



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

NAILA FERREIRA DA CRUZ

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Malpighia glabra* Linn. EM AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

NAILA FERREIRA DA CRUZ

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Malpighia glabra* Linn. EM AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

ORIENTADOR: Dr. CLAUDIO GUEDES SALGADO

CO-ORIENTADOR: Dr. MOISES BATISTA DA SILVA

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Cruz, Naila Ferreira da

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da *Malpighia glabra* Linn. em agentes da cromblastomicose / Naila Ferreira da Cruz ; Orientador, Claudio Guedes Salgado ; Co-orientador, Moises Batista da Silva. - 2017.

48 f.: il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Antimicóticos - pesquisa. 2. Malpigiaceae – uso terapêutico. 3. Acerola – uso terapêutico. 4. Quercetina. I. Salgado, Claudio Guedes, orientador. II. Silva, Moises Batista da, co-orientador. III. Título.

CDD – 22 ed. 616.969

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

NAILA FERREIRA DA CRUZ

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Malpighia glabra* Linn. EM AGENTES DA CROMOBLASTOMICOSE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

Instituto de Ciências Biológicas – UFPa

Banca examinadora:

Prof^a Dr. Daniella Paternostro de Araújo

Faculdade Integrada Brasil Amazônia

Prof^a Dr. Patrícia Fagundes da Costa

Universidade Federal do Pará

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda graça recebida.

Aos meus pais, Manoel Cruz e Eloiza Cruz, pela, confiança, incentivo e amor; por acreditarem e me apoiarem nos meus sonhos, pela educação que me proporcionaram, pelo exemplo de perseverança e conquista, e pelo carinho que sempre me ofereceram mesmo estando longe.

Às minhas irmãs, Alana e Aline, pelo afeto, apoio, amor e por toda alegria de sermos irmãs e a certeza de poder contar sempre e para tudo. A toda a minha família (Cruz e Ferreira), em especial a tia Francisca pela moradia e incentivo.

Ao Prof. Dr. Claudio Salgado, pelos ensinamentos, direcionamento científico, oportunidades e incentivo durante esse tempