIN e MARK, 2008).

Dentre as espécies mais comuns destacam-se o *A. fumigatus*, embora haja aumento progressivo da ocorrência de casos por outras espécies, como *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*, sendo este último resistente à anfotericina B (PFALLER et al, 2006; SALES, 2009).

3.1.2 *Aspergillus fumigatus*

É uma espécie amplamente distribuída ao longo do planeta, possuindo papel essencial na reciclagem do carbono e nitrogênio, com ciclo biológico simples e caracterizado pela grande produção de conídios (cerca de 1-100 por mm³) como pode ser observado na Figura 02 (p. 25) os quais são constantemente inalados e eliminados pelo sistema imunológico sadio (LATGÉ, 2001).

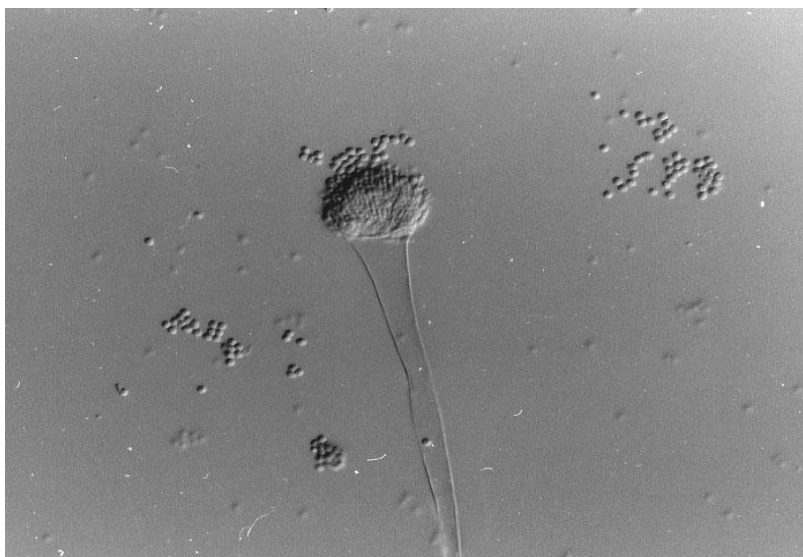


Figura 02 - Estruturas de *A. fumigatus* visualizadas através de microscopia de luz.
Fonte: Latgé (1999)

Esta espécie apresenta colônias verde-acinzentado (Figura 03), geralmente granular na temperatura de 37°C, sendo consideradas diferentes das demais espécies de *Aspergillus*, pois são termófilos pois desenvolvem-se em temperaturas de até 55°C (HAINES, 1995).

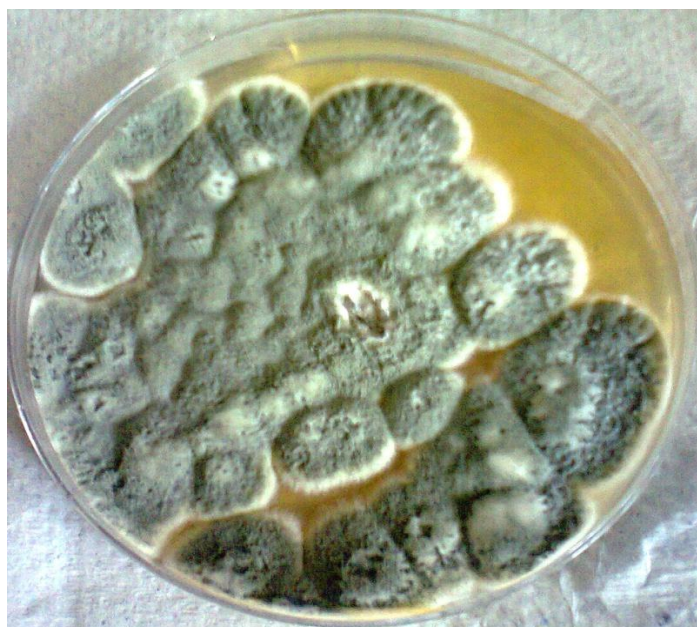


Figura 03 - Colônia de *A. fumigatus*
Fonte: Autor, 2012

Considerado um fungo saprófita e ubíquo, tendo como características principais a rápida germinação, capacidade de crescimento em temperaturas elevadas e adequação nutricional a variadas fontes de carbono e nitrogênio, Ihe

conferem capacidade de ser um patógeno em potencial para o homem. As principais patologias incluem reações alérgicas, infecções locais ou sistêmicas como a aspergilose pulmonar invasiva que surgiu nos últimos anos como uma das principais causas de mortalidade relacionada à infecção entre pacientes imunocomprometidos (WILSON et al. 2002; RHODES, 2006).

Um estudo conduzido por Nishiyama et al. (2005), analisaram os efeitos da micalfungina sobre a morfologia do crescimento de *A. fumigatus* por microscopia eletrônica, no qual observou a inibição e crescimento irregular nas doses de 0,001 – 0,1 µg/mL caracterizando uma potente atividade deste fármaco contra esta espécie.

A parede celular de *A. fumigatus* é composta principalmente polissacarídeos como glucanos, quitina e galactomanana (BERNARD e LATGE, 2001). Um desses, o galactosaminoglicano foi caracterizado através de espectrometria de massas e ressonância magnética nos estudos de Fontaine et al. (2011), constatando a presença de um epitopo responsável por induzir apoptose em neutrófilos e propiciar o crescimento fúngico em modelos experimentais imunocompetentes.

3.1.3 *Aspergillus niger*

É um fungo filamentoso comumente denominado de “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995) com colônias que apresentam coloração branca e amarelo pálido e formam milhares de conídios medindo entre 3 a 5 µm (PRADO, 2002), tornando-se rugosos ao atingir a maturação apresentando hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (UCSF, 2000).

É uma espécie importante para várias áreas de pesquisa, inclusive no estudo da secreção de proteínas utilizadas em processos fermentativos com algumas vantagens em relação a outros fungos, como a facilidade na manipulação, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas e o elevado rendimento de bioprodutos como ácidos cítricos, glucônico e gálico, beta-galactosidase, lipases, pectinases, endoglucanase, invertase, protease e enzimas amilolíticas (amilase e glucoamilase) que são muito importante economicamente. (SPIER, 2005, BAKER, 2006, RODRIGUES, 2006).

Existem poucos relatos de casos de aspergilose invasiva causada por *A. niger* devido as características fisiológicas e estruturais, diferenciadas em relação a

espécie mais frequente (*A. fumigatus*), como o tamanho dos conídios e a termotolerância (XAVIER et al. 2008), porém está mais ligada a doenças no trato respiratório superior e a patogênese relacionada a algumas das enzimas, como o ácido oxálico, que em casos de aspergiloma, produzem cristais de oxalato de cálcio causando dano ao tecido pulmonar de pacientes infectados (KURREIN et al. 1975; GHIO et al. 1992; KIMMERLING et al. 1992; NAKAGAWA et al. 1999; ROEHRL et al. 2007)

3.1.4 *Aspergillus flavus*

Esta espécie foi descrita em 1809 por Link sendo caracterizada por produzir conídios e corpos de frutificação por reprodução assexuada, ocorre como saprófita no solo, provocando doenças em culturas de milho, amendoim e algodão, mesmo após a colheita. Podem causar doenças em humanos, como aflatoxicose e câncer no fígado, ao consumir alimentos contaminados, ou aspergilose quando da inalação dos seus conídios, especialmente em paciente imunocomprometidos (AMAIKE e KELLER, 2011).

A. flavus é isolado em uma grande quantidade de zonas climáticas, sendo encontrado mais frequentemente entre as latitudes 16 e 35°, em zonas de clima quente, não sendo comuns acima de 45° de latitude (KLICH, 2007). O cultivo *in vitro* pode ser feito em Ágar Sabouraud, Dox Czapek e extrato de malte, na temperatura de 37°C e a germinação dos conídios se dá em 24 horas, sendo que o crescimento primário ocorre por extensão apical das hifas, relativamente mais lento do que o crescimento do *A. fumigatus* (KRISHNAN et al. 2009).

A precisa identificação de *A. flavus* é considerada difícil, devido a superposição de características morfológicas e bioquímicas, porém, em geral, as colônias mostram caráter aveludado, de coloração amarelo esverdeado ou marrom (Figura 04, p. 28) (HEDAYATI et al. 2007). Os conidióforos medem 800 µm de comprimento por 15-20 µm de largura em média, são ásperos, rugosos e espinhosos, podendo ser uni ou bisseriados, cobrindo a vesícula inteira e as fiálides apontam em todas as direções exibindo conídios globosos, variando entre 2-5 µm de diâmetro, organizados em cadeia radial sobre a extremidade distal das fiálides. Também possuem estruturas de frutificação assexuadas microscópicas denominadas esclerócios (KRISHNAN et al. 2009).

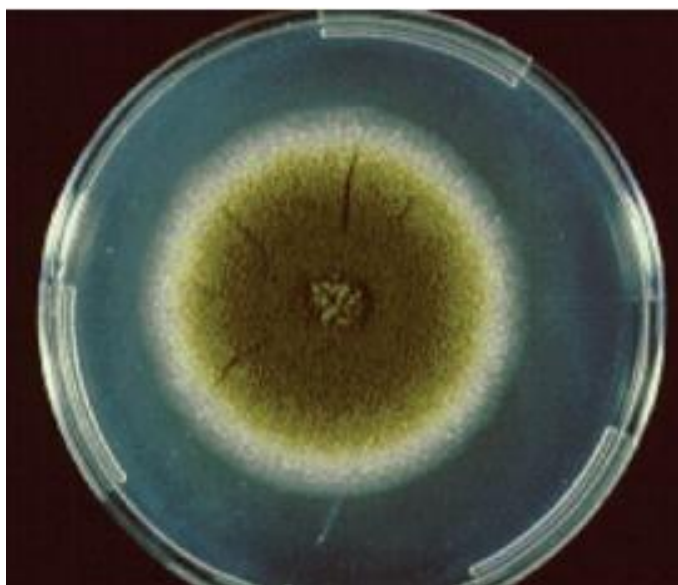


Figura 04 - Aspectos macroscópicos da espécie *A. flavus*.
Fonte: Hedayati et al. (2007)

É uma espécie morfologicamente complexa, sendo classificados em dois grupos de acordo com o tamanho dos esclerócios, os que apresentam maiores que 400 nm de diâmetro são da linhagem “L”, enquanto que os da linhagem “S” apresentam esclerócios menores que 400 nm e produzem aflatoxinas G1 e G2, e todas as linhagens produzem aflatoxinas do tipo B1 e B2 (AMAIKE e KELLER, 2011).

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*, a mais conhecida é a aflatoxina B1 devido apresentar danos significativos à saúde, além de serem potenciais agentes carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e imunossupressores (NOGUEIRA, 2009).

Depois do *A. fumigatus*, *A. flavus* é a principal causa de aspergilose invasiva ou não, seus conídios são de maior tamanho e sua inalação pode desencadear uma série de reações de hipersensibilidade (HEDAYATI et al. 2007).

3.1.5 ASPERGILOSE

Aspergiloses englobam um grande espectro de doenças causadas por fungos do gênero *Aspergillus* e a exposição a estes agentes presentes no ambiente pode causar reações alérgicas, de hipersensibilidade e invasão pulmonar disseminada em pacientes com sistema imunológico debilitado (PFALLER et al. 2006). Além de ser

uma das principais causas de contaminação em ambientes hospitalares, infectando os pacientes através da inalação, ventilação mecânica, condicionadores de ar ou inoculação direta com instrumentos cirúrgicos (HAIDUVEN, 2009).

Os conídios produzidos por *Aspergillus*, e inalados pelo hospedeiro são normalmente eliminados pelos cílios das vias aéreas ou pelos macrófagos alveolares, porém, quando estas defesas não são efetivas, pode ocorrer o desenvolvimento de doenças com taxa de mortalidade de cerca de 50 – 80%, a maior dentre as infecções fúngicas (BRAND, 2012).

Suas formas principais de apresentação são a aspergilose broncopulmonar alérgica, o aspergiloma e a aspergilose invasiva, estando relacionadas a uma série de achados clínicos e radiológicos os quais são associados ao estado imunológico do hospedeiro ou à presença de doença pulmonar estrutural (LEÃO et al. 2006).

Segundo Sales (2009), a Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) é uma forma de hipersensibilidade pulmonar diretamente associada à lesão das vias aéreas em resposta ao contato com *Aspergillus* sp. Caracteriza-se por episódios repetidos de obstrução brônquica, inflamação e impactação mucóide, podendo desencadear bronquiectasias, fibrose e consequente comprometimento respiratório irreversível, caso não seja diagnosticada rapidamente e tratada de maneira correta (KALIL et al. 2006).

ABPA se manifesta como uma elevada resposta de células CD4 do perfil Th2 nos pulmões e produção de anticorpos IgE específicos para *Aspergillus*, ocasionando obstrução broncopulmonar e respostas inflamatórias que acarreta asma dependente de corticosteróides, com manifestações mais raras como febre e hemoptise, destruição das vias aéreas, podendo evoluir a fibrose caso não seja tratada de maneira correta (BARNES, 2006).

A doença pode ser dividida em duas fases, sendo que uma delas é chamada de ABPA sorológica na qual não se observa bronquiectasia por tomografia de alta resolução, levando-se em consideração o critério sorológico e ABPA com bronquiectasia central (OLIVEIRA et al. 2007).

O tratamento para ABPA inclui o uso de corticosteróides orais durante a fase aguda, e para combater a infecção fúngica se utiliza itraconazol, porém outras drogas da classe dos “azóis” estão em estudo (BARNES, 2006).

Outra doença relacionada ao gênero *Aspergillus* é denominada Aspergiloma que segundo Latgé (1999) é também denominada de “bolas fúngicas”, localizada em

cavidades pulmonares pré-existentes causadas por tuberculose ou outras doenças que afetam os pulmões ou os seios paranasais obstruídos. Um dos sintomas é a hemoptise devido o rompimento de vasos da parede da cavidade ocupada ou na artéria brônquica próxima, podendo esta se fatal devido a hemorragia interna.

O aspergiloma se caracteriza por um aglomerado de hifas, muco e restos celulares, de tamanho variado, podendo ser móvel dependendo do grau de adjacência pleural e da parede da cavidade na qual está presente, sendo este o principal diagnóstico da doença, assim como a detecção de anticorpos específicos para *Aspergillus* sp. (HOPE et al. 2005).

A aspergilose invasiva é considerada a mais grave dentre as doenças causadas por *Aspergillus*, afetando principalmente pacientes neutropênicos, com contagem de neutrófilos abaixo de 500 células/mm³ (PEIXINHO et al. 2003; ZMEILI; SOUBANI, 2007), transplantados ou com doença hematológica. Além disso, o uso de drogas citotóxicas ou terapia com corticoides também pode estar relacionada ao aparecimento da doença (SOUBANI e CHANDRASEKAR, 2002; GREENE, 2005; ENOCH et al. 2006).

Os pacientes geralmente apresentam sintomas inespecíficos, como febre não responsiva a antibióticos, expectoração, dispneia, podendo também apresentar dor pleurítica e hemoptise (leve ou maciça), traqueobronquite com inflamação severa das vias aéreas, com ulcerações e formação de placas em transplantados ou pacientes com AIDS (ZMEILI e SOUBANI, 2007).

Este tipo de infecção pode se disseminar através do sangue, acometendo outros órgãos, a exemplo da pele, rins, coração, esôfago, fígado e cérebro de maneira mais frequente, levando a convulsões, danos cerebrais, hemorragia intracraniana, meningite e abscesso epidural (ZMEILI e SOUBANI, 2007).

O diagnóstico da Aspergilose invasiva, envolve o diagnóstico histopatológico da infecção e resultado positivo na cultura para *Aspergillus* sp., também se leva em consideração os fatores de risco do hospedeiro e as manifestações clínicas (SALES, 2009).

O tratamento de primeira linha é a anfotericina B em dose diária de 1 a 1,5 mg/kg, porém seus efeitos adversos incluem nefrotoxicidade, reações de hipersensibilidade e distúrbio eletrolítico (ZMEILI e SOUBANI, 2007). Seu mecanismo de ação se baseia na sua fixação aos esteróis das células eucariotas presente na parede celular, interagindo, assim, especificamente com o ergosterol,

constituente exclusivo das células fúngicas, levando à formação de poros na membrana lipídicas. Esta alteração de permeabilidade da membrana permite o escape de íons e metabólitos, ocasionando morte celular (SILVA, 2008).

Os efeitos colaterais da Anfotericina B ocorrem em 50 a 90% dos pacientes (CATALÁN e MONTEJO, 2006), devido a uma reduzida parcela que se liga ao colesterol presente nas células do hospedeiro causando alterações (MARTINEZ, 2006).

Inúmeros estudos apontam para menor suscetibilidade de alguns agentes antifúngicos às espécies de *Aspergillus*, remetente de diversos mecanismos dentre os quais podemos citar a existência de mutações, alterações nas enzimas das vias metabólicas ou a existência de transportadores que impedem a chegada do fármaco ao sítio alvo (SILVA, 2008).

O grande número de casos de infecções fúngicas, principalmente em pacientes tratados em unidades de terapia intensiva e imunossuprimidos, a pouca oferta de medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas de caráter invasivo e muitas vezes de pouca utilidade clínica, e o aparecimento cada vez mais frequente de cepas resistentes às drogas antifúngicas disponíveis torna necessário o desenvolvimento de novos agentes eficazes e seguros nesta terapêutica (ARAÚJO et al. 2004; NISHIYAMA et al. 2005; KAUFFMAN, 2006).

Desta forma, embora os agentes antifúngicos sejam predominantemente sintéticos, o estudo de plantas medicinais em busca de novos compostos bioativos tem aumentado significativamente (FENNER et al. 2006).

3.2 Plantas Medicinais

O uso terapêutico de plantas medicinais em saúde humana é uma prática antiga, e está na base da existência das sociedades “primitivas” e populações tradicionais, portanto a inclusão de informações deste conhecimento empírico é de suma importância para nortear estudos a cerca da eficácia (BARBOSA et al. 2009).

Os chamados sábios, na época, considerados mediadores entre homens e deuses, foram responsáveis pela cura dos doentes, juntando a magia e a religião

com o conhecimento empírico em práticas de saúde, como o uso de plantas medicinais (ALVIM et al. 2006).

Ainda hoje, as comunidades rurais continuam intimamente ligadas aos usos de plantas medicinais, por estas serem, por muitas vezes, o único recurso disponível para o tratamento de doenças (ROQUE et al. 2010), desta forma, as espécies vegetais utilizadas têm recebido atenção especial, devido aos diversos significados que assumem em nossa sociedade, como um recurso biológico e cultural, destacando-se seu potencial genético para o desenvolvimento de novas drogas, possível fonte de recursos financeiros, através da comercialização, para o resgate e fortalecimento da identidade cultural e como acesso primário à saúde para muitas comunidades (SILVA et al. 2006).

Esta prática pode ser denominada de medicina tradicional, pois antecede a medicina moderna, a qual a Organização Mundial de Saúde (OMS), define como a soma de todos os conhecimentos teóricos e práticos, explicáveis ou não, utilizados para diagnóstico, prevenção e tratamentos físico, mental ou social, baseados exclusivamente na experiência, observação, transmitidos verbalmente ou por escrito de geração a geração (WHO, 1991).

A medicina tradicional, que permanece até os dias de hoje, vem proporcionando uma contribuição ao desenvolvimento da ciência, a partir de conhecimentos e práticas de saúde de caráter empírico, influenciadas pelo contexto sociocultural e econômico, no qual se encontram inseridos (CAMARGO, 2007).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Desta forma, usuários de plantas medicinais mantêm a prática do consumo de medicamentos a base de plantas, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica que, juntas, enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL et al. 2002).

Nos últimos anos, aumentou consideravelmente a atenção dirigida pelas autoridades e órgãos regulamentadores de saúde para o uso de plantas medicinais, por diferentes razões e em diferentes setores. Incentivo em investimentos públicos

no estudo de plantas medicinais tem sido feito pela OMS desde 1978, observando-se crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica assim como o aumento de seu uso pela população (HOMAR, 2005).

Nos países em desenvolvimento, isto resultou principalmente da decisão de levar mais a sério a medicina tradicional e de explorar a possibilidade de utilizá-la nos cuidados primários de saúde. Em outros países, as autoridades de saúde foram obrigadas a adotar medidas impostas pelo interesse público no uso de plantas medicinais (GUIMARÃES et al. 2006; CARVALHO et al. 2008).

Na legislação brasileira, plantas medicinais são espécies, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2010), e estão cada vez mais inseridas na recuperação da saúde da população. A OMS recomendou a implantação da fitoterapia como estratégia não convencional em saúde pública de cada país, e que os países realizem levantamentos regionais sobre as plantas utilizadas na medicina popular tradicional, realize sua identificação botânica, estimulem e recomendem o uso daquelas que sejam seguras e eficazes, com desenvolvimento de programas que permitam cultivar e utilizar as plantas selecionadas (MING et al. 1998; MATOS, 1998; SCHULZ et al. 2002; SIMÕES et al. 2007).

No passado, a fitoterapia era mais adotada pelas populações carentes das áreas rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menor custo, porém, atualmente, o uso de plantas como fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (SHALE, 1999). Neste contexto, profissionais da área da saúde como farmacêuticos, enfermeiros, médicos, fisioterapeutas dentre outros, devem estar capacitados para orientar o paciente em relação ao uso racional de plantas medicinais (DI STASI et al. 1996).

O aumento do uso de medicamentos a base de plantas pela população mundial gera preocupação acerca da qualidade desses produtos, normalmente relacionadas à pureza, autenticidade e composição química das matérias-primas vegetais (ALVARENGA et al. 2009) utilizando-se técnicas farmacognósticas para avaliação e controle destes parâmetros (FONSECA et al. 2010)

Segundo Melo (2007), pesquisas apontam diversas irregularidades que comprometem a eficácia, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores o

que pode ser devido a indústrias fornecedoras serem de pequeno porte, funcionando muitas vezes de maneira precária, e a falta de fiscalização rígida sobre tais produtos e ainda cita que algumas das irregularidades mais frequentes são características organolépticas impróprias para a espécie, contaminação microbiológica, adulterações, informações inadequadas, elevado teor de impurezas, ausência ou baixa concentração dos constituintes ativos, elevado teor de umidade e a presença de resíduos de praguicidas nos produtos.

Desta maneira, é de suma importância que pesquisas envolvendo plantas utilizadas frequentemente pela população no intuito de realizar sua identificação correta e rigorosa e estabelecimento de parâmetros de qualidade para possível detecção de fraudes (PAULA et al. 2008), e para seu estudo, é requerida primeiramente a garantia da qualidade da matéria prima, tal como, dos extratos utilizados, e posterior análise de suas ações em testes para avaliação de suas atividades biológicas e aspectos toxicológicos *in vitro* e em animais. Portanto, o controle de qualidade de plantas medicinais se torna fundamental para garantir eficácia, segurança e qualidade, e estes testes tem por objetivo principal a verificação da identidade botânica do material, da pureza e a caracterização e doseamento dos constituintes químicos (PELASSARI, 2008).

As plantas produzem moléculas para o seu metabolismo primário, porém, estas possuem também mecanismos para produzir metabólitos secundários, os quais variam em qualidade e quantidade, entre espécies, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles possuem sua síntese desencadeada por eventuais situações a que as plantas estão expostas (FERREIRA e AQUILA, 2000).

De acordo com Von Poser e Mentz (2007), metabólitos secundários são substâncias estruturalmente complexas produzidas por rotas biossintéticas elaboradas, que possuem baixo peso molecular e significativa atividade biológica. São produzidos por determinadas espécies vegetais sob forma de defesa ou em situações de estresse. As principais classes são os taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, cumarinas, antocianinas, sesquiterpenolactonas, óleos voláteis, dentre outros.

A análise fitoquímica dos extratos vegetais é essencial para o reconhecimento destas substâncias quando estudos acerca dos mesmos são escassos. Esse processo envolve determinados cuidados para que os resultados sejam garantidos,

tais como: coleta e identificação do material vegetal, estabilização para desnaturar as enzimas celulares, secagem para retirada do excesso de água e impedir as reações de hidrólise e a proliferação de micro-organismos e a moagem para redução do material com aumento de superfície de contato com o líquido extrator (FALKENBERG et al. 2007).

Através de diferentes processos de extração é obtido o extrato bruto do material vegetal. Este é tido como ponto de partida para a detecção e o isolamento de substâncias bioativas. As técnicas tradicionais de extração fundamentam-se na seleção apropriada do solvente extrator, na agitação, no uso de calor, aumentando assim, a solubilidade dos componentes. Porém, tais técnicas necessitam de períodos longos de extração e, em alguns casos, do uso de aquecimento, o que pode degradar as substâncias naturais termolábeis presentes na composição, o que exige o desenvolvimento de técnicas alternativas para evitar tais perdas (BARBOSA, 2008).

Os avanços técnicos e o desenvolvimento de métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais proporcionaram maior agilidade na identificação de substâncias nos extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Produtos naturais são uma das principais fontes de agentes terapêuticos inovadores para diversas doenças, incluindo as infecciosas (COS et al. 2006), podendo citar sua ação como anticoagulantes, antineoplásicos, antiparasitários, imunossupressores, antibacterianos e antifúngicos, dentre outros (SILVA, 2008).

É importante o estudo de plantas que possuam propriedade antifúngica visto que se constituem de um recurso terapêutico alternativo e uma grande fonte de moléculas que podem possuir um potencial significativo, elucidados em testes de susceptibilidade *in vitro*, com o uso de extratos vegetais no combate a esses agentes (ALVES et al. 2006).

A demora no desenvolvimento de agentes antifúngicos sintéticos e o crescente aumento da resistência fúngica, têm levado a realização de vários estudos com produtos naturais contra tais organismos que causam infecções (SHINOBU-MESQUITA et al. 2011).

Uma revisão realizada por Fenner et al. (2006), através de levantamento etnobotânico, identificaram 409 espécies, destacando algumas espécies com

potencial antifúngico comprovado, com a presença de duas espécies da família *Phytolaccaceae*.

3.3 Família Phytolaccaceae

De acordo com Di Stasi (2002), a ordem Caryophyllales também é conhecida por Centrospermae e inclui grande número de espécimes medicinais com distribuição e ocorrência na região amazônica. Nesta ordem de espécies vegetais, estão incluídas quinze distintas famílias botânicas, das quais as mais importantes e com grande ocorrência no Brasil são Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Nyctaginaceae, Cactaceae, Portulacaceae e Phytolaccaceae.

Cronquist (1981) considerou a família com 18 gêneros e 125 espécies e incluiu o gênero *Microtea* em *Chenopodiaceae* e para Judd et al. (2002), *Phytolaccaceae* é constituída por quatro gêneros e 30 espécies, sendo o maior gênero *Phytolacca* com 23 espécies. Segundo estes autores, os táxons que apresentam quatro tépalas, de quatro até numerosos estames, um só carpelo (com um único óvulo basal) e frutos do tipo drupa, aquênio, ou sâmara, podem ser mais bem separados como *Petiveriaceae* (*Petiveria*, *Rivina* e *Trichostigma*). *Seguiera*, que tem fruto do tipo sâmara, não é mencionada. *Petiveriaceae* também difere de *Phytolaccaceae* em caracteres embriológicos e na morfologia dos grãos de pólen. Tratamento diferente de Judd et al. (2002) é encontrado na APG II (2003), na qual a família *Petiveriaceae* foi incluída em *Phytolaccaceae*.

A família *Phytolaccaceae* é pantropical e ocorre, principalmente, na América do Sul, sendo que no Brasil está representada por nove gêneros (BARROSO, 1978) e podem ser encontradas em matas ou clareiras em seu interior, em locais sombrios e sub-úmidos, campos cultivados, locais onde foi derrubada e queimada a mata e, esporadicamente, em matas de araucária (MARCHIORETTO, 1989).

Os representantes desta família são predominantemente arbustivos ou herbáceos, porém de forma menos frequente, espécies arbóreas, as quais apresentam madeira mole e encharcada, por exemplo, algumas espécies do gênero *Phytolacca* possuem folhas inteiras, sem estípulas e são dispostas de maneira alternada. Já suas flores são agrupadas em inflorescências, pequenas, normalmente hermafroditas, porém podem ser diclinas e apresentam simetria radial com exceção do gênero *Petiveria* onde as flores são simétricas (JOLY, 2002).

Segundo Judd et al. (2002), os representantes de Phytolaccaceae são tipicamente entomófilos (suas flores atraem abelhas, vespas, moscas e borboletas) e seus frutos são dispersos por pássaros.

Em relação aos grãos de pólen esta família possui caráter euripolínico, devido sua morfologia ser variável, como por exemplo, espécies arbóreas e/ou subarbustivas (*Phytolacca dioica*, *Phytolacca thyrsoiflora*, *Seguiera langsdorffii* e *Seguiera aculeata*) são tricolpadas, *P. alliacea*, embora subarbustiva, tem tipo morfológico estefanopontoperculado. Dentre as espécies subarbustivas/herbáceas, *Rivina humilis* é pantocolpada e *Microtea scabrida*, de hábito herbáceo, apresenta morfologia polínica do tipo pantoporado (NEVES et al. 2006).

3.4 Gênero *Petiveria*

Segundo Di Stasi (2002), o nome do gênero *Petiveria* foi dado em homenagem a Jacob Petiver, farmacêutico e amante da natureza. O gênero descrito por Carl Linnaeus compreende uma única espécie de origem na América tropical, amplamente utilizada com fins medicinais.

De acordo com Marchioretto (1989), o gênero *Petiveria* é descrito como:

“Ervas ou subarbustos, com aproximadamente 1 metro de comprimento; caules delgados, esverdeados, cheiro característico. Folhas alternas, membranáceas, elípticas, ovadas, abovadas ou lanceoladas, pecioladas, estípulas reduzidas, inflorescências racemosas, axilares, ou terminais eretas ou nutantes. Flores hermafroditas, actinomorfas, pequenas, subsésseis, esbranquiçadas, esverdeadas a rosadas; brácteas lanceoladas de ápice agudo; bractéolas reduzidíssimas; perianto herbáceo, 4-partido, glabro; tépalas livres, quase iguais, lineares-agudas no ápice, maiores no fruto; estames geralmente 4 alternitépalo, ou 6 a 8 irregularmente dispostos, filetes filiformes, desiguais, mais curtos que as tépalas; anteras dorsifixas, lineares, bastante incisadas no ápice, base levemente incisa; ovário súpero, oblongo-ovado, unilocular, unicarpelar densamente piloso, 4 a 6 cerdas subuladas e deflexas no vértice, estigma único, sésil. Fruto aquênio tubuloso, longamente cuneado, quilhado, base circundada pelo perianto, ápice largo, truncado e bilobado, 2 a 3 acúleos aciculados, aguçados, recurvos e rígidos de cada lado. Semente ereta linear, testa membranácea; embrião ereto, cotilédones desiguais e replicados.”

O gênero *Petiveria* possui uma diversificada ocorrência na América do Norte, América Central e América do Sul (ORMOND e PINHEIRO, 1974).

3.5 *Petiveria alliacea* L.

É uma espécie nativa da floresta amazônica e das áreas tropicais das Américas do Sul, Central, Caribe e África (CAMARGO, 2007) e segundo Barros (1983), teria sido levada para a África, por volta da segunda metade do século XIX, por negros libertos que retornavam ao continente.

Ocorre normalmente desde a Flórida, México, Antilhas até grande parte da América do Sul. Na Argentina, é abundante nas províncias do norte, litoral, Santa Fé e Buenos Aires e cultivos em Cuba, Índia, Europa e África (ALONSO, 1998). No Brasil é encontrada na região Amazônica, em todo o Nordeste, Mato Grosso, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (XIMENES, 2008).

Por possuir ampla distribuição geográfica, esta espécie possui inúmeras denominações populares nos diferentes países na qual é encontrada, como anamu, apazoto-de-zorro, hierba-de-gallinitas, tipi na Argentina, ipasina em Honduras, guineahenweed na Jamaica, mucura, micura, chanviro no Peru, ojùúsájú no Continente Africano (CAMARGO, 2007). No Brasil, *P. alliacea*, é conhecida como anamu, guiné, raiz-de-guiné, erva-de-guiné, pipi, tipi, erva-de-tipi, raiz-do-congo, amansa-senhor, raiz-de-gambá, raiz-de-conconha, erva-de-alho, gorarema, caá, paraacaca, iratacaca, gorana-timbó e mucuracaá (KUBEC e MUSAH, 2001; BEZERRA, 2006).

P. alliacea L. ainda hoje é conhecida como amansa-senhor por ter sido utilizada pelos negros, que conheciam seus efeitos tóxicos, com intuito de envenenar seus senhores (CAMARGO, 2007). Santos Filho (1947) em sua “História da medicina no Brasil (Do século XVI ao século XIX)” faz referência aos negros que, no século XVII, punham ou deitavam quebranto e a vítima morria, acrescentando que, na verdade, morria envenenada. Comenta que o nome amansa-senhor poderia ter sido, a princípio, o nome de um preparado à base de mais de uma espécie vegetal que era dado pelos escravos aos seus senhores, a fim de levá-los à imbecilidade. Corrêa (1931), também ao referir-se a esta planta diz ser considerada tóxica, por levar quem a consome à imbecilidade, afasia e até a morte.

3.5.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophita

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Caryophyllales

Família: Phytolaccaceae

Gênero: *Petiveria*

Espécie: *Petiveria alliacea* L.

3.5.2 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

Descrita por Di Stasi (1989) como subarbusto perene, sublenhoso, ereto, ramificado com ramos compridos, delicados e ascendentes, suas folhas apresentam-se curto-pecioladas, dispostas de maneira alternada, estipuladas e membranosas, agudas no ápice e estreitas na base. As flores sésseis, pequenas, reunidas em inflorescências axilares e terminais espiciformes, o androceu apresenta 4 estames, gineceu unicarpelar com ovário súpero, enquanto que seu fruto aquênio cilíndrico, achatado e crenado.

De acordo com Rocha et al. (2006), suas folhas (Figura 05, pag. 40) possuem de 5 a 10cm de comprimento por 2 a 6 cm de largura, são discolores, oblongo-lanceoladas, acuminadas, integérrimas, com base cuneiforme e pecíolos curtos e sua textura varia de membranácea a herbácea, possuindo nervura principal proeminente na face abaxial e nervuras secundárias arqueadas.

Em vista frontal a epiderme do caule caracteriza-se pela presença de células irregulares, complexos estomáticos paracíticos e tricomas pluricelulares não glandulares. Fitólitos que apresentam dimensões, de aproximadamente, 22 mm de largura e 258 mm de comprimento se fazem presentes no tecido epidérmico (ROCHA et al. 2006).



Figura 05 - Imagem ilustrativa da espécie *P. alliacea* L.
Fonte: Duarte e Lopes (2005).

Raiz fusiforme, ramificada de forma irregular e com comprimento variável, possui a superfície externa com coloração parda acinzentada clara e parda amarelada, finamente estriada, no sentido longitudinal, apresentando cicatrizes verrucosas (GOMES, 2006).

Seus grãos de pólen foram descritos por Cruz-Barros et al. (2006), sendo caracterizados como médios, apolares, hexagonais; 12-pantocolpados, colpos com contorno irregular, distribuídos uniformemente pela superfície do grão de pólen, formando grupos de 3 colpos; exina esparsamente espiculada, sexina mais espessa que a nexina.

Habitam locais úmidos, sombrios, sua floração predominante se dá entre novembro e março e sua frutificação, entre abril e maio, é encontrada em todos os Estados do Brasil (MARCHIORETTO, 1989).

Suas sinonímias botânicas *Petiveria alliacea* var. *tetrandra*, *Petiveria corrientina*, *Petiveria foetida* Salisb, *Petiveria hexaglochin* Fisch, *Petiveria hexandria* Sesse, *Petiveria ochroleuca* Moq., *Petiveria octandra* L., *Petiveria paraguayensis* D., *Petiveria tetrandra* B.A. (TROPICOS, 2012).

3.5.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS

Uma grande quantidade de constituintes químicos já foi isolada das folhas e raízes de *P. alliacea* os quais conferem inúmeras atividades biológicas a espécie (LOWE et al. 2001) e o uso de preparações a base desta espécie na medicina tradicional das Américas do Sul e Central para o tratamento de inúmeras doenças é bastante comum (GOMES, 2006).

Estudos da composição química de *P. alliacea* revelam a presença de dibenzil trissulfeto (JOHNSON et al. 1997), flavonoides, triterpenos (DELLE MONACHE et al. 1996), trans-N-metil-4-metoxiprolina (DE SOUSA et al. 1990); Peckolt (1900) constatou a presença da Petiverina, um óleo essencial de coloração amarelada, pulverulenta e inodora, solúvel em água acidulada, éter e álcool.

Segundo Gomes (2006) a análise química de raízes e folhas também demonstram a presença de cumarinas, estilbenos (cis e trans-estilbenos), benzaldeído, ácido benzóico, álcool benzílico, benzoato de benzila, nitrato de potássio, β -sitosterol, ácido surônico, álcool ducosílico, lupenona, isoarborinol, acetato de isoarborinol, cinamato de isoarborinol, polifenóis, tritiolaniacina, pinitol, ácido linocérico, ácido resinosos, α -friedelinol, glicose e glicina.

Kubec e Musah (2001) isolaram diversas substâncias, dentre elas os diastereoisômeros de sulfóxido de S-benzilcisteína, extraído com metanol, apresentando-se como um pó branco, sólido e cristalino, sob fórmula molecular $C_{10}H_{13}NO_3S$, identificada através de RMN H^1 , UV e IV, e os de c-glutamil-S-benzilcisteinasulfóxido (KUBEC e MUSAH, 2005).

Bezerra (2006), a partir das raízes de *P. alliacea* isolou o trans-estilbeno e dissulfeto de dibenzila a partir do óleo essencial, e trissulfeto de dibenzila, alantoina e sacarose dos extratos, e de acordo com sua revisão, já haviam sido isolados cerca de 30 substâncias das raízes e folhas de *P. alliacea*, as quais estão listadas no Quadro 01 (p. 42), e representadas na Figura 06 (p.43).

Nº	SUBSTÂNCIA	PARTE UTILIZADA	Nº	SUBSTÂNCIA	PARTE UTILIZADA
1	Dissulfeto de dibenzila	Raiz	15	Chalcona-leridal	Folha
2	Trissulfeto de dibenzila	Raiz	16	4-etilpetiveral	Folha
3	Dissulfeto de dipropila	Raiz	17	Petiveral	Raiz
4	Sulfeto de dibenzila	Raiz	18	Acido Barbinevic	Folha
5	Tetrassulfeto de dibenzila	Raiz	19	3-epiilexgenina A	Folha
6	Sulfeto de benzilhidroximetila	Raiz	20	Cis-3,5-difenil-1,2,4-tritiolan	Folha
7	Di (benziltrítio] metano	Raiz	21	(Sc2Rc7Rs)-gama-glutamil-S-benzilcisteinasulfóxido	Raiz
8	(RcRs)-S-sulfoxido-S-benzil-L-cisteína	Raiz	22	(Sc2Rc7Ss)-gama-glutamil-S-benzilcisteinasulfóxido	Raiz
9	(RcSs)-S-sulfoxido-S-benzil-L-cisteína	Raiz	23	(RsRc)-S-(2-hidroxietil)cisteinasulfoxido	Raiz
10	N-metil-metoxi-prolina	Raiz	24	(R)-S-(2-hidroxietil)cisteína	Raiz
11	6-formil-8-metil-7-O-metilpinocembrin	Folha	25	(SsRc)-S-(2-hidroxietil)cisteinasulfoxido	Raiz
12	6-hidroximetil-8-metil-O-7- metilpinocembrin	Folha	26	Benziltrítiohidroxietano	Raiz
13	6-hidroximetil-8-metil-O-5,7- metilpinocebrin	Folha	27	(Sc2Rc7)-glutamil-S-benzilcisteína	Raiz
14	7-dimetileridal	Folha	28	Anidrido sulfônico	Raiz

Quadro 01 - Constituintes químicos isolados de *Petiveria alliacea* representados na figura 06.

Fonte: Bezerra (2006)

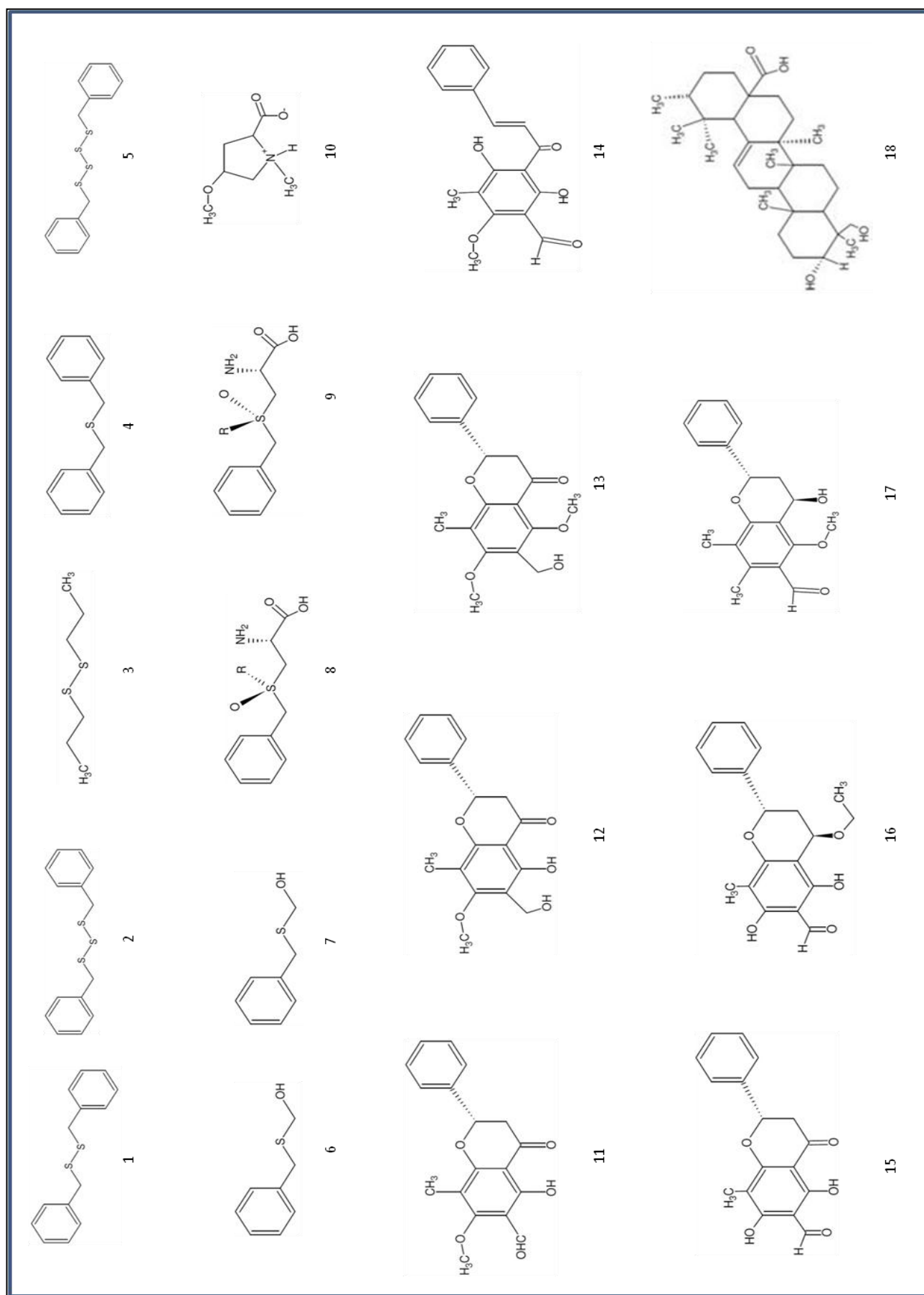
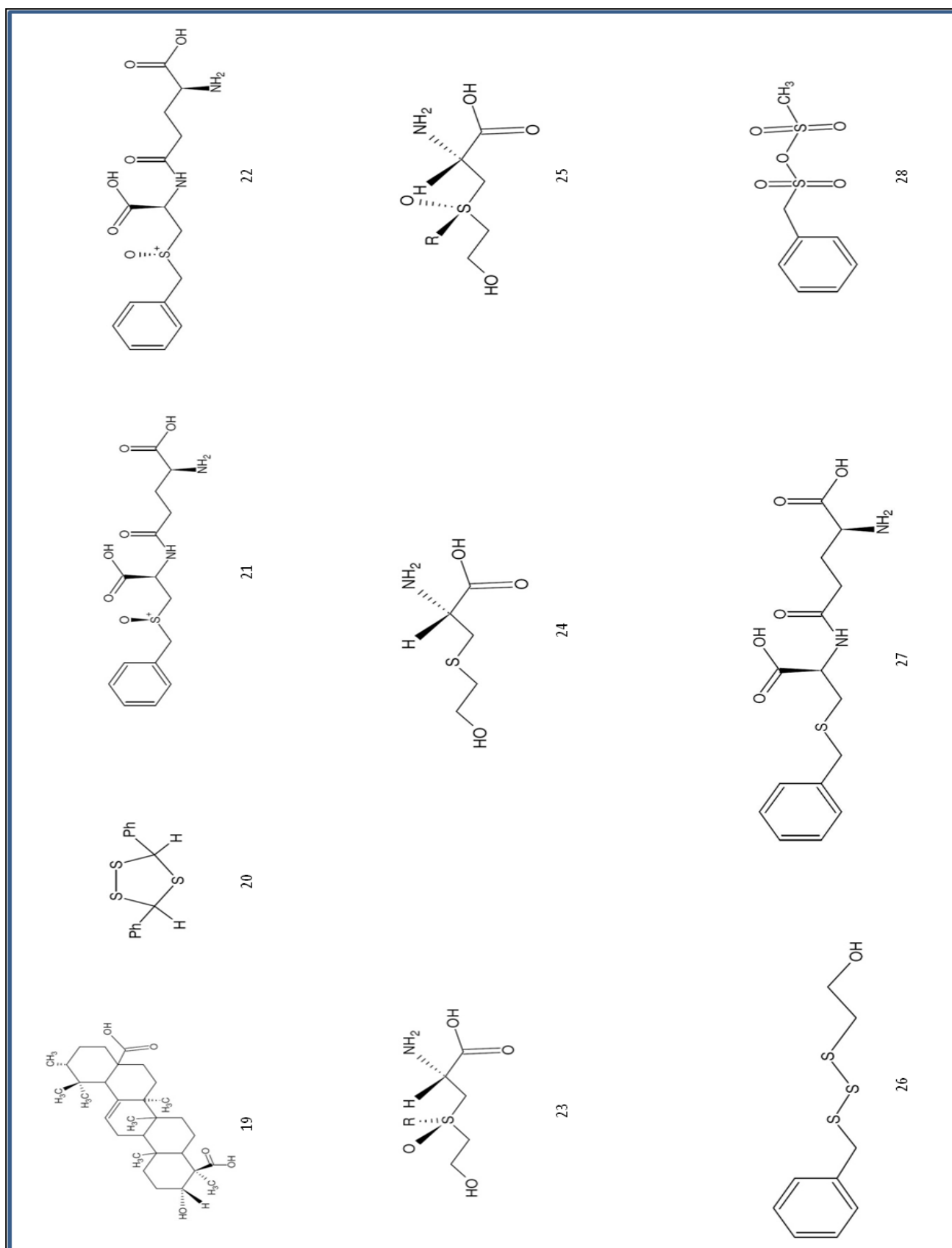


Figura 06: Estruturas das substâncias isoladas de *P. alliacea* descritas no quadro 1.

Continuação da figura 06



Fonte: Bezerra, 2006

3.5.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Segundo a literatura, esta planta possui efeitos hipoglicemiantes (BARBOSA-FILHO et al. 2005), antiinflamatórios, antihelmíntico, antimicrobianos, antineoplásico, estimulante (GUEDES et al. 2009).

Em estudo realizado por Fontoura et al. (2005) com a administração, via oral em ratos, do extrato etanólico das folhas de *P. alliacea*, foi observada atividade antiespasmódica devido a diminuição da secreção e motilidade intestinal, a qual foi atribuída às cumarinas presentes em sua composição. Já a fração metanólica do extrato etanólico das folhas e caule, apresentou atividade anti-tumoral em células humanas e de ratos através de vários alvos moleculares, inclusive fragmentando o DNA e reorganizando o citoesqueleto de actina induzindo a célula a apoptose (URUEÑA et al. 2008).

O extrato etanólico das raízes foi eficiente na inibição do acúmulo de eosinófilos e células mononucleares na cavidade pleural, em pleurisia induzida por carragenina, caracterizando sua ação antiinflamatória atribuída ao composto trissulfeto de dibenzila e fraca atividade analgésica quando comparado com o ácido acetilsalicílico (LOPES-MARTINS et al. 2002).

Segundo revisão feita por Williams et al. (2007), o trissulfeto de dibenzila também possui atividade citotóxica quando testado em células de neuroblastoma humano, dentre outros tipos de células tumorais.

A infusão das raízes foi administrada em ratos adultos, a fim de se avaliar sua atividade antinociceptiva, não se mostrando efetiva nos testes de placa quente e *flick-tail*, estando, portanto, relacionada a mecanismos periféricos (LIMA et al. 1991). Porém, esta mesma atividade foi avaliada utilizando-se o extrato hidroalcoólico e as frações de hexano e acetato de etila em alguns outros modelos experimentais de nocicepção, onde confirmou-se a atividade antinociceptiva nos testes de contorção induzida por ácido acético e no teste da formalina (GOMES et al. 2005) ratificando a relação desta atividade com mecanismos periféricos.

A atividade zigtóxica e abortiva do extrato hidroalcoólico das raízes de *P. alliacea*, foi testado por Maia et al. (2010) o qual mostrou-se negativa, sendo somente observado um atraso na implantação do zigoto no útero das ratas, porém, é citado em outros estudos, que o extrato das sementes estimula a contração uterina, induzindo o aborto.

Os efeitos dos extratos no sistema nervoso central (SNC) foram avaliados através do modelo comportamental de Labirinto em T elevado onde o extrato das partes aéreas demonstrou atividade ansiogênica, enquanto que o das partes subterrâneas apresentou atividade ansiolítica, tais atividades foram relacionadas aos diferentes tipos de flavonoides presentes na composição da planta (BLAINSKI et al. 2010).

O S-benzil-fenilmetanotiosulfonato é um composto dos trissulfetos mais abundantes encontrados no extrato das raízes de *P. alliacea* e sua atividade antioxidante foi avaliada em estudos conduzidos por Okada et al. (2008) o qual mostrou-se discreta em comparação ao α -tocoferol.

Testando a atividade antimicrobiana e antifúngica de diversos extratos das folhas de *P.alliacea* L. em *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* e *Candida albicans*, foi observado que o extrato hidroalcoólico mostrou-se mais efetivo (GUEDES et al. 2009) como representado no Quadro 02.

EXTRATOS		BACTÉRIAS							LEVEDURAS		
		GRAM POSITIVAS					GRAM NEGATIVAS				
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>C. parapisilosis</i>	<i>C. befy.</i>	<i>C. albicans</i>
Parte Vegetal	Solvente	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 29212	ATCC 27175	ATCC 6633	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 22019	ATCC 6258	ATCC 90028
FOLHAS	Hexano	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Metanol	-	-	240	-	-	-	-	-	-	-
	Etanol 70%	3960	3960	3960	3960	3960	3960	3960	250	760	760
	Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CONTROLE +	Ampicilina	0,976	0,976	0,976	0,976	0,976	0,976	0,976	NA	NA	NA
	Fluconazol	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	16	0,125

Quadro 2 - Atividade antimicrobiana de extratos de *P.alliacea*, avaliado através da CMI, onde (-) ausência de inibição, (NA) Não se aplica. As concentrações estão expressas em µg/mL.

Fonte: Guedes et al. 2009.

O pó obtido de suas raízes possui forte odor de alho podendo causar insônia, excitação nervosa e alucinações seguidas de indiferença e imbecilidade (CORRÊA, 1931), por este motivo, esta é considerada a parte mais ativa da planta (LOPES-MARTINS et al. 2002).

Em um estudo foi isolado a partir do extrato etanólico das raízes, o S-óxido de Tiobenzaldeído (Figura 07), composto extremamente irritante à mucosa nasal e aos olhos é um dos responsáveis pelo odor de alho emanado pela espécie, além disso, causa sensação de irritação e queimação quando aplicado a pele (KUBEC et al. 2003).

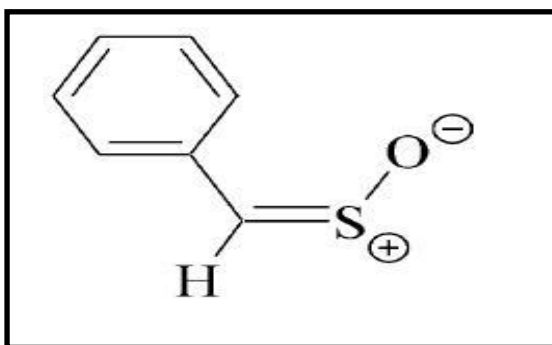


Figura 07 - Estrutura química do S-óxido de tiobenzaldeído.

Fonte: Kubec et al. 2003.

O S-óxido de Tiobenzaldeído e mais 17 compostos também isolados das raízes de *P. alliacea* L. foram testados a fim de se avaliar sua atividade antimicrobiana nas bactérias gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e nas gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, dos quais o mais ativo foi o S-benzil-fenilmetanotiosulfinato (Figura 08, p. 48) (KIM et al. 2006).

No mesmo estudo, foi avaliada atividade antifúngica dos derivados de *P. alliacea* contra *Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus*, *Pseudall escheri aboydii*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis*, observando-se resultado positivo em diferentes concentrações sendo que o ácido benzilsulfônico foi considerado o mais ativo em algumas dessas espécies.

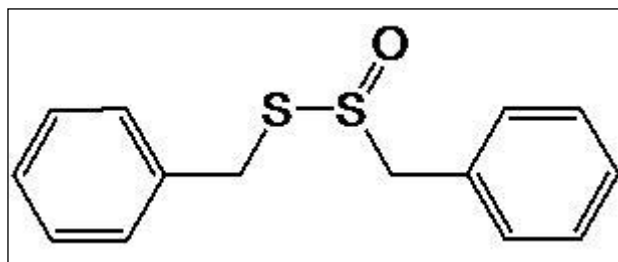


Figura 08 - Estrutura química do S-benzil-fenilmetanotiosulfinato.

Fonte: Kim et al. 2006.

De acordo com Benevides et al. (2001) o extrato Diclorometano/Metanol das raízes, também apresentou atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. A atividade acaricida e inseticida foi confirmada através dos estudos de Johnson et al. (1997) o qual atribuiu esta atividade ao trissulfeto de dibenzila (Figura 06, p.43) isolado a partir do extrato etanólico das raízes.

A toxicidade do extrato aquoso das folhas, foi testada em ratos por García-González et al. (2006), no qual não foi observada a morte de animais tanto na exposição aguda, quanto na sub-crônica, porém, é citada a DL₅₀ analisada em outros estudos de 360 mg/kg administradas oralmente e de efeitos mutagênicos e carcinogênicos oriundos de exposições a longo prazo (DELAVEU et al. 1980).

Por este motivo, faz-se necessária a avaliação toxicológica desta espécie afim de se garantir sua segurança na terapia, já que esta possui uma grande quantidade de atividades biológicas, tal como relatos de toxicidade.

3.6 Toxicologia de Plantas medicinais

Popularmente, acredita-se que o uso de plantas medicinais não causa efeitos adversos por tratar-se de produtos naturais. Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al. 2000; VEIGA-JUNIOR, 2008). Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir a problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos (COELHO, 1998; CORDEIRO et al. 2005; AMORIM et al. 2007.).

A ideia de inocuidade dos fitoterápicos resulta em uma série de acidentes por intoxicação oriundos da ingestão de produtos naturais como alimentos ou mesmo como terapia (RATES, 2001) e esta crença não é facilmente contradita, pois as evidências científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados com o uso de plantas medicinais consistem em informações que dificilmente chegam ao alcance dos usuários atendidos nos serviços de saúde pública caracterizado como indivíduos de baixa escolaridade e acervo cultural (SILVA, 2003; SILVA et al. 2006; ALEXANDRE et al. 2008).

O aumento no número de reações adversas é possivelmente justificado pelo aumento do uso de plantas medicinais (GALLO et al. 2000). Mais de 5.000 suspeitas de reações adversas relacionadas ao uso de ervas foram informadas à OMS antes de 1996. Entre janeiro de 1993 e outubro de 1998, 2.621 eventos adversos, incluindo 101 mortes, associadas com suplementos dietéticos foram informadas ao *Food Drug Administration* (FDA), porém esses eventos adversos não foram bem reportados porque não há nos Estados Unidos nenhum sistema de monitorização como ocorre com os medicamentos convencionais (ADUSUMILLI et al. 2002).

Tais reações não são necessariamente relacionadas a sua ingestão imediata, mas sim podendo se instalar ao longo do tempo e de forma assintomática (HIROTO et al. 1978 *apud* XIMENES, 2008).

Veiga Jr. et al. (2005) citam exemplos de possíveis reações relacionadas a compostos de origem vegetal

“Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas podem ser citados os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial. Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores”.

Outro fator que contribui para a não notificação é o não reconhecimento, pelos médicos, dos eventos adversos associados ao uso de fitoterápicos e a não informação pelo paciente do uso de plantas durante a consulta (ADUSUMILLI et al. 2002; RAHMAN e SINGHAL, 2002).

A toxicidade de plantas medicinais apresenta-se como um grave problema de saúde pública, pois seus efeitos adversos, possíveis adulterações ou sua toxicidade e até mesmo ação sinérgica com outras drogas são normalmente observadas, e tudo isto aliado a um controle pouco rígido na sua comercialização em feiras livres, mercados ou lojas de produtos naturais (VEIGA JR, 2005)

Por estes motivos, esforços generalizados de toxicologistas, farmacêuticos e químicos de produtos naturais são observados através de publicações de grande valor científico, onde várias informações sobre os efeitos adversos são bem elucidados, como o *American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium* com mais de 2000 monografias de produtos naturais, além do *American Products Herbal Association (AHPA)*, *The Botanical Safety Handbook*, 2ª edição (1998) e possui inclusão de algumas monografias de plantas com seus riscos e benefícios conhecidos na *The United States Pharmacopeia (USP)* (ELVIN-LEWIS, 2001; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008).

A ANVISA, a partir do ano 2000, passou a regularizar os medicamentos de origem vegetal exigindo a realização de testes pré-clínicos, de acordo com a RE nº90/ 2004 e clínicos tal como para os medicamentos comuns, e editou a Resolução RDC nº 48 de 16 de Março de 2004, a qual dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos (PAULO, 2009).

A preocupação das autoridades regulatórias com a normatização deste tipo de medicamentos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Toxicidade é definida por Goldstein (1988) como o dano proveniente de um sistema composto por substâncias do organismo e substâncias químicas onde se leva em consideração o efeito causado, tempo de exposição e a concentração do agente tóxico.

Sua avaliação é feita para elucidar as condições na qual a substância produz efeitos tóxicos, a natureza dos efeitos e os níveis de exposição seguros. E por motivos éticos este tipo de estudos em humanos é limitado, sendo a avaliação

toxicológica pré-clínica é realizada em animais de laboratório em condições padronizadas, utilizando-se espécies de mamíferos (XIMENES, 2008).

Segundo Valadares (2006), os testes para avaliação da toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação dose resposta, indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações, estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade e informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe.

Dentre os testes podemos citar a toxicidade aguda a qual estuda os efeitos oriundos de uma ou múltiplas exposições do agente no período de 24 horas e também avaliar a dose que causa efeito letal estimada por um parâmetro denominado DL_{50} o qual consiste na representação da probabilidade de um agente causar efeito nocivo na metade de uma determinada população em estudo, normalmente camundongos ou ratos, ou outros animais de maior porte como coelhos e cães (XIMENES, 2008).

Devido a critérios éticos e morais, esses testes foram sendo modificados de maneira que a morte dos animais não fosse o objetivo final e sim a observação de sinais claros de toxicidade decorrentes de exposições a doses fixas, por este motivo o teste de dose fixa foi criado e incorporado em 1992 pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organisation for Economic Cooperation and Development* - OECD) em sua diretriz de número 420 (VALADARES, 2007).

Este teste utiliza um número menor de animais, causando menor mortalidade, diminui-lhes o sofrimento e a dor causados, também fornecem dados acerca da natureza, tempo de início, duração e desfecho dos sinais tóxicos, gerando parâmetros para avaliação do risco desencadeado pelo agente toxicante (OECD, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

A região Amazônica é caracterizada pela presença de apenas dois períodos sazonais distintos, chamados verão (período seco) de agosto a novembro e o inverno amazônico (período chuvoso), compreendido de dezembro a maio, separados por um período de transição de junho a julho (RODRIGUES et al. 2011), por este motivo, foram realizadas 2 coletas do material vegetal.

Em Março de 2010, foi coletado o material referente ao período chuvoso (PC), e em outubro de 2010, referente ao período seco (PS), ambos no município do Acará- PA, localizado nas coordenadas S 01°29'09.0 / W 48°17'94.8. A identificação foi realizada pelo Dr. Mário Augusto Jardim do Museu Paraense Emílio Goeldi e uma exsicata depositada no herbário da instituição sob o número de registro MG94354.

4.2 Limpeza, secagem e trituração do material vegetal

Em cada período, cerca de 5 Kg do material fresco de *P. alliacea*, constituído de raízes, talos e folhas, foram separados manualmente em partes aéreas (folhas/talos) e raízes. Procedeu-se a lavagem com água, para retirada de impurezas maiores e posteriormente com solução de álcool a 10% para retirada de possíveis contaminantes como fungos ou demais micro-organismos. O material foi exposto a temperatura ambiente por um período de 24 horas e logo após foi levado a estufa de circulação de ar à temperatura de 45°C por 5 dias. O material seco foi triturado em moinho de martelos e facas (NOGUEIRA, modelo D.M JÚNIOR), no Laboratório Central de Extração da Faculdade de Química da UFPA.

O material pulverizado foi separado em duas partes, uma utilizada para preparação dos extratos e a outra para avaliação farmacognóstica.

4.3 Preparo do extrato

O material vegetal de cada período foi colocado em maceração separadamente, sendo utilizado como solvente álcool a 70% por 7 dias. Os extratos

obtidos foram concentrados em evaporador rotativo da marca Heidolph (Laborota 4000) a 40°C sob pressão de 1 atm e rotação de 120 rpm, e submetidos a banho-maria, obtendo-se os extratos brutos concentrados das partes aéreas e raízes de *P. alliacea* L e nomeados de acordo com o período com as siglas PAPS (partes aéreas - período seco), RPS (raízes – período seco), PAPC (partes aéreas – período chuvoso) e RPC (raízes – período chuvoso).

4.4 Avaliação Antifúngica

4.4.1 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller Hinton (HIMEDIA, INDIA) e Ágar Sabouraud dextrose (HIMEDIA, INDIA), foram preparados a partir de uma base desidratada conforme as instruções do fabricante.

4.4.2 CEPAS TESTADAS

Para realização dos testes foram utilizadas cepas de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* obtidas a partir de isolados clínicos cedidos pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), as quais foram mantidas em Ágar Sabouraud dextrose à temperatura ambiente, no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UFPA.

Para os ensaios, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud dextrose para promover o crescimento exponencial dos conídios mantidas em estufa a 37°C por 7 dias para *A. fumigatus* e *A. niger* e a 25°C por 7 dias para *A. flavus*.

4.4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A partir do extrato seco das partes aéreas e raízes de *P. alliacea* de ambos os períodos, foram preparadas soluções-estoque na concentração de 200 mg/mL diluídas em DMSO a 5%, mantidas em refrigeração até o momento dos testes.

A partir das soluções-estoque, foram preparadas diluições seriadas em tubos cônicos nas concentrações de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 em caldo Muller Hinton, correspondendo a 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL.

4.4.4 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DO EXTRATO

Com o auxílio de uma alça calibrada, foram semeados 10 µL das soluções estoque em placas de Petri contendo Ágar Saboraud dextrose, que foram posteriormente levadas a estufa a 37°C para incubação por 24 horas, sendo assim, observado o se houve o crescimento de micro-organismos.

4.4.5 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO

Para preparo do inóculo foram adotados os procedimentos descritos na Norma M38-A, vol. 22 Nº 16, “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada” do NCLS (*National Comitee for Laboratory Standards*) com adaptações.

Inicialmente foi realizada a lavagem dos conídios com caldo Muller Hinton a partir da placa previamente semeada, sendo feita uma leve raspagem com alça descartável de forma a remover apenas os esporos dos fungos evitando assim, a transferência de fragmentos de ágar e de hifas. A suspensão fúngica (3 mL) foi coletada com ponteiros estéreis acopladas a micropipeta automática (1000 µL) e transferida para um tubo de ensaio estéril aguardando-se 5 minutos para sedimentação das partículas maiores. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 5 mL de caldo e este foi agitado em aparelho tipo vórtex (Phoenix AP56) por 15 segundos. A turbidez da suspensão foi ajustada para 0,5 em relação a escala de MacFarland correspondendo a aproximadamente 10^8 UFC/mL e esta foi diluída para 1:50 alcançando-se, assim, aproximadamente $0,4$ a 5×10^4 UFC/mL.

4.4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *P. ALLIACEA* L. PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

Os ensaios de microdiluição foram realizados de acordo com a Norma M38-A, vol. 22 Nº 16, “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para

Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada” do NCCLS (*National Comitee for Laboratory Standards*), o qual define a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) como um teste de sensibilidade, realizado sob condições conhecidas no qual é definida a menor concentração de um agente antimicrobiano o qual impede o crescimento visível de um micro-organismo.

Os ensaios foram realizados separadamente para cada período de coleta, em uma placa estéril de 96 poços em formato de “U”, adicionando-se 100 µL de cada diluição aos poços contendo previamente 100 µL do inoculo fúngico ($0,4 - 5 \times 10^4$ UFC/mL) em todos os poços, obtendo-se volume final de 200 µL em cada. O controle negativo utilizado foi DMSO 5% e para controle positivo usou-se 40 µL de anfotericina B, conforme o esquema demonstrado na Figura 09. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas.

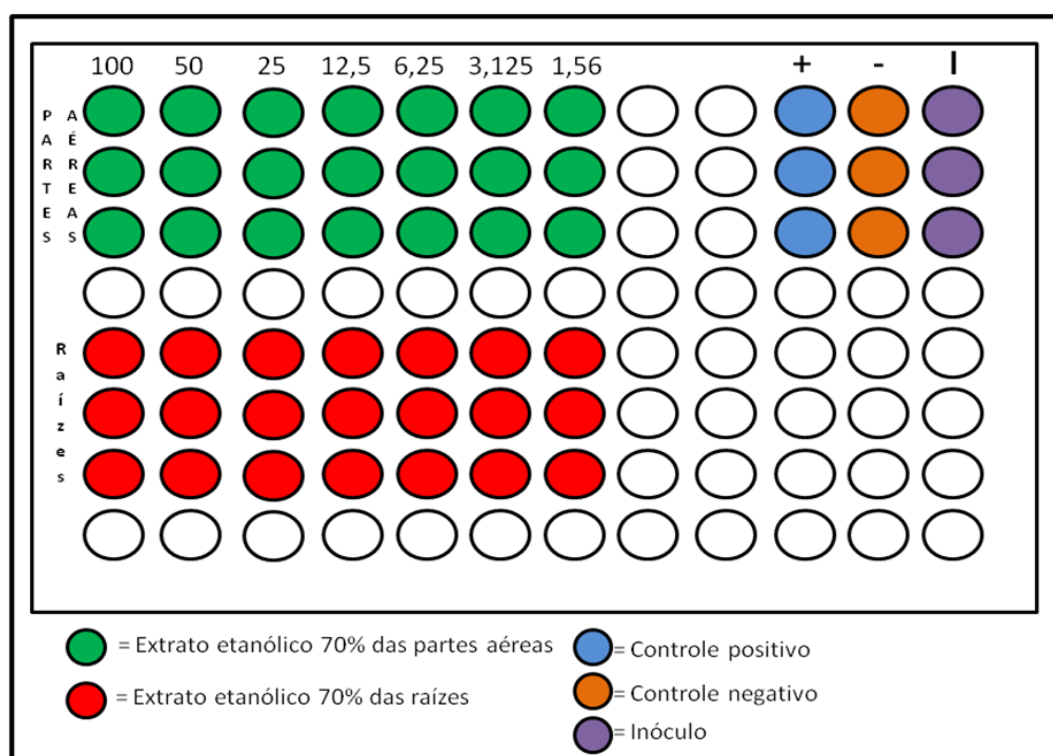


Figura 09 - Esquema de distribuição das concentrações na placa de microdiluição. Concentrações dos extratos estão expressas em mg/mL.

Após esse período, foi adicionado a cada poço 15 µL de resazurina 0,01% (fenoxazin-3-ona) um corante indicador de óxido-redução, sendo a placa novamente incubada a 37°C por 3 horas. Em seguida foi realizada a leitura visual para

identificação da CIM, considerando-se a manutenção da coloração de azul como ausência de crescimento enquanto que a mudança para coloração rosa indica a reação química de óxido-redução da resazurina em resofurina, sendo interpretada como presença de células viáveis (MONTEIRO et al. 2012). A CIM corresponde ao último poço de coloração azul da linha no sentido esquerda – direita.

4.4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) PELO MÉTODO DE *POUR PLATE*.

A partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), é possível confirmar os resultados obtidos através da leitura do teste de CIM com a resazurina e obter a determinação da concentração fungicida mínima (CFM). A CFM foi determinada pela técnica *pour plate*, na qual foram adicionados 10 µL do conteúdo de cada poço sobre uma placa de Petri estéril de 90x15, adicionando-se em seguida aproximadamente 20 mL de Ágar Saboraud dextrose seguida de homogeneização. Essas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior leitura e contagem das UFC's.

4.5 Avaliação farmacognóstica (Farmacopéia Brasileira 5ª edição).

4.5.1 PERDA POR DESSECAÇÃO

Foi pesado 2g do pó do material vegetal em pesa-filtro previamente dessecados por 30 minutos nas mesmas condições do teste, o qual foi levado a estufa por 2 horas a temperatura entre 105 – 110°C. A seguir foram retirados e deixados em dessecador para arrefecimento e posterior pesagem, sendo este procedimento repetido a cada hora até obtenção de massa constante. O resultado foi expresso em porcentagem de acordo com a equação a seguir:

$$\frac{PU - PS}{PA} \times 100$$

Onde:

PU: Pesa-filtro + amostra antes da dessecação

PS: Pesa-filtro + amostra após a dessecação

PA: Peso da amostra.

4.5.2 PERDA POR DESSECAÇÃO EM BALANÇA DE INFRA-VERMELHO

Após retirar a umidade da balança com infravermelho, através do programa de pré-aquecimento, foram distribuídas de modo uniforme amostras de 2 g dos pós no prato coletor de alumínio contido no equipamento e selecionou-se o programa de secagem a 105 °C, por 60 minutos. Os valores percentuais fornecidos ao final da técnica no *display* do aparelho foram anotados e o resultado representa a média aritmética de três determinações.

4.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

Foram pesados 3g dos pós e transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados durante 30 minutos em forno mufla (600 °C). As amostras foram distribuídas uniformemente nos cadinhos e incineradas a temperatura de 600 °C durante 180 min. Após resfriamento em dessecador os cadinhos foram pesados e calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar. A operação foi repetida até peso constante e o resultado consiste na média aritmética de três determinações em porcentagem (% p/p).

4.5.4 DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DO PÓ

Para a análise granulométrica do material obtido da moagem de *P. alliacea* L., 3 g do pó foi submetido à passagem forçada por vibração em agitador eletromagnético para peneiras redondas na escala vibratória 6, durante 15 minutos. Utilizou-se um jogo de tamises com aberturas de malhas de: 1,700; 0,710; 0,355; 0,250 e 0,180 mm. O resultado baseou-se na média de três determinações para o

cálculo do diâmetro médio das partículas (D50), através da metodologia proposta por Ansel et al. (2000) e a descrição do pó segundo a Farmacopeia Brasileira (2010).

4.5.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA

Preparou-se o decocto de cada material vegetal pulverizado de acordo com as recomendações da Farmacopeia (2010) e transferiu-se para 10 tubos de ensaios de 16x160 mm em série sucessiva de 1mL até 10 mL. Seguidamente ajustou-se o volume do líquido em cada tubo para 10 mL com água. Os tubos tampados foram agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo e após repouso por 15 minutos mensurou-se a altura da espuma obtida em cada tubo. Utilizou-se a equação:

$$\text{Índice de espuma} = \frac{1000}{A}$$

Para cálculo do índice de espuma, “A” corresponde ao volume em mililitros do decocto utilizado para preparo da solução no tubo onde observou-se a presença de um espumídeo de 1 cm de altura persistente. Foi calculada também a massa da droga contida no volume da diluição onde houve a formação de espuma, baseando-se na amostra utilizada para o preparo do decocto.

4.5.6 DETERMINAÇÃO DO pH

Em erlemeyer foram pesados 99 g de água destilada, que foram levados a chapa-elétrica até ebulição por 5 min, e neste foram adicionados 1 g da droga vegetal para realização da extração por infusão durante 15 min. A solução extrativa foi filtrada com algodão e após arrefecimento foram realizadas as leituras em peagâmetro da marca QUIMIS, modelo Q400A, previamente calibrado em pH 4,0 e 7,0 (FARMACOPÉIA, 1988). O pH da água destilada também foi verificado como controle e o resultado representa a média de 3 determinações.

4.5.7 TEOR DE EXTRATIVOS

Cerca de 1g da droga vegetal triturada foi pesada e submetida à decocção com 100 g de água, durante 10 minutos. Após o resfriamento, o volume foi completado para 100 ml e a solução resultante foi filtrada em papel filtro, sendo os primeiros 20 mL desprezados. Do restante do filtrado, foi pesada uma alíquota equivalente a 20g, em pesa-filtro previamente tarado, levado a evaporação até secura em banho-maria, sob agitação ocasional (DEUTSCHES ARZENEIBUCH, 1994).

O teor de extrativos foi calculado em massa com percentual, pela media de cinco determinações segundo a equação abaixo:

$$TE = \frac{g \cdot FD \cdot 100}{m}$$

Em que: TE = teor de extrativos (%); g = massa do resíduo seco (g); m = massa da amostra (g); FD = fator de diluição (5).

4.5.8 DETECÇÃO DE ALCALOIDES

Para extração foram utilizados 0.5 g do material vegetal em seguida foram adicionados 20 mL da solução de HCl 5%. A solução foi aquecida até fervura por 10 minutos e após filtração, foi dividida em 4 tubos de ensaio. Posteriormente foram adicionadas gotas dos reagentes: Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat. A formação de precipitado nos tubos indica resultado positivo (COSTA, 1994; MATOS, 1998; SIMÕES, 2007).

4.5.9 DETECÇÃO DE FLAVONOIDES

Em um béquer de 60 ml pesou-se 2g do material vegetal, adicionou-se 20ml de etanol a 70%, levou-se ao aquecimento até ebulição por cinco minutos, em

seguida a solução resultante foi filtrada e submetida a reação de Shinoda na qual adicionou-se 3 mL do extrato em um tubo de ensaio, adicionando-se raspas de magnésio metálico e gotas de HCl concentrado. Na qual se observa, após o desprendimento de hidrogênio, a mudança na coloração para rósea ou vermelha, caso a reação seja positiva (COSTA, 1994; MATOS, 1998; SIMÕES, 2007).

4.5.10 DETECÇÃO DE TANINOS

Foram utilizados 1g do material vegetal pulverizado, o qual foi submetido a ebulição com 50 mL de água por 5 minutos e após arrefecimento a solução foi filtrada e dividida em 4 tubos.

Para o primeiro tubo foi transferida uma alíquota de 1 mL e adicionada 1 gota de HCl 5% e posteriormente gotejou-se lentamente a solução de gelatina a 2,5% e o aparecimento de precipitado foi considerado indicativo de resultado positivo.

No segundo tubo de ensaio foi adicionado 1 mL da solução extrativa e 10 mL de água destilada seguida de 1 gota de FeCl 2%. A mudança de coloração para azul ou violeta é indicativa de presença de taninos pirogálicos, enquanto que a coloração verde ou castanha indicativo de taninos catequicos.

No terceiro tubo foram utilizados 5 mL da solução extrativa que foram adicionados a 10 mL de solução aquosa de ácido acético 10% e 5 mL de acetato de chumbo 10%, o resultado positivo pode ser observado através da formação de precipitado (COSTA, 1994; MATOS, 1998; SIMÕES, 2007).

4.5.11 DETECÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

1 g do material vegetal pulverizado foi levado a aquecimento e fervura por 10 minutos com 20 mL de água destilada, a solução foi arrefecida e filtrada. Em um tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL da solução extrativa e uma quantidade igual do reagente de Fehling. A mistura foi aquecida em banho-maria e a formação de precipitado vermelho-tijolo é indicativo de resultado positivo (COSTA, 1994; MATOS, 1998; SIMÕES, 2007).

4.6 Prospeção Fitoquímica

Os extratos de *P. alliacea* foram submetidos à análise qualitativa para avaliação dos metabólitos secundários de acordo com a metodologia descrita por Barbosa et al. (2001).

Foram realizados testes para identificação de saponina espumídica, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenolactonas, depsídeos e depsidonas.

4.7 Avaliação da toxicidade

4.7.1 CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT

Foram inoculados em camundongos, 3 mL de tioglicolato de sódio a 3% (i.p) e após 48h, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Após a morte e exposição do peritônio, 3mL de RPMI incompleto (pH 7,2), foram injetados na cavidade abdominal e posteriormente foi realizada a massagem manual para coleta das células e estas foram transferidas para tubo estéril e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos.

As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI – 1640 completo (RPMI - 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina).

O número de células viáveis foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer utilizando corante azul de tripano, sendo ajustado à concentração de 5×10^5 células/mL, foram adicionados a uma placa de 96 poços, 100µL dessa suspensão em cada poço e 100µL de cada uma das diluições do extrato diluídas em RPMI incompleto (concentrações finais de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL, respectivamente). Como controle foi utilizado o mesmo volume de RPMI completo. A incubação da placa foi feita durante 24 horas (37° C, 7,5% de CO₂).

Após esse período, 15µL de uma solução de MTT foram adicionados em cada poço, incubando-se por 3 horas sob as mesmas condições. Após a incubação adicionou-se 30µL de isopropanol para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540nm.

O teste do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), que baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. São formados, no meio intracelular, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico (MOSMANN, 1983).

4.7.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL

4.7.2.1 Animais e condições de acomodação

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, de peso inicial entre 30 - 40g, obtidos do Biotério da Universidade Federal do Pará, mantidos em sala de acomodação com temperatura controlada em torno de 25°C, exaustão de ar e ciclo de claro/escuro de 12 horas na Faculdade de Farmácia da UFPA.

Os animais foram mantidos com ração peletizada e água *ad libitum* em caixas de polipropileno (50 x 35 x 15 cm), com grade metálica e forradas com palha de arroz e os procedimentos de manipulação dos animais seguiram de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, segundo as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) na lei Nº 11.794, publicada no D.O.U de 08 de Outubro de 2008. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética do uso de Animais de Laboratório do Instituto Evandro Chagas, sob o número de registro 0050/2009 (Anexo 01).

4.7.1.2 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico das partes aéreas e subterrâneas de *P. alliacea* L. de ambos os períodos.

Os testes para avaliação da toxicidade aguda oral do extrato foram baseados no *Guideline* 420 da OECD adotando-se o procedimento de dose fixa, com algumas adaptações.

Os animais foram divididos em 5 grupos, os grupos tratados com os extratos PAPC, RPC, PAPS e RPS (n=6) e o grupo controle (n=4) no qual foi administrada água filtrada.

Os extratos brutos secos foram reconstituídos em água destilada na dose máxima de 5000 mg/kg e administrados por gavagem em um volume que não excedesse 10 mL/kg de peso do animal, esta dose foi escolhida por ser a máxima preconizada (OECD, 2001).

Após administração dos extratos, os animais foram mantidos nas condições previamente citadas, sendo observados a cada 15 minutos durante a primeira hora em seguida de hora em hora em um intervalo de 4 horas para avaliação hipocrática, utilizando uma tabela segundo Malone e Robichaud (1962) (Anexo 2) a qual forneceu informações gerais sobre a natureza toxicológica dos extratos testados.

Os animais foram monitorados diariamente durante 13 dias subsequentes a administração da dose e ao final do período foram submetidos a eutanásia através da administração intraperitoneal de uma mistura de Cloridrato de cetamina e xilazina (2:1) na dose de 2,5 mL/kg e seus órgãos foram retirados para avaliação anatomo-histopatológica.

4.7.1.3 Avaliação da evolução ponderal e consumo de água e alimento

Os animais de todos os grupos foram pesados antes da administração dos extratos em balança semi-analítica e nos dias subsequentes durante todo o período do teste, aproximadamente no mesmo horário para avaliação de seu ganho ponderal.

Foi avaliado também o consumo diário de água e alimento a partir do primeiro dia de tratamento, sendo que para o consumo de água, foi medido em uma proveta graduada uma quantidade fixa de água diariamente (250 mL) e esta era medida no dia posterior, no mesmo horário para cálculo do volume consumido. Enquanto que para o consumo de alimento, foi disponibilizado diariamente 100 g de ração (por dia e por grupo) a qual da mesma maneira foi pesada nos dias posteriores.

4.7.1.4 Avaliação Anatomo-Histopatológica

Após a retirada dos órgãos estes foram fixados em formalina tamponada (solução de formol 10%) e enviados ao Laboratório de Patologia Clínica Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia para análise de acordo com os métodos descritos por Bacha e Wood (1990).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism[®] 5.0. Para a comparação entre os períodos, os resultados dos testes farmacognósticos foram analisados pelo teste T de *student*, enquanto que nos testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, avaliando o ganho ponderal, consumo de alimento e água dentre os grupos tratados e o controle, os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão para cada grupo e analisados pelo teste ANOVA de 1 via, tukey com nível de significância de 0,05 ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos extratos

O rendimento geral dos extratos hidroalcoólicos brutos das partes subterrâneas e aéreas a partir de 5 kg de material vegetal são mostrados no quadro 03.

	RPC	PAPC	RPS	PAPS
Pó (g)	500	930	300	300
Extrato (g)	4,58	92,07	3,12	28,44
Rendimento (%)	0,9	9,9	1,04	9,48

Quadro 03 - Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de *P. alliacea* de dois períodos de coleta.

5.2 Avaliação Antifúngica

Não houve crescimento de micro-organismos após o semeio das soluções estoque em placas contendo Ágar Sabouraud, descartando-se, assim, a contaminação prévia dos extratos.

O controle negativo com DMSO 5% não afetou o crescimento fúngico podendo, desta maneira, ser utilizado como diluente do extrato, também foi preparado um controle de crescimento do inóculo e o controle positivo utilizando-se Anfotericina B, demonstrando a inibição do crescimento em 100%.

Os testes foram iniciados pela espécie *A. fumigatus*, porém, os extratos PAPS e PAPC não inibiram o crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas como mostra a Figura 10 (p. 68), e por este motivo, não foram testados nas outras espécies e nos testes de citotoxicidade.

O extrato de RPC, inibiu o crescimento de *A. fumigatus* com valores de CIM de 6,25 mg/mL e CFM de 25 mg/mL, já o extrato RPS obteve valores menores de CIM e CFM, sendo 3,12 e 6,25 respectivamente, como podemos observar na Figura 11 (p. 68).

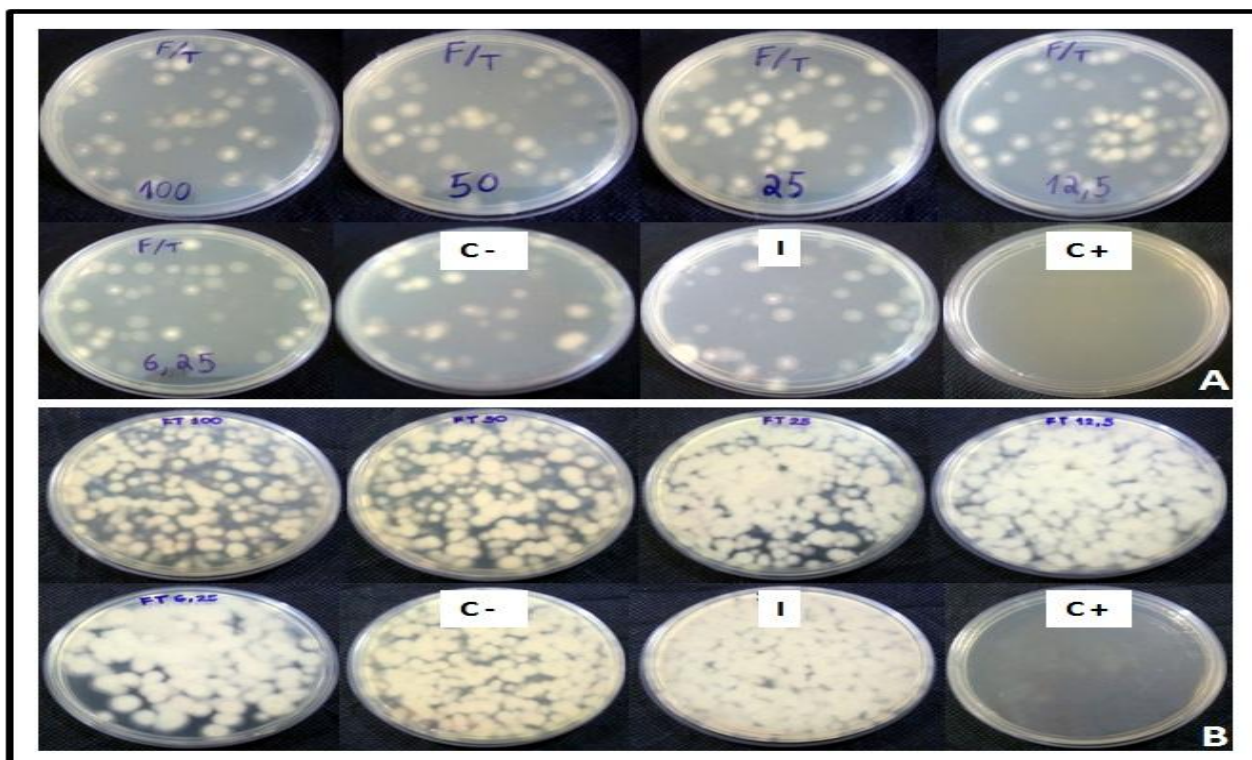


Figura 10 - Resultado da técnica de *pour plate* para extrato de partes aéreas de *P. alliacea* L de ambos os períodos contra *A. fumigatus*, onde (A) representa os resultados do PC e (B) do PS, (C-) controle negativo, (I) controle de crescimento do inoculo e (C+) controle positivo.

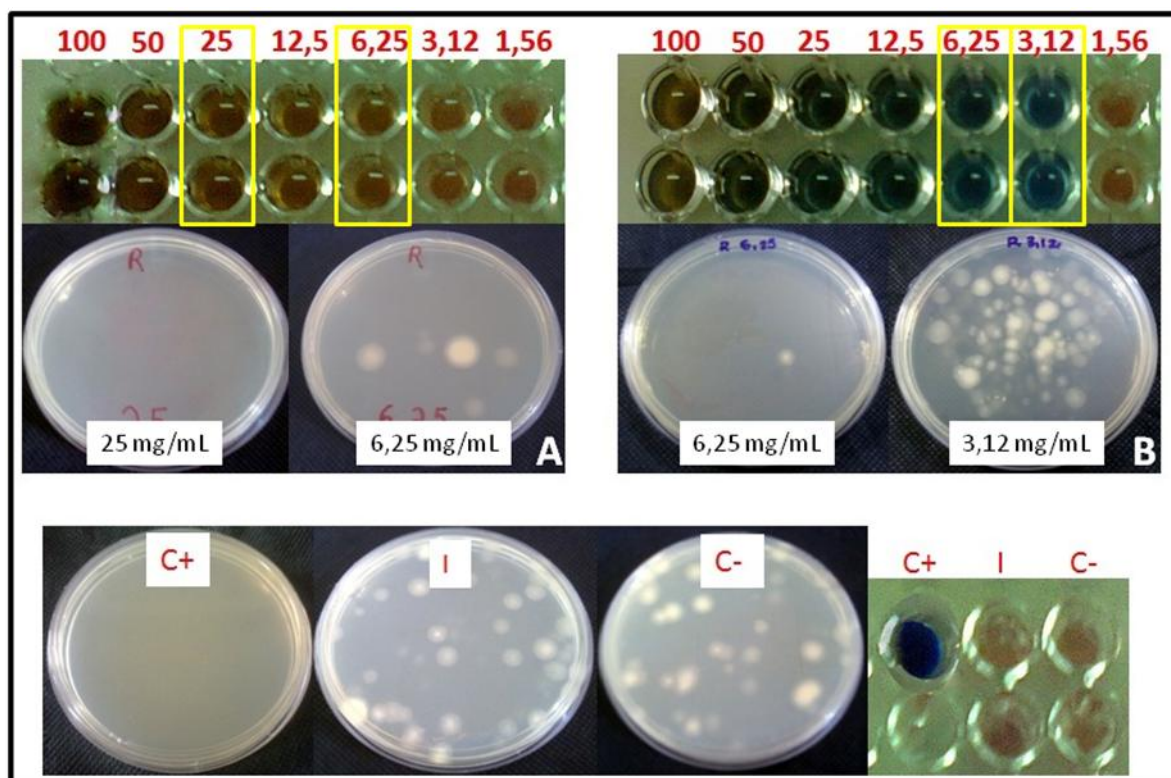


Figura 11 - Resultado dos testes com extrato das raízes de *P. alliacea* de ambos os períodos contra *A. fumigatus*. Onde (A) representa o PC, (B) o PS, (C+) Controle positivo, (C-) controle negativo e (I) Inoculo. Concentrações em mg/mL.

Os resultados obtidos para os testes com *A. flavus* obtiveram valores de CIM em 25 mg/mL e CFM de 50 mg/mL no extrato RPC , enquanto que no extrato RPS os valores de CIM e CFM foram de 50 e 100 mg/mL, representados na Figura 12

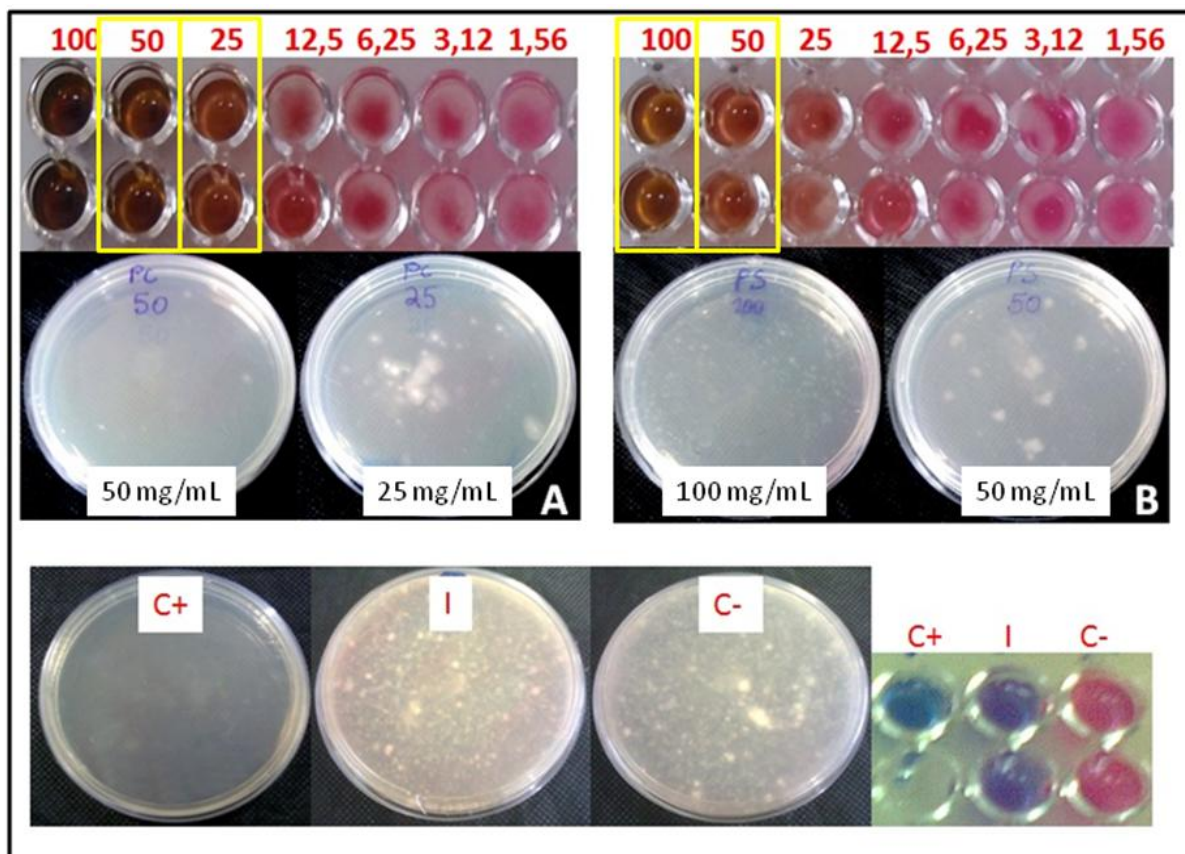


Figura 12 - Resultado dos testes com extrato das raízes de *P. alliacea* de ambos os períodos contra *A. flavus*. Onde (A) representa o PC, (B) o PS , (C+) Controle positivo, (C-) controle negativo e (I) Inoculo. Concentrações em mg/mL.

Os valores de CIM e CFM obtidos com o RPC contra *A. niger* foram de 12,5 e 25 mg/mL respectivamente, já os obtidos com extrato RPS foram de 25 e 50 mg/mL (Figura 13, p. 70).

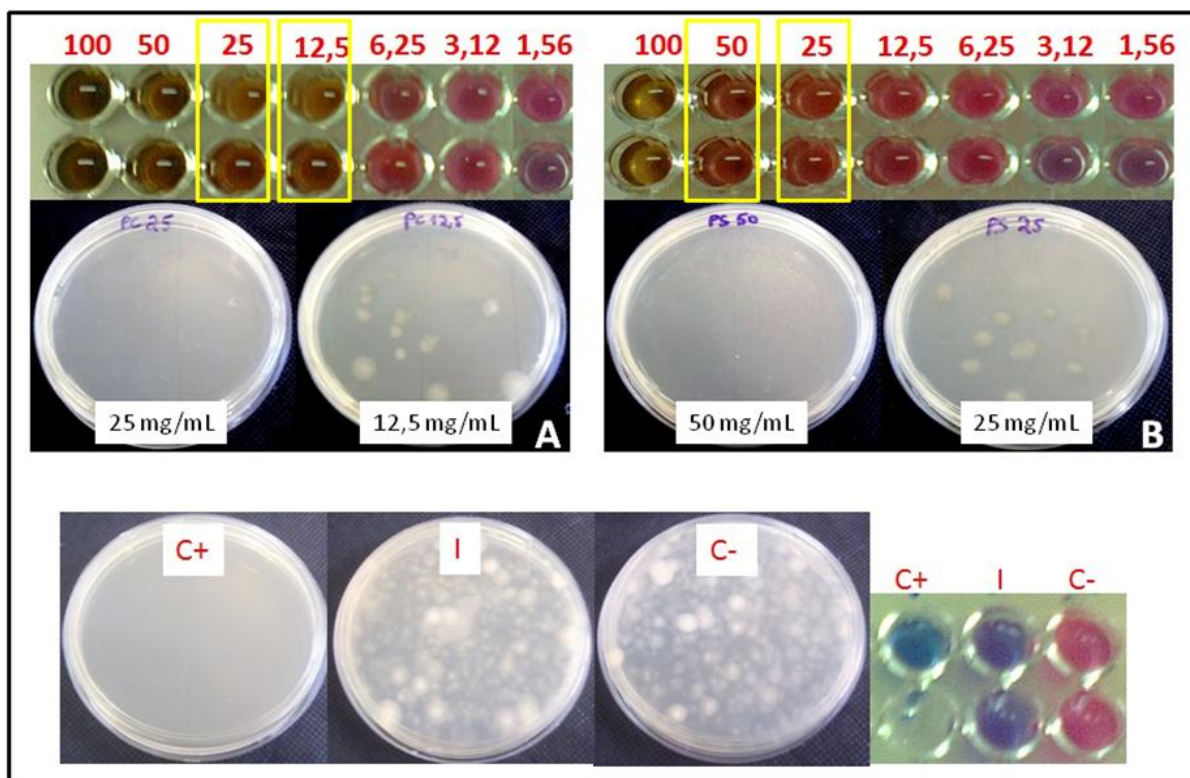


Figura 13 - Resultado dos testes com extrato das raízes de *P. alliacea* de ambos os períodos contra *A. niger*. Onde (A) representa o PC, (B) o PS, (C+) Controle positivo, (C-) controle negativo e (I) Inoculo. Concentrações em mg/mL.

No quadro 04, os valores de CIM e CFM estão representados para todas as espécies.

<i>P. alliacea</i>	mg/mL	FUNGOS		
		<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
Raízes (PC)	CIM	6,25	25	12,5
	CFM	25	50	50
Raízes (PS)	CIM	3,12	50	25
	CFM	6,25	100	50
Anfotericina B	-	2	2	2

Quadro 04 - Valores de CIM e CFM para os extratos hidroalcoólicos 70% das raízes de *P. alliacea* contra *Aspergillus* sp.

5.3 Avaliação farmacognóstica

Os resultados dos testes de avaliação farmacognóstica a partir do pó das partes aéreas encontram-se expressos para ambos os períodos na Tabela 01.

Tabela 01 - Resultado dos testes farmacognósticos obtidos através das partes aéreas de *P. alliacea* L. em dois períodos de coleta.

Teste	Período	
	Chuvoso	Seco
D50 (mm)	0.275	0.253
Perda por dessecação – Gravimetria*	$9.7 \pm 0.1528^{\#}$	$8.5 \pm 0.05774^{\#}$
Infratest*	$8.96 \pm 0.08819^{\#}$	$7.36 \pm 0.1453^{\#}$
Cinzas totais*	$9.4 \pm 0.1528^{\#}$	$8.1 \pm 0.08819^{\#}$
pH	6.1 ± 0.02887	5.7 ± 0.01202
Teor de extrativos*	15	15

Resultados expressos em Média $\pm$ desvio padrão de 3 determinações. * Valores em porcentagem.

Diferença estatística significativa $p < 0,05$

A Tabela 02 mostra os resultados para o material pulverizado das raízes de *P. alliacea* L.

Tabela 02 - Resultado dos testes farmacognósticos obtidos através das raízes de *P. alliacea* L. em dois períodos de coleta.

	Período	
	Chuvoso	Seco
D50 (mm)	0.264	0.253
Perda por dessecação – Gravimetria*	8.0 ± 0.05774	8.1 ± 0.05773
Infratest*	7.5 ± 0.1732	7.2 ± 0.08819
Cinzas totais*	$4.6 \pm 0.05773^{\#}$	$7.2 \pm 0.1000^{\#}$
pH	5.7 ± 0.01202	5.6 ± 0.02667
Teor de extrativos*	15	15

Resultados expressos em Média $\pm$ desvio padrão de 3 determinações. * Valores em porcentagem.

Diferença estatística significativa $p < 0,05$

5.4 Prospeção fitoquímica de *P. alliacea* L.

Os resultados da abordagem fitoquímica estão representados para as partes aéreas e raízes nos Quadros 05 e 06, respectivamente. Entre os períodos, não foram consideradas as diferenças de intensidade nestes resultados, devido estes testes serem colorimétricos, realizados apenas para caracterizar os metabólitos.

Classes Químicas	Período			
	Chuvoso		Seco	
	Pó	Extrato	Pó	Extrato
SAPONINA ESPUMIDICA	++	++	++	++
AC. REDUTORES	++	+	+++	++
POLISSACARÍDEOS	NA	-	NA	-
FENOIS E TANINOS	-	-	-	-
FLAVONÓIDES	-	-	-	-
ALCALÓIDES (BOUCHARDAT)	+	+	+	+
ALCALÓIDES (BERTRAND)	++	++	+	++
ALCALÓIDES (DRAGENDORFF)	++	++	++	++
ALCALÓIDES (MAYER)	++	+	++	++
DEPSÍDIOS E DEPSIDONAS	NA	-	NA	-
SESQUITERPENOLACTONAS	NA	-	NA	-

Quadro 05 - Resultado da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *P. alliacea* L. considerando-se como: +: baixa intensidade; ++: média intensidade; +++: alta intensidade; -: não detectado; NA: não se aplica.

Classes Químicas	Período			
	Chuvoso		Seco	
	Pó	Extrato	Pó	Extrato
SAPONINA ESPUMIDICA	++	+++	++	+++
AC. REDUTORES	++	++	++	++
POLISSACARÍDEOS	NA	-	NA	-
FENOIS E TANINOS	-	-	-	-
FLAVONÓIDES	-	-	-	-
ALCALÓIDES (BOUCHARDAT)	+	++	+	++
ALCALÓIDES (BERTRAND)	++	++	++	++
ALCALÓIDES (DRAGENDORFF)	++	+++	++	++
ALCALÓIDES (MAYER)	++	++	++	++
DEPSÍDIOS E DEPSIDONAS	NA	+	NA	+
SESQUITERPENOLACTONAS	NA	+	NA	+

Quadro 06 - Resultado da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico das raízes de *P. alliacea* L. considerando-se como: +: baixa intensidade; ++: média intensidade; +++: alta intensidade; -: não detectado; NA: não se aplica.

5.5 Avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT

Após o período de incubação e leitura das absorvâncias, as células incubadas com os extratos de ambos os períodos apresentaram valores próximos a 100% de viabilidade em todas as concentrações testadas (100 – 1,56 mg/mL) quando comparadas ao grupo controle como observado nas Figuras 14 e 15 (p. 74).

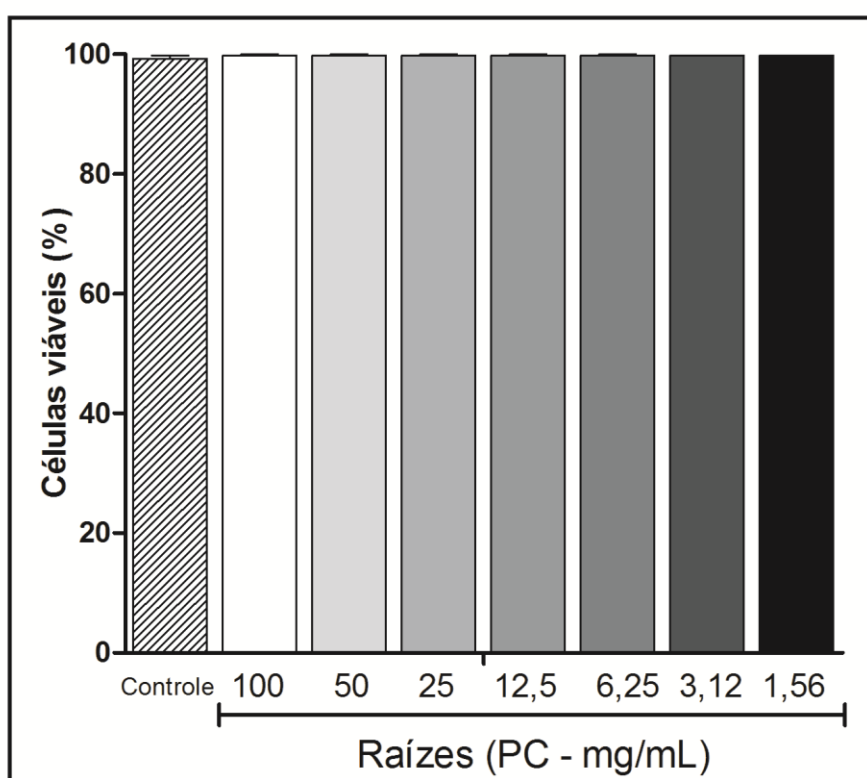


Figura 14 - Viabilidade celular de macrófagos após incubação com o extrato RPC nas concentrações de 100 – 1,56 mg/mL. $P < 0,05$

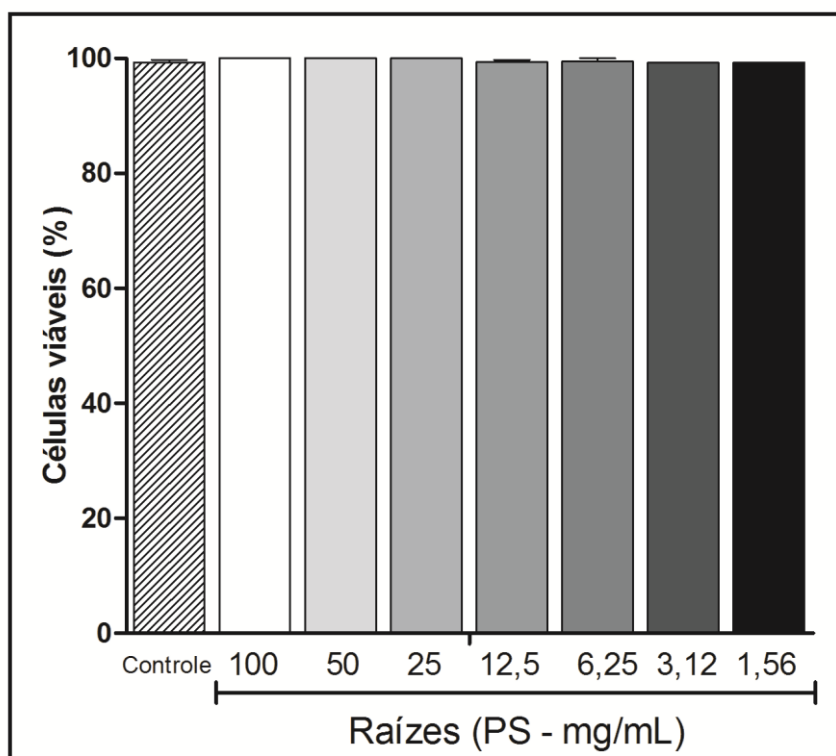


Figura 15 - Viabilidade celular de macrófagos após incubação com o extrato RPS nas concentrações de 100 – 1,56 mg/mL. $P < 0,05$

5.6 Avaliação toxicológica *in vivo*

Após o tempo de observação dos animais (14 dias) não houve mortes, nem foram observados sinais de toxicidade em comparação com o grupo controle (tratado com água).

Em relação ao ganho ponderal, observa-se que somente o grupo tratado com extrato RPS apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle na dose de 5000 mg/kg, não causaram diferenças estatisticamente significantes na evolução ponderal dos animais tratados em relação aos animais controle, como mostra a Figura 16 (p. 75).

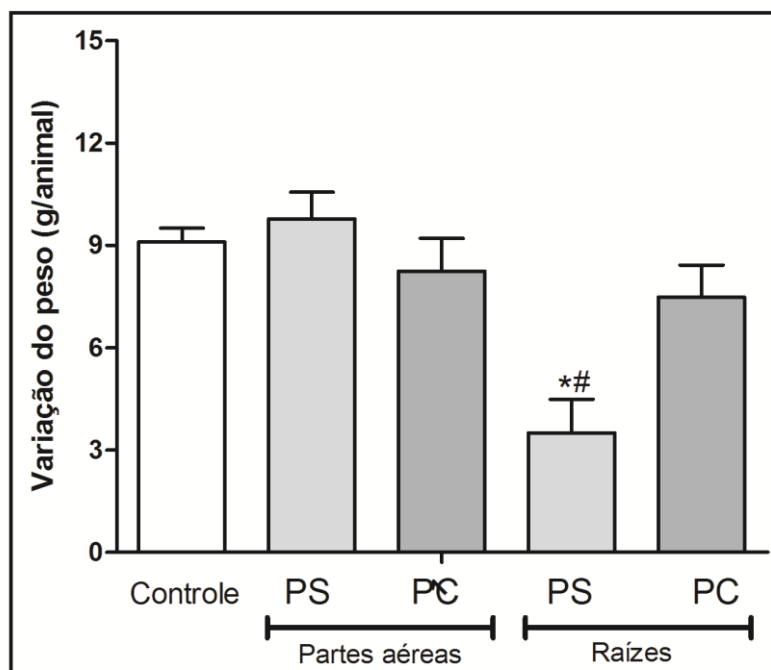


Figura 16 - Variação ponderal dos animais avaliada durante 14 dias dos grupos tratados com extratos de *P. alliacea* na dose de 5000 mg/kg.

Apesar da diferença no ganho ponderal entre os animais, não foram observadas diferenças significativas no consumo de alimento entre os grupos tratados e o grupo controle, como mostram as Figuras 17 e 18 (p. 76).

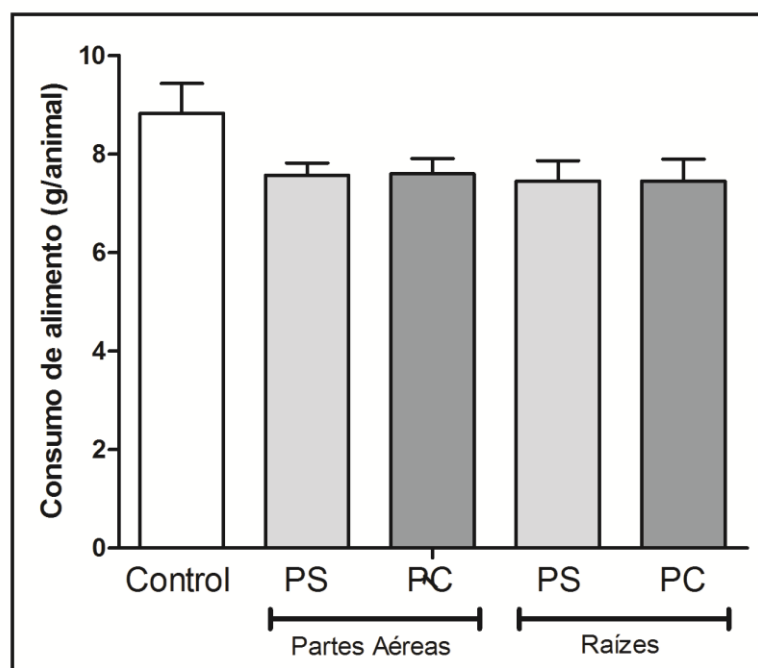


Figura 17 - Consumo de alimento avaliado durante 14 dias pelos grupos tratados com extratos de *P. alliacea* na dose de 5000 mg/kg.

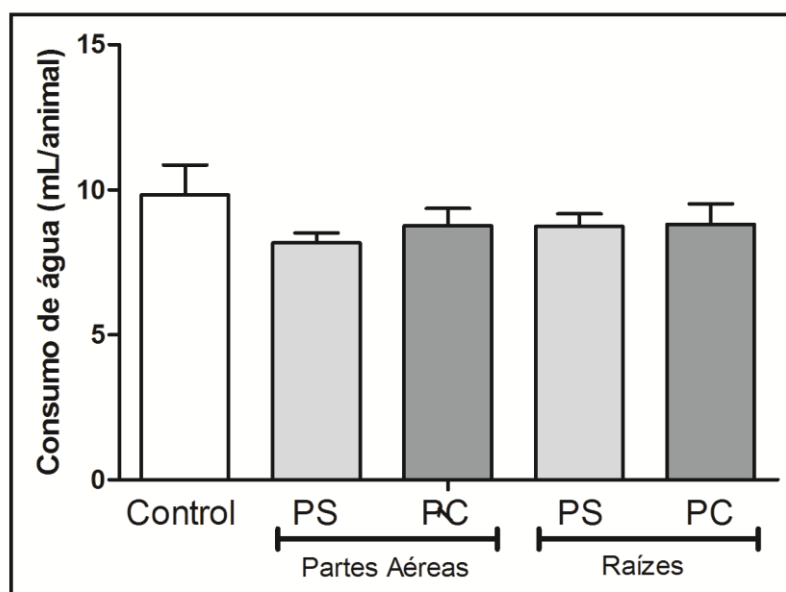


Figura 18 - Consumo de água avaliado durante 14 dias pelos grupos tratados com extratos de *P. allieacea* na dose de 5000 mg/kg.

Na avaliação anatomo-histopatológica, do ponto de vista macroscópico, os órgãos analisados (cérebro, coração, fígado, pulmões, baço, pâncreas e rins) não apresentaram quaisquer alterações anatômicas ou particularidades histológicas.

Não houve sinais de inflamação, necrose e alterações circulatórias no fígado. Os espaços portais, em geral pequenos e regularmente distribuídos, foram referenciais para visualização da arquitetura histológica lobular hepática. Nos animais controle, bem como nos demais grupos de animais submetidos ao tratamento agudo com dose de 5000 mg/kg do extrato das partes aéreas e raízes da espécie em estudo e diferentes períodos de coleta, foi observada discreta esteatose microvesicular, com pequenos vacúolos bem limitados e circunscritos no citoplasma dos hepatócitos. O processo predominou na região centrolobular e mediozonal do lóbulo hepático.

O estudo histológico dos pulmões revelou arquitetura lobular parenquimatosa preservada, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. Não foi evidenciado a presença de corpos estranhos, processos inflamatórios agudo ou crônico ou sinais da presença de líquido no interior dos alvéolos. A matriz septal escassa e laxa, eventualmente comportava capilares congestos, sem haver, contudo, sinais de hemorragia recente ou antiga.

Rins apresentando superfície externa envolvida por cápsula opalescente, que se destaca com facilidade do parênquima, secções seriadas, com limites córtico-medulares nítidos e perfeita visualização pirâmides e cálices renais. Arquitetura lobular e “população” glomerular preservadas. Não foram observadas lesões fibróticas, hemorrágicas ou áreas de infarto.

O coração apresentava-se recoberto por epicárdio fino, transparente e delicadamente vascularizado vasos da base proporcionais às dimensões do órgão e cavidades átrio-ventriculares revestidas por endocárdio liso e brilhantes sendo ora vazias, ora ocupadas por coágulos sanguíneos (alteração natural *post-mortem*).

Cérebro e cerebelo com estruturas celulares normais. Região do cárdia, com epitélio estratificado e porção glandular sem alterações na estrutura tecidual interior. Segmento do intestino delgado (íleo) estruturalmente normal. Presença discreta de gordura no mesentério. Finalmente, nenhum estigma de atipias celulares epiteliais ocorreu nas amostras analisadas.

6. DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

Não foram encontrados na literatura estudos utilizando o extrato bruto de *P. alliacea* L. contra fungos filamentosos, porém, Navarro Garcia et al. (2003), pesquisando extratos de outras plantas medicinais com atividade antifúngica contra várias espécies, dentre elas uma cepa de *A. niger* ATCC, consideraram ativos apenas os que obtiveram valores de CIM de 8 mg/mL ou menores, assim como o de Radojević et al. (2011) mostraram que os valores de CIM e CFM variaram entre 0,6 e 20 mg/mL e Ahmed et al. (2012) com resultados positivos contra *A. fumigatus* na dose de 2,5 mg/mL utilizando o extrato bruto de *Bauhinia bowkeri*.

De acordo com esses estudos, o extrato hidroalcoólico de *P. alliacea* apresentou boa atividade apenas contra *A. fumigatus*, a espécie que apresenta a maior taxa de infecção, com valor de CIM de 6,25 mg/mL para o RPC e 3,12 mg/mL para o RPS.

Para as outras espécies os valores de CIM variaram entre 12 e 50 mg/mL, podendo ser explicado devido ao tamanho dos conídios de *A. fumigatus*, que os são menores (cerca de 2 – 3 μ M) entre as espécies estudadas, ou a presença na sua superfície de estruturas dotadas de proteínas hidrofóbicas denominadas “rodlets” o que pode torná-los mais susceptíveis as substâncias presentes nos extratos e a outros fatores como a presença de rugosidades nos conídios de *A. flavus* que podem ter diminuído a interação das substâncias do extrato com a superfície dos mesmos (PASQUALOTTO, 2009).

Alguns critérios devem ser seguidos para evitar interpretações incorretas de dados a respeito de atividade antimicrobiana evitando o falso positivo ou concentrações elevadas demais para o consumo na terapia com extratos brutos ou compostos isolados, sendo as concentrações de 100 μ g/mL e 25 μ M, respectivamente, consideradas ótimas, porém deve ser levado em consideração o tipo de micro-organismo que está sendo testado (COS et al. 2006).

No caso de fungos filamentosos, a parede celular tanto do micélio quanto dos conídios é composta de diversos polissacarídeos, como Galactomanana, quitina e glucana, responsáveis por sua rigidez (BERNARD e LATGÉ, 2001) o que pode dificultar a ação de extratos e substâncias ativas em pequenas quantidades.

Utilizando-se o material pulverizado e o extrato bruto hidroalcoólico, realizou-se a prospecção fitoquímica a qual permitiu o conhecimento das principais classes

de substâncias naturais presentes no extrato. Esta avaliação é frequentemente usada para direcionar trabalhos posteriores de fracionamento e isolamento das substâncias ativas produzidas pelas espécies (MATOS, 1998).

Esta prospecção foi realizada tanto com o material pulverizado quanto para o extrato hidroalcoólico, para obtenção de informações acerca da capacidade extrativa deste solvente em relação a droga vegetal e não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos nos períodos de coleta.

Outros estudos mostram que algumas das classes químicas presentes nos extratos, podem estar relacionadas a atividade antifúngica, como as saponinas (TSUZUKI et al. 2007; TENÓRIO et al. 2010) pois nos estudos de Ekabo e Farnsworth (1996) foram isoladas 2 delas (Salzmannianosideos A e B) efetivas contra *A. fumigatus*.

Sua presença nos extratos de *P. alliacea* difere dos obtidos por Pilar et al. (2003) e está de acordo com os estudos de Alonso (1998) e Gomes (2006) a qual detectou a presença destes compostos em diversas frações do extrato das raízes de *P. alliacea*, caracterizada pela formação de espuma estável em tubo de ensaio por intermédio da agitação vigorosa do extrato diluído em água destilada, tal como na determinação do índice de espuma.

Em nossos resultados, ambas as partes da planta possuem saponinas, porém, como o extrato das partes aéreas não inibiu o crescimento de *A. fumigatus*, a atividade pode ser atribuída a outros metabólitos.

Os terpenos foram detectados apenas no extrato das raízes, podendo ser estes os responsáveis pela ação antifúngica dos extratos.

As sesquiterpenolactonas, também são conhecidas como metabólitos com elevada atividade antifúngica (WEDGE et al. 2000; ALVARENGA et al. 2009), e podem estar relacionadas aos resultados obtidos, pois nos estudos de Erasto et al. (2006), foram isolados o vernolidio e vernodalol, com potencial de inibição de 64% contra *A. flavus* e em menor grau (59%) contra *A. niger*.

Lipofilicidade tem sido sugerida como um fator que influencia a atividade fungicida de lactonas sesquiterpênicas e outras drogas fungicidas no qual um aumento da lipofilicidade aumenta a toxicidade dos compostos em fungos (BEEKMAN et al. 1997; BARRERO et al. 2000; WEDGE et al. 2000), principalmente devido as estruturas lipofílicas presentes na superfícies dos conídios de *A. fumigatus*, como citado anteriormente.

Dentre os terpenos presentes na constituição química de *P. alliacea*, já foram isolados das partes aéreas o α -Friedelinol, ácido barbinevico, illexgenina A, isoarborinol, palustrol (SEGELMAN e SEGELMAN, 1975; DE SOUSA et al., 1990; DELLE MONACHE e SUAREZ, 1996) e o borneol, carvacrol, eugenol, geraniol, fitol a partir das raízes (AYEDOUN et al. 1998; NEVES et al. 2011), sendo o borneol efetivo contra *A. niger* (TULLIO et al. 2007; CLAUSEN et al. 2010) e o eugenol e carvacrol com atividade antifúngica comprovada em *C. albicans* (CHAMI et al. 2004).

A presença de sesquiterpenolactonas no extrato de raízes está de acordo com estudo realizado por Pilar (2003), segundo Jaimes et al. (2006) estes metabólitos podem apresentar efeito citotóxico assim como os estudos de Buskuhl (2007), o qual isolou e avaliou o mecanismo de ação citotóxica *in vitro* de uma lactona sesquiterpênica do tipo hirsutinolídeo a partir da espécie *Vernonia scorpioides*, este resultado também foi observado nos estudos de Jovicevic et al. (1993) utilizando o extrato de *P. alliacea* L. demonstrando sua toxicidade frente a linhagens de células de leucemia e linfoma.

Além das grandes classes de substâncias, *P. alliacea* também possui estudos que comprovam a presença de compostos de enxofre o que justifica seu odor desagradável característico semelhante ao alho, e destes o primeiro isolado de raízes e caules foi o benzyl-2-hydroxy-5 ethyl trisulfide (VON SZCZEPANSKI et al. 1972), com destaque também para o trissulfeto de dibenzila (DTS) (WILLIAMS et al. 1997; JOHNSON et al. 1997; BEZERRA, 2006, ROSADO-AGUILAR et al. 2010).

Já foi comprovada a atividade antifúngica do DTS contra *C. cladosporioides* e *C. Sphaerospermum*, que também são fungos filamentosos (BENEVIDES et al. 2001), tal como o S-(2-hidroxietil) fenilmetanotiosulfinato e o S-benzil-fenilmetanotiosulfinato, também isolados das raízes de *P. alliacea*, foram efetivos contra *A. flavus* na dose de 0,032mg/mL (KIM et al. 2006).

Estes compostos são derivados dos sulfóxidos de cisteína e estão em maiores concentrações nas raízes do que nas folhas de *P. alliacea* na concentração de 3 mg/g e 0,08 mg/g, respectivamente (KIM et al. 2006), o que pode justificar os dados encontrados neste estudo, se relacionados aos compostos de enxofre.

O extrato etanólico 70% das folhas de *P. alliacea* possui atividade documentada contra fungos leveduriformes com valores de CIM e CFM de 0,25 mg/mL para *C. parapsilosis* e 0,76 mg/mL para *C. kefyr* e *C. albicans*, os quais relacionaram estes resultados ao maior teor de polifenóis e flavonoides totais (3,42 e

1,68 µg/mL, respectivamente) do extrato (GUEDES et al. 2009), porém, estes metabólitos não foram detectados em nenhum dos extratos testados.

Todos os resultados obtidos neste estudo indicaram maior atividade dos extratos hidroalcoólicos das raízes de *P. alliacea* contra *A. fumigatus*, apresentando valores de CIM e CFM entre 3,12 – 25 mg/mL considerando ambos os períodos, sendo menores do que os apresentados para as outras espécies, porém, estes valores encontram-se muito elevados para utilização destes extratos na prática clínica, sendo necessário outros estudos na busca pelos constituintes responsáveis pela atividade biológica para encontrar resultados positivos em menores concentrações.

Os parâmetros utilizados para o controle da qualidade de matérias-primas farmacêuticas são estabelecidos em testes contidos em documentos oficiais, como as Farmacopeias e Códigos Oficiais (FARIAS, 2007), dentre eles, os utilizados neste trabalho foram a análise granulométrica, perda por dessecação pelo método gravimétrico e por balança de infravermelho (Infratest), determinação de cinzas, pH, índice de espuma e teor de extrativos.

A análise granulométrica do pó obtido das partes aéreas de *P. alliacea* L. apresentou diâmetro médio (D50) de 0,275 e 0,253 mm no período chuvoso (PC) e seco (PS) respectivamente, já as raízes apresentaram D50 de 0,264 (PC) e 0,253 mm (PS), apresentando uma proximidade numérica, o que se explica devido à utilização de malha com mesma abertura nominal no processo de moagem, por este motivo, não foi aplicado o teste estatístico para este parâmetro. Segundo a literatura (LIST e SCHMIDT, 2000), a droga pulverizada que apresenta partículas de tamanho superior à classificação de fino é mais adequada para os processos de extração e quanto à classificação proposta pela Farmacopeia Brasileira (5ª ed.), os pós das partes aéreas e raízes de *P. alliacea* foram classificados como moderadamente grossos para ambos os períodos de coleta.

O grau de divisão dos pós interfere de modo significativo, porém não isoladamente, no rendimento e nos constituintes químicos que podem ser extraídos, representando uma influencia direta sobre a eficiência do processo extrativo, o que pode afetar na atividade biológica dos extratos, a exemplo do estudo de Gião et al. (2009) o qual analisou extratos provenientes de pós com diferentes granulometrias, observando diferenças significantes em relação ao poder antioxidante dos extratos, com a variação do tamanho de partícula e da superfície de contato para extração.

Outro estudo semelhante foi conduzido por Asep et al. (2008), que também avaliou a eficiência do processo extrativo em função do grau de divisão da droga vegetal, constatando que partículas de menor tamanho foram mais eficientes na extração.

A média dos resultados obtidos por gravimetria para as partes aéreas foram de 9,7% (PC) e 8,5% (PS) e das raízes foi de 8% (PC) e 8,1% (PS), enquanto os percentuais por INFRATEST foram 8,96% (PC) e 7,36% (PS) para as partes aéreas, e 7,5% (PC) e 7,2% (PS) para as raízes. Os resultados de gravimetria e Infratest foram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) entre os períodos para as partes aéreas, enquanto que para as raízes, não houve diferenças estatísticas.

A quantidade excessiva de água presente em drogas vegetais pode contribuir para a ocorrência de reações de hidrólise ou proliferação de microrganismos, por este motivo a Farmacopeia Brasileira (5ª ed) estabelece um limite para este parâmetro de até 14%, e sua determinação pode ser realizada através da perda por dessecação a qual se destina a quantificar as substâncias voláteis de qualquer natureza nas plantas, sendo que estas podem ser representadas somente por água ou não (BRASIL, 2010).

Todos os resultados estão dentro dos limites estabelecidos na Farmacopeia Brasileira; este parâmetro também é importante para que estes valores possam ser incluídos nos cálculos de rendimento em nível de produção industrial (POLITI, 2009).

Os resultados para as cinzas das partes aéreas de *P. alliacea* foram de 9,4% (PC) e 8,1% (PS), já para as raízes foram de 4,6% (PC) e 7,2% (PS), todos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), porém, as amostras não carbonizaram totalmente quando submetidas a temperatura máxima (600°C) descrita na metodologia farmacopéica, isto foi observado devido a coloração azul-esverdeada persistente mesmo após o tratamento com água preconizado nestes casos.

As cinzas, são definidas por Costa (1994) como o resíduo não volátil, isento de carbono que é resultante da combustão de substâncias orgânicas, provenientes de constituintes minerais da composição do vegetal, seu conteúdo constitui um índice individual para identificação e pureza, por este motivo, ao ultrapassar o limite estabelecido pode ser caracterizada fraude.

De acordo com Saiki et al. (*apud* Lopes-Martins et al. 2002) os componentes inorgânicos presentes na espécie *P. alliacea*, determinados por ativação de nêutrons

são alumínio, bromo, cobalto, ferro, potássio, manganês, magnésio, zinco, dentre outros.

O pH da água destilada utilizada no teste foi de 5,5, já o dos decoctos obtidos através do pó das partes aéreas e raízes de *P. alliacea* apresentaram caráter ácido, com valores médios de 6,1 e 5,7, para o período chuvoso, respectivamente e 5,7 e 5,6 para o período seco, o que pode ser devido a natureza química das substâncias presentes na espécie.

O valor do índice de espuma foi de 125 no período chuvoso e 142,82 no período seco para ambas as partes da planta. Segundo Costa (1994), o índice de espuma consiste na maior diluição do decocto preparado na técnica que, de acordo com as circunstâncias do ensaio, é capaz de formar um anel espumídico persistente de 1 cm de altura. O teste também infere ser a propriedade afrogênica, indicativa da presença, principalmente, de saponinas, ao qual conferem essa ação (BORELLA et al. 2006).

Os resultados dos testes de teor de extrativos foram de 15% para todas as amostras analisadas. Este parâmetro tem como objetivo de avaliar a quantidade de substâncias extraíveis em um determinado líquido extrator, empregou-se a decocção neste estudo e foi utilizado unicamente como auxiliar a caracterização físico-química pois trata-se de um parâmetro importante no controle de qualidade de matérias primas vegetais.

A diferença estatística observada nos parâmetros farmacognósticos tal como na composição fitoquímica da espécie entre os períodos pode ser devido a alguns fatores climáticos como a sazonalidade, disponibilidade hídrica, temperatura, radiação ultravioleta e disponibilidade de nutrientes a qual a planta é submetida durante seu cultivo (GOBBO NETO e LOPES, 2007).

Foi detectada a presença de açúcares redutores e alcaloides em ambas as partes da planta, no qual estes últimos estando de acordo com os estudos realizados por Alonso (1998).

Não foi observada a presença de taninos e flavonóides, no material de ambos os períodos tal como nos estudos realizados por Gomes (2006), não sendo corroborados com os estudos desenvolvidos por Guedes (2009), o qual quantificou os polifenóis e flavonóides totais do extrato hidroalcoólico 70% obtendo resultados de 3,42 e 1,68 µg/mL respectivamente. Fontoura et al. (2005), detectou no extrato etanólico taninos, cumarinas e esteroides.

Este resultado pode ser atribuído à técnica utilizada, pois por tratar-se de reações colorimétricas, a quantidade de clorofila observada, principalmente no extrato das partes aéreas, pode ter alterado a observação deste parâmetro, neste e em outros testes, como os de sesquiterpenolactonas e depsídios, os quais se mostraram positivos para o extrato das partes subterrâneas e negativos no extrato das partes aéreas.

A presença de alcaloides no extrato das raízes está de acordo com os resultados apresentados por Alonso (1998), mas não corroboram com os resultados encontrados por Gomes (2006) e Pilar et al. (2003). Os alcaloides estão relacionados a atividades amebicida, antimalárica, anticolinérgicas, anti-hipertensivas, antitumorais, antitussígena, hipnoanalgésica, depressora cardíaca, estimulante do SNC, diurética, tratamento da gota, miorelaxante, simpatomimética, antiviral, entre outras (SIMÕES, 2007), onde algumas dessas podem confirmar as alegações de uso de *P. alliacea* L.

Os foram resultados positivos para depsídeos e depsidonas, que são metabolitos que apresentam muitas atividades biológicas como antioxidantes, antitumorais, analgésicas e antipiréticas (HIDALGO et al. 1994).

A detecção de açúcares redutores consiste na oxidação de um grupo carbonila de um monossacarídeo a carboxila, após a reação com um íon, a exemplo do Cu^{2+} reduzindo-o a Cu^+ , este é caracterizado como açúcar redutor, sendo este princípio utilizado na determinação deste tipo de açúcar e é bastante utilizado no diagnóstico da diabetes para determinação dos níveis de glicose sanguíneos (DEMIATE et al. 2002), e sua produção por espécies botânicas está relacionado a mecanismos de proteção contra o estresse hídrico, e dentre estes, a produção destes metabólitos, alterando o potencial osmótico para maior captação de água (CHAVES FILHO e STACCIARINI-SERAPHIN, 2001).

Estudos para avaliação das propriedades biológicas de extratos vegetais são de extrema importância, porém, para avaliação da segurança de seu uso como medicamentos, a avaliação da toxicidade, estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos são indispensáveis para a garantia da eficácia do tratamento (LAPA et al. 2007).

De acordo com Gemtchújnicov (1976), *P. alliacea* é uma planta altamente tóxica e seus efeitos já eram conhecidos pelos escravos que a utilizavam para “amansar” os senhores. A toxicidade dos extratos desta espécie já foi vastamente

avaliada em diferentes modelos experimentais como nos estudos de Hoyos et al. (1992) que investigaram o potencial genotóxico sugerindo que esta possui efeitos mutagênicos e que sua administração em grande quantidade pode apresentar risco de saúde.

A avaliação da toxicidade *in vitro* é útil e necessária para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto causar alterações e morte celular, como consequências de dano das funções celulares básicas, além de apresentar boa reprodutibilidade, fácil execução, baixo custo relativo e reduzir o uso de animais utilizados nos testes de toxicidade (VALADARES, 2006), pois após comprovada a não toxicidade, a pesquisa poderá ter continuidade realizando-se os ensaios de toxicidade *in vivo* (ROGERO et al. 2003).

Os extratos nas doses utilizadas (100 – 1,56 mg/mL) não afetaram a viabilidade celular dos macrófagos, que mostrou-se próxima a 100%, porém foram ativos contra as células fúngicas, que também são eucarióticas, em muitas dessas concentrações, o que pode caracterizar alguma especificidade dos compostos de *P. alliacea* a algum componente específico das células fúngicas, como a parede celular.

O ensaio hipocrático utilizado forneceu informações gerais acerca da natureza da atividade dos extratos na dose de 5000 mg/Kg foi realizada de acordo com o descrito por Malone e Robichaud (1962) e Brito (1994) (Anexo 02, p. 108) e como não foram observadas mortes de animais durante o período de observação não se fez necessária a redução das doses, tal como descrito pelo protocolo 420 da OECD (2001), o qual classifica a toxicidade aguda dos extratos de grau 5, ou seja, de baixa toxicidade.

Estes resultados estão de acordo com os experimentos de Lima et al. (1991), os quais usaram doses de 8000 mg/kg do extrato aquoso das raízes e Fontoura et al. (2005) utilizando o extrato etanólico 95% das folhas nas doses de 500, 1000, 5000 e 10.000 mg/kg.

Em outro estudo, o extrato etanólico 70% das partes aéreas, administrado por via oral em camundongos, na dose de 3000 mg/kg também não produziu efeitos tóxicos (AUDI et al. 2001).

Garcia-Gonzáles et al. (2006), avaliaram o efeito do extrato aquoso a quente das folhas frescas de *P. alliacea*, por 18 dias na dose de 2000 mg/kg, e não

observaram mortes nem alterações na evolução ponderal dos animais, estando de acordo com o presente estudo.

Andrade et al. (2012) observaram, que após a exposição ao extrato nas doses de 2000 e 5000 mg/kg, camundongos fêmeas apresentaram letargia e sonolência em ambas as doses. Este foi o único estudo que utilizou o extrato da planta total e por este motivo, os efeitos podem ter sido decorrentes do sinergismo entre as substâncias presentes em sua composição.

Embora a maioria dos estudos realizados com *P. alliacea* apresentarem baixa toxicidade aguda, Nunes et al. (1983) relataram casos de ovelhas que desenvolveram sintomas de caquexia muscular distrófica após o consumo diário desta planta, esta doença é caracterizada por fraqueza, ataxia nos membros inferiores, desidratação e perda de peso, sendo recomendados estudos a partir da exposição crônica desta espécie para conhecimento de seu perfil tóxico.

7. CONCLUSÃO



7 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico 70% das partes aéreas de *P. alliacea* L. não inibiu o crescimento de *A. fumigatus* e não foi testado nas demais espécies de *Aspergillus*, entretanto o extrato das raízes de ambos os períodos apresentou atividade antifúngica contra *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*, porém, mesmo a primeira espécie sendo mais susceptível a ação dos extratos, as concentrações são elevadas para o consumo humano, recomendando-se o isolamento dos constituintes responsável pela atividade.

Os dados obtidos através da caracterização físico-química das partes aéreas e raízes de *P. alliacea* L. demonstram parâmetros que podem ser reprodutíveis através das metodologias empregadas visando o controle de qualidade da espécie contribuindo com dados que possam subsidiar a literatura acerca da espécie.

Não houve diferenças qualitativas nos resultados da prospecção fitoquímica realizada no pó e no extrato hidroalcoólico, nem entre os períodos de coleta, destacando a presença de saponinas, açúcares redutores, alcaloides em ambas as partes, e sesquiterpenolactonas e depsídeos/depsidonas apenas nas raízes.

Os extratos de ambos os períodos, não afetaram a viabilidade das células eucarióticas e os animais tratados com a dose aguda de 5000 mg/mL não apresentaram sinais de toxicidade nem danos em seus órgãos.

REFERÊNCIAS



REFERENCIAS

ADAMS, T.H; WIESER, J.K; YU, J.H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol Mol Biol Ver, Mar**;62(1):35-54, 1998.

ADUSUMILLI, P. S.; LEE, B.; PAREKH, K.; FARRELLY, P. A. *Acalculous eosinophilic cholecystitis* from herbal medicine: A review of adverse effects of herbal medicine in surgical patients. **Surgery** v. 131, p. 352-356, 2002.

AHMED, A.S; ELGORASHI, E.E; MOODLEY, N. MCGAWA, L.J; NAIDOO, V; ELOFF, J.N. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhea. **J Ethnopharmacol**. Oct 11;143(3):826-39, 2012.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 455-463, 2008.

ALONSO, J.R. **Tratado de fitomedicina**: bases clinicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Idiciones SRL, 1998. 987p.

ALVARENGA, E.S; BARBOSA, L.C.A.; SALIBA, W.A.; ARANTES, F.F.P.; DEMUNER, A.J.; SILVA, A.A. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de derivados da α -Santonina. **Quim. Nova**, Vol. 32, n. 2, p.401-406, 2009.

ALVARENGA, F.C.R.; GARCIA, E.F.; BASTOS,E.M.A.F.; GRANDI, T.S.M.; DUARTE. M.G.R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19(2A), p.442-448, Abr./Jun. 2009.

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

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA FILHO, A. J. The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice. **Revista Latino-americano de Enfermagem**, v.14(3), p.316-23, mai-jun. 2006.

AMAIKE, S; KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. **Annu. Rev. Phytopathol**. 49:107–33, 2011.

AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A. L.; PALOMARO, T. V.; JÚNIOR, N. L. B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.448-454. 2007.

ANDRADE, A. F.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica**. S. l.: s. n., 2001. 263p.

ANDRADE, T.M; MELO, A.S; DIAS, R.G; VARELA, E.L; OLIVEIRA, F.R; VIEIRA, J.L; ANDRADE, M.A; BAETAS, A.C; MONTEIRO, M.C; MAIA, C.S. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. **J Ethnopharmacol.** Sep 28;143(2):604-10, 2012.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2003.

ASEP, E.K.; JINAP, S.; TAN, T.J.; RUSSLY, A.R. HARCHARAN, S.; NAZIMAH, S.A.H. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. **Journal of Food Engineering**, v.85, p.450–458, 2008.

AUDI, E.A., CAMPOS, E.J.V., RUFINO, M., CORTEZ, D.G., BERSANI-AMADO, C.A., SOAREZ, L.A.L., PETROVICK, P.R., MELLO, J.C.P. *Petiveria alliacea* L.: plant drug quality control, hydroalcoholic extract standardization and pharmacological assay of lyophilized extract. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.20, p.225–232, 2001.

AYEDOUN, M.A.; MOUDACHIROU, M.; SOSSOU, P.V.; GARNEAU, F.-X.; GAGNON, H.; JEAN, F.-I. Volatile constituents of the root oil of *Petiveria alliacea* L. from Benin. **J. Essent. Oil Res**, v. 10, p. 645-646, 1998.

BACHA, W.J; WOOD, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. Ed. Lea e Febiger. 1990. 269p.

BAKER, S. E; *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology** Sep, 44, S17 – 21, 2006.

BARBOSA, D. L. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BARBOSA, W. L. R; PINTO, L. N.; SILVA, W. B.; FERNANDES, J. G. S.; SOLER, O. **ETNOFARMÁCIA – Fitoterapia Popular e Ciência Farmacêutica**; Belém,PA; NUMA/UFPA, 2009.

BARBOSA, W.L.R; QUIGNARD, E; TAVARES, I.C.C; PINTO, L.N; OLIVEIRA, F.Q, OLIVEIRA, R.M. Manual para Análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Rev. Científica da UFPA**, vol. 4, 2001.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H. DE. S.; MOURA, M.D; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J.; Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15. n.4. p.392-413, Out./Dez. 2005.

BARNES, P.D.; MARR, K.A.; *Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and Treatment*. **Infect Dis. Clin. N Am.** V.20, p.545–561, 2006.

BARRERO, A.F; OLTRA, J.E; ÁLVAREZ, M; RASLAN, D.S; SAÚDE, D.A; AKSSIRA, M. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. **Fitoterapia**. 71 60-64, 2000.

BARROSO, G.M. **sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1978. 255 p.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S. MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *In Vitro* E *In Vivo* Utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul/Dez, 2010.

BEEKMAN, A.C; WOERDENBAG, H.J; UDEN, W.V; PRAS, N; KONINGS, A.W.T; WIKSTROEM, H.V; SCHMIDT, T.J. Structure-cytotoxicity relationships of some helenanolide-type sesquiterpene lactones. **Journal of Natural Products**, vol. 60,252-257, 1997.

BENEVIDES,P.J.C, YOUNG, M.C.M; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N.F; BOLZANIC, V.S; Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L., **Phytochemistry**. v.57, p.743–747, 2001.

BERNARD, M; LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. **Med Mycol** 39 (1), 9-17, 2001.

BEZERRA, J.N.F. **Composição química, atividade fitonemática e inseticida de tipi (*Petiveria alliacea*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BLAINSKI, A.; PICCOLO, V.K. ; MELLO, J.C.P.; OLIVEIRA, R.M.W. Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.128. n.2, p.541-544. Mar, 2010.

BORELLA, J.C, DUARTE, D.P, NOVARETTI, A.A.G, MENEZES, J.R.A, FRANÇA, S.C, RUFATO, C.B, SANTOS, P.A.S, VENEZIANI, R.C.S, LOPES, N.P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC(Carqueja) e isolamento de flavona. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, n.4. out/dez, 2006.

BRAND, A. Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence. **International Journal of Microbiology**. v.2012, 11 p., 2012.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, v.1, 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução de Diretoria Colegiada nº 14, de 31 de Março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União 05.04.2010.

BRITO, A.S. **Manual de Ensaios Toxicológico *in vivo***. Campinas, SP: Editora UNICAP, 1994.

BUSKUH, H. **Avaliação *in vitro* do mecanismo de ação citotóxica de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS.** 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2007.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal. São Paulo: Argos, p. 317-346, 2001.

CAMARGO, M.T.L.A. Amansa Senhor: A arma dos negros contra seus senhores. **Revista Pós Ciências Sociais**. São Luís, v.4, n.8, jul./dez. 2007.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.58-65, 2000.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.314-319, 2008.

CATALÁN, M; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistêmicos farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.23, p.39-49, 2006.

CHAMI, N; CHAMI, F; BENNIS, S; TROUILLAS, J; REMMAL, A. Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 8(3):217-226, 2004.

CHAVES FILHO, J.T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Rev brasil. Bot.** São Paulo, v.24, n.2, p.199-204, jun. 2001.

CLARK, T. A; HAJJEH, R. A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. **Curr Opin Infect Dis** 15, 569–574, 2002.

CLAUSEN, C.A; WOODWARD, B.M; YANG, V.W. Antifungal Essential Oil Metabolites. **41 annual meeting Biarritz**, France, May, 2010.

COELHO, H.L. Farmacovigilância: um instrumento necessário. **Caderno de Saúde Pública**. v.14, p.871-875, 1998.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p.272-278, 2005.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. 707 p

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAESA, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **J. Ethnopharmacol.** v.106, p.290–302, 2006.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. v. III. 2 ed. Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981. 1262 p.

CRUZ-BARROS, M.A.V; CORRÊA, A.M.S; MAKINO-WATANABE, H.; Estudo Polínico das espécies de *Aquifoliaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lecythidaceae*, *Malvaceae*, *Phytolaccaceae* e *Portulacaceae* ocorrentes na restinga da ilha do cardoso (cananéia, sp, brasil). **Revista Brasil. Botânica**. v.29, n.1, p.145-162, jan/mar. 2006.

DE SOUSA, J. R.; DEMUNER, A. J.; PINHEIRO, J. A., Dibenzyl Trisulphide and Trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**. v.29, n.11, p.3653-3655, 1990.

DELAVEU, P; LALLOUTTE, P; TESSIER, A.M. Drogues végétales stimulant l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. **Planta Medica**, 1980.

DELLE MONACHE, F.; CUCS, S.; LUIS, E. 6-C-formyl and 6-C-hydroxymethyl flavonones from *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**. v.31, p.2481-2482, 1996.

DELLE MONACHE, F; MENICHINI, F; CUCA SUAREZ, L.E. *Petiveria alliacea*. Part 2. Further flavonoids and triterpenes. **Gazzetta Chimica Italiana** 126, 275–278, 1996.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 10.ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

DI STASI, L. C. (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar** Ed. Unesp, São Paulo, 1996.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª edição, revista e ampliada. Editora Unesp. 2002.

DI STASI, L.C; SANTOS, E.G; SANTOS, C.M; HIRUMA, A. **Plantas Medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989.

EKABO, O.A; FARNSWORTH, N.R. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmänniana*. **J Nat Prod** 59: 431–435, 1996.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. v.75, p.141-164, 2001.

ENOCH, D.A., LUDLAM, H.A.; BROWN, N.M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.809–818, 2006.

ERASTO, P; GRIERSON, D.S; AFOLAYAN, A.J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**, 106.117–120, 2006.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução a Análise Fitoquímica. , In: SIMÕES, C.M.O (org.). **Farmacognosia: da planta ao Medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. p.229- 246.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.3, jul./set., 2006.

FERREIRA, A.G., AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

FONSECA, F.N.; SILVA, A.H.; LEAL, L.K.A.M. *Justicia pectoralis* Jacq., *Acanthaceae*: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.20, n.6, p.871-877, Dez. 2010.

FONTAINE, T.; DELANGLE, A.L.; SIMENEL, C.; CODDEVILLE, B.; VLIET, S.J.; KOOYK, Y.; BOZZA, S. MORETTI, S.; SCHWARZ, F.; TRICHOT, C.; AEBI, M.; DELEPIERRE, M.; ELBIM, C.; ROMANI, L.; LATGE, J.P. Galactosaminogalactan, a New Immunosuppressive Polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog** v.7, n.11, 2011.

FONTOURA, M.C.P; SILVA, S. do N.; ABREU, I.C.; GONÇALVES, J.R. ; BORGES, M.O. BORGES, A.C.R; Efeitos da *Petiveria alliacea* L. na secreção e Motilidade Intestinal de Roedores, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7,n.2,p.37-43, Botucatu, 2005.

GALLO, M.; SARKAR, M.; AU, W.; PIETRZAK, K.; COMAS, B.; SMITH, M.; JAEGER, T.V.; EINARSON, A.R.N.; KOREN, G. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea: a prospective controlled study. **Archive Internal of Medicine**. v.160, p.3141-3143, 2000.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M, MORALES, T.C., OCAMPO, R. PAZOS, L.; Subchronic and acute preclinic toxicity and some pharmacological effects of the water extract from leaves of *Petiveria alliacea* (*Phytolaccaceae*). **Revista de Biología Tropical**. v.54, n.4, p.1323-1326, Dec. 2006.

GENTCHÚJNICOV, I.D. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico (agrícola, ornamentais e medicinais)**. Agronômica Ceres: São Paulo, 1976.

GHIO, A.J; PETERSEIM, D.S; ROGGLI, V.L; PIANTADOSI, C.A. Pulmonary oxalate deposition associated with *Aspergillus niger* infection. An oxidant hypothesis of toxicity. **Am Rev Respir Dis**. 145:1499–1502, 1992.

GIÃO, M.S.; PEREIRA, C.I.; FONSECA, S.C.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. **Food Chemistry**. v. 117, n.3, p.412-416, Dec. 2009.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GOLDSTEIN, E. G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Revista Ambiente**, v.2, n.2, p.33-38, 1988.

GOMES, P.B. **Avaliação dos Efeitos centrais e antinociceptivos das frações isoladas da raiz de *Petiveria alliacea* L. em camundongos**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Departamento de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

GOMES, P.B.; OLIVEIRA, M.M.S.; NOGUEIRA, C.R.A. NORONHA, E.C. CARNEIRO, L.M.V.; BEZERRA, J.N.S.; NETO, M.A.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Study of Antinociceptive Effect of Isolated Fractions from *Petiveria alliacea* L. (tipi) in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.28, n.1, p.42-46, 2005.

GREENE, R. The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. **Medical Mycology Supplement**. v.43, 2005.

GUEDES, R.C.M.; NOGUEIRA, N.G.P, FUSCO-ALMEIDA, A.M, SOUZA, C.R.F OLIVEIRA, W.P. Atividade Antimicrobiana de Extratos Brutos de *Petiveria alliacea* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.4, p.520-524, 2009.

GUIMARÃES, J.; MEDEIROS, J.C.; VIEIRA, L.A. **Programa fitoterápico farmácia viva no SUS-Betim, Minas Gerais**. Divulgação em Saúde Pública para Debate 36: 41-47, 2006.

GUPTA, A. K., RYDER, J. E., CHOW, M., COOPER, E. A. Dermatophytosis: The Management of Fungal Infections. **Skinmed**. v.4, n.5, p.305-310, 2005.

HAIDUVEN, D. Nosocomial aspergillosis and building construction. **Med. Mycol.** v.25, p.1-7, 2009.

HAINER, B.L. Dermatophyte infections. **Am Fam Physician**. v.67, p.101–108, 2003.

HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. **Biocycle, Emmaus**, v.6, p.32-35, 1995.

HAY, R.J. Fungal infections. **Clin. Dermatol**. v.24, p.201–212, 2006.

HAZEN, K.C. New and emerging pathogen yeasts. **Clin Microbiol Rev**. v.8, p.462-47, 1995.

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C. Warn, P.A.; Bowyer, P.; Denning, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**. v.153, p.1677–1692, 2007.

HIDALGO, M. E.; FERNANDES, E.; GUILHOT, W.; LISSI, E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, n.6, p.1585- 1587, 1994.

HOMAR, J.C. Medicinas complementarias o alternativas? Um dilema para el sistema público. **Atención Primaria**. v.35, p.389-391, 2005.

HOYOS, L.S. AU, W.W; HEO, M.Y; MORRIS, D.L; LEGATOR, M.S. Evaluation of the genotoxic effects of a folk medicine, *Petiveria alliacea* (Anamu). **Mutation Research** 280, 29–34, 1992.

JAIMES, G.; CASTRO, C.; ARISTIZABA, F. A.; MURCIA, T. R.; TORRENEGRA, R.; ALFONSO, A. N. T. Principio activo citotoxico de *Espelectia killippi* Cuatr. sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.2, p.140-145, Abril/junho 2006.

JOHNSON, L.; WILLIAMS, L.A.D.; ROBERTS, E.V. An Insecticidal and Acaricidal Polysulfide Metabolite from the Roots of *Petiveria alliacea*. **Pestic.Sci.**, v.50, p. 228-232, 1997.

JOLY, A.B.; **Botânica – Introdução A Taxonomia Vegetal**. 13ª Edição. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 2002.

JOVICEVIC, L.; TROIANI, M.P.; CAPEZZONE DE JOANNON, A.; SASO, L.; MAZZANTI, G.; ROSSI, V.; *In vitro* antiproliferative activity of *Petiveria alliacea* L. on several tumor cell lines. **Pharmacological Research**, v.27, n.1, p.105-106, 1993.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F. ; DONOGAHUE, M.J. **Plant Systematic: a phylogenetic approach**. 2 ed., New York, Sinauer, 2002. 576p.

KAUFFMAN, C.A. Fungal Infections. **Proc Am Thorac Soc**. Vol 3. pp 35–40, 2006.

KIM, S; KUBEC, R; MUSAH, A. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.188–192, 2006.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Mol. Plant Pathol**. 8:713–22, 2007.

KRADIN, R.L; MARK, E.J. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* sp. **Arch Pathol Lab Med**. Apr;132(4):606-14, 2008.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E.K.; CHANDRASEKAR, P.H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**, v.52, n.3, p. 206–222, May, 2009.

KUBEC, R., MUSAH, R.A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry** v.58, p.981–985, 2001.

KUBEC, R., MUSAH, R.A. C-Glutamyl dipeptides in *Petiveria alliacea*. **Phytochemistry**. v.66, p.2494–2497, 2005.

KUBEC, R.; KIM, S. MUSAH, A.; The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*, **Phytochemistry** v.63, p.37–40, 2003.

KURREIN, F; GREE, G; ROWLES, S. Localized deposition of calcium oxalate around a pulmonary *Aspergillus niger* fungus ball. **Am J Clin Pathol**. 1975;64:556–563.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, M.T.R. LIMA-LANDMAN, GODINHO, R.O, NOGUEIRA, T.C.M.L. Toxicologia de plantas medicinais. In: SIMOES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. 6ª ed. Florianópolis: UFSC, Porto Alegre: UFRGS; p. 247-262, 2007.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, p.310–350, april, 1999.

LATGÉ, J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.8, Aug, 2001.

LEÃO, R.C; MARCHIORI, E; RODRIGUES, R; SOUZA JR, A.S; GASPARETTO, E.L; ESCUISSATO, D.L. Tomografia computadorizada na avaliação da aspergilose pulmonar angioinvasiva em pacientes com leucemia aguda. **Radiol Bras.** vol.39 no.5 São Paulo Sept./Oct, 2006.

LIMA, T.C.M.; MORATO, G.S.; TAKAHASHI, R.N.; Evaluation of Antinociceptive effect of *Petiveria alliacea* (Guiné) in Animals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, sup.II, p.153-158, 1991.

LIONAKIS M.S.; LEWIS, L. E; TORRES, H.A.; ALBERT, N.D.; RAADA, I.I.; KONTOYIANNIS, D.P. Increased frequency of non-fumigatus *Aspergillus* species in amphotericin B- or triazole-pre-exposed cancer patients with positive cultures for aspergilli. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 52, p. 15–20, 2005.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC Press, 2000.

LOPES-MARTINS, R. A. B.; PEGORARO, D.H.; WOISKY, R.; PENNA, S.C.; SERTIÉ, J.A.A. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (*Phytolaccaceae*). **Phytomedicine**. v.9, p.245–248, 2002.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivos de plantas arbóreas do Brasil. 2ª Ed. São Paulo: Nova Odessa. 2002.

LOWE H.; PAYNE-JACKSON A.; BECKSTORM-STERMBERG S. M.; DUKE J. Jamaica's Ethno-Medicine. Its Potential In The Healthcare System. **Pelican Kingston**, Jamaica, p. 58–60, 2001.

LOYOLA, A.B.A.T. Avaliação da suscetibilidade de *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.* a antifúngicos por microdiluição em caldo e sistema de monitorização de crescimento de hifas. São Paulo: FCM , 2006.

LUENGAS-CAICEDO, P.E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante**. 2005. 292f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v.25, N.3, p.429-438, 2002.

MAIA, C. S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C. & PONTES FILHO, N. T. Analysis of fetal and placental development in rats after administration of hydroalcoholic extract from the root of *Petiveria alliacea* L. (*Phytolaccaceae*). **International Journal of Morphology**. v.28, n.1, p.165-169, 2010.

MALONE, M.H; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug material. **Lloydia** 25: 320-32, 1962.

MARCHIORETTO, M.S. A Família Phytolaccaceae no Rio Grande Do Sul. **Pesquisa Botânica**, v.40, n.5, p.67, 1989.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol.** v.32, n.5, p.449-460, 2006.

MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.31, p.193–197, 2008.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: Sistema de utilização de plantas medicinais projeto para pequenas comunidades**, 3ª ed., Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1998.

MELO, J.G. **Controle de qualidade e prioridades de conservação de plantas medicinais comercializadas no Brasil**. 2007. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

MING, L. C., et al.. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**, Botucatu, UNESP, v. 1, v. 2, 1998.

MONTEIRO, M.C; DE LA CRUZ, M; CANTIZANI, J; MORENO, C; TORMO, J.R; MELLADO, E; DE LUCAS, J.R; ASENSIO, F; VALIANTE, V; BRAKHAGE, A.A; LATGÉ, J.P; GENILLOU, O; VICENTE, F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. **J Biomol Screen.** Apr;17(4):542-9, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

NAKAGAWA, Y; SHIMAZU, K.; EBIHARA, M.; NAKAGAWA, K. *Aspergillus niger* pneumonia with fatal pulmonary oxalosis. **Journal of Infection and Chemotherapy** Vol 5, Num 2, 97-100, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. Document M38-A.** Wayne, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001.

NAVARRO GARCÍA, V.M; GONZALEZ, A; FUENTES, M; AVILES, M; RIOS, M.Y; ZEPEDA, G; ROJAS, M.G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 87, 85–88, 2003.

NEVES, I.A; CÂMARA, C.A.G; OLIVEIRA, J.C.S; ALMEIDA, A.V. Acaricidal activity and essential oil composition of *Petiveria alliacea* L. from Pernambuco (northeast Brazil). **Journal of Essential Oil Research** 23, 23–26, 2011.

NEVES, P.C.P; BAUERMANN, S.G; BITENCOURT, A.L.V; SOUZA, P.A; MARCHIORETTO, M.S; BORDIGNON, S.A.L; MAUHS, J.; Palinoflora Do Estado Do Rio Grande Do Sul, Brasil: *Phytolaccaceae*. **Revista Brasileira de Paleontologia.** v.9, n.1, p.157-164, Janeiro/Abril. 2006.

NISHIYAMA, Y., HASUMI, Y., UEDA, K., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, Y. Effects of micafungin on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Electron Microscopy**. v.54, n.1, p.67–77, 2005.

NOGUEIRA, J.H.C. **Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina**. Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação. São Paulo, 2009.

NUÑEZ, B.; VANEGAS, D.; TORRES, G. Caquexia muscular distrófica y su relación clínico patológica com neurotoxicidad retardada. **Revista ICA, Santá Fé de Bogotá, Colombia**, v. 28, n. 4, p. 345-353, 1983

OKADA, Y; TANAKA,K; SATOC, E.; OKAJIMA, H.; Antioxidant activity of the new thiosulfinate derivative, S-benzyl phenylmethane thiosulfinate, from *Petiveria alliacea* L. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v.6, p.1097–1102, 2008.

OLIVEIRA, E.; BIANCHI, P.G.; FONSECA, L.A.M.; FRANÇA, A.T.; KALIL, J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis diagnosis remains a challenge. **Respiratory Medicine**. v.101, p.2352–2357, 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure**. Guidelines for the Test of Chemicals, OECD 420. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. 14 p.

ORMOND, W.T.; PINHEIRO, M.C.B. Contribuição ao estudo biosistemático e ecológico de *Petiveria alliacea* L. **Revista Brasileira de Biologia**. v.34, n.1, p.123-143, 1974.

PASQUALOTTO, A. C. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. **Medical Mycology**, 47, Sup.1, 261-270, 2009.

PAULA, J.A.M.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – *Myrtaceae*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, n.2, p.265-278, Abr./Jun. 2008.

PAULO, P.T.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS,I.A.; MORAIS,L.C.S.L.; ANDRADE,F.B.; SANTOS, H.B. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.19, p.68-76, Jan./Mar. 2009.

PECKOLT, T. B.D. **Deutsch. Pharmazeut.Gesellsch.** 119 p., 1900.

PEIXINHO, P; SABINO, T; DUARTE,T; CRUZ, T; BRAGANCA, N. Invasive pulmonary aspergillosis. **Acta Med Port** .16(2): 97-9, 2003.

PELISSARI, G.P. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melanpodium divaricatum* (Rich. In**

Pers.) DC (Asteraceae). 2008. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

PFALLER, M.A.; PAPPAS, P.G.; WINGARD, J.R. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. **Clinical Infectious Diseases.** v.43, p.3–14, 2006.

PILAR, M. M. M.; BARRERA, N. B.; OBREGÓN, M. S.; GUZMÁN, D. N. Estudio farmacognóstico, fitoquímico y microbiológico de la *Petiveria alliacea* Lin. **Gaceta Médica Espirituana.** v.5, n.1, 2003.

POLITI, F.A.S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *endopleura uchi* (huber) cuatrec. (humiriaceae).** 144f. 2006. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2009.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca.** 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

RADOJEVIĆ, I.D; STANKOVIĆ, M.S; STEFANOVIĆ, O.D; TOPUZOVIĆ, M.D; ČOMIĆ, L.R; OSTOJIĆ, A.M. Anti-Aspergillus properties of different extracts from selected plants. **African Journal of Microbiology Research.** Vol. 5(23), p. 3986-3990, Oct. 2011.

RAHMAN, S.Z.; SINGHAL, K.C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports** 17. January Supplement. 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon.** v.39, p.603–613, 2001.

RHODES, J.C. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. **Medical Mycology,** v.44, Sep. 2006.

ROCHA, L.D; MARANHO, L.T.; PREUSSLER, K.H. Organização Estrutural do Caule e Lâmina Foliar de *Petiveria alliacea* L., *Phytolaccaceae*. **Revista Brasileira de Farmácia.** v.87, n.3, p.98-101, 2006.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** 93f. 2006. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, 2006.

RODRIGUES, H.J.B; SÁ, L.D.A; RUIVO, M.L.P; COSTA, A.C.L; SILVA, R.B; MOURA, Q.L; MELLO, I.F. variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida. **Revista Brasileira de Meteorologia,** v.26, n.4, 629 - 638, 2011.

ROEHRL, M.H.A; CROFT, W.J; LIAO, Q; WANG, J.Y; KRADIN, R.L; Hemorrhagic pulmonary oxalosis secondary to a noninvasive *Aspergillus niger* fungus ball. **Virchows Arch.** 2007;451:1067–1073.

ROGERO, S.O; LUGÃO, A.B; IKEDA, T.I; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** 6(3):317-20, 2003.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

ROSADO-AGUILAR, J.A; AGUILAR-CABALLERO, A; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I; BORGES-ARGAEZ, R; GARCIA-VAZQUEZ, Z; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology* 168, 299–303, 2010.

SABLE, C. A., STROHMAIER, K. M., CHODAKEWITZ, J. A. Advances in Antifungal Therapy. **Annu. Rev. Med.** v.59, p.361–379, 2008.

SALES, M.P.U. Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. **J Bras Pneumol.** ;35(12):1238-1244, 2009.

SANTOS FILHO, L. **História da medicina no Brasil (do século XVI ao século XIX)**. São Paulo: Brasiliense, 1947.

SARTOI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmella brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. 81f. 2005. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. **Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**, tradução Glenda Souza, São Paulo, Manole, 2002.

SEGAL, B.H; WALSH, T.J. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. **Am J Respir Crit Care Med**; 173: 707-717, 2006.

SEGELMAN, F.P; SEGELMAN, A.B. Constituents of *Petiveria alliacea*. Phytolaccaceae. Part I. Isolation of isoarborinol, isoarborinol acetate and isoarborinol cinamate for the leaves. **Lloydia** 8, 537, 1975.

SHALE, T.L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.67, p.347-354, 1999.

SHINOBU-MESQUITA, C.S.; BERTONI, T.A.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of the extract of *Curcuma zedoaria* against yeasts of the genus *Candida* isolated from the oral cavity of patients infected with the human

immunodeficiency virus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.21, n.1, p.128-132, Jan./Feb. 2011.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171-190, 1999.

SILVA, F.M. **Potencial Antifúngico De Extratos De Plantas Medicinais Do Cerrado Brasileiro**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Ciências Médicas, Brasília, 2008.

SILVA, M.I.G. **Utilização de Fitoterápicos nas Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF) no Município de Maracanaú-CE**. Fortaleza, 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará. 2003.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, p.455-462. 2006.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 6ª Ed. Porto Alegre, Ed. UFRGS, 2007.

SOUBANI, A.O.; CHANDRASEKAR, P.H. The Clinical Spectrum of Pulmonary Aspergillosis. **Chest**. v.121, p.1988-1999, 2002.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157f. Dissertação (Mestrado em tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

TENORIO, R.; TERRAZAS, E.; ALVAREZ, M.T.; VILA, J.L.; MOLLINEDO, P. Concentrados de Saponina de *Chenopodium Quinoa* y de *Caiphora andina*: Alternativas como Biocontroladores de hongos fitopatógenos. **Revista boliviana de química**. v.27, n.1, 2010.

TRABULSI, L.R.; ALTATHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p. 421-422, 1999.

TROPICOS. Disponível em <http://www.tropicos.org/Name/24800061>. Acesso em 16 de Março de 2012.

TSUZUKI, J.K; SVIDZINSKI, T.I.E; SHINOBU, C.S; SILVA, L.F.A; RODRIGUES-FILHO, E; CORTEZ, D.A.G; FERREIRA, I.C.P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 79(4): 577–583, 2007.

TULLIO, V; NOSTRO, A; MANDRAS, N; DUGO, P; BANCHE, G; CANNATELLI, M.A; CUFFINI, A.M; ALONZO, V; CARLONE, V.A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of Applied Microbiology**. 102, 1544–1550, 2007.

TUROLLA, M. S. R; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 2, p. 289 – 306, 2006.

UCSF – University of California, San Francisco. Department of Laboratory Medicine. Morphology of Medically Important Fungi, San Francisco, 2000. Disponível em: http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung_morph/homepage1.html. Acesso em: 18 de outubro de 2012.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, F.; *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells; **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, p.60, 2008.

VALADARES, M.C; Avaliação da toxicidade aguda: Estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.27, n.1, p.1-7, 2006.

VARGAS NETO, P. **Ação Antifúngica de Plantas Medicinais e da Própolis Frente a Leveduras do Gênero *Candida* Isoladas da Cavidade Bucal**. Dissertação (Mestrado em Odontologia). UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA. PONTA GROSSA, 98f., 2004.

VEIGA JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: cura segura?. **Quim. Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.464-471, 2008.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C.M.O (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, P.75-90, 2007.

VON SZCZEPANSKI, C., ZGORZELAK, P., HOYER, G.A., Isolation, structural analysis and synthesis of an antimicrobial substance from *Petiveria alliacea* L. **Arzneimittelforschung** 22, 1975–1976.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza: Acribia, 228p, 1995.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Jpn. J. Med. Mycol.**, v.48, p.1-12, 2007.

WEDGE, D.E; GALINDO, J.C.G; MACIAS, F.A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. **Phytochemistry** 53, 747–757, 2000.

WHO. **Traditional medicine and modern health care-Progress report by Director- General. Forty fourth world health assembly**. 22 March, 1991.

WILLIAMS, L.A.D.; ROSNER, H.; LEVY, H.G.; BARTON, E.N.; A Critical Review of the Therapeutic Potential of Dibenzyl Trisulphide Isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu); **West Indian Medical Journal**. v.56, n.1, p.17, 2007.

WILSON, L.S.; REYES, C.M.; STOLPMAN, M. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Val Health** ; 1:26-34, 2002.

XAVIER, M.O.; SALES, M.P.U.; CAMARGO, J.J.P.; PASQUALOTTO, A.C.; SEVERO, L.C. *Aspergillus niger* causing tracheobronchitis and invasive pulmonary aspergillosis in a lung transplant recipient: case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(2):200-201, mar-abr, 2008.

XIMENES, S.C.C. **Ensaio toxicológico pré-clínico com extrato bruto seco das folhas de *Petiveria alliacea* L.** 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

ZMEILI, O.S.; SOUBANI, A.O. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. **Q J Med**. v.100, p.317–334, 2007.

ANEXO 01: Parecer do comitê de ética

Parecer de Aprovação Nº 056/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - Nº 0050/2009

Ananindeua/PA, 11 de dezembro de 2009.

1. Projeto: “Efeitos de espécies amazônicas sobre o sistema nervoso central: análises comportamentais, fitoquímicas e antioxidantes”.

Pesquisador Responsável: MARCIENE ATAIDE DE ANDRADE

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

ANEXO 02 – Tabela de ensaio hipocrático (BRITO, 1994)

[illegible]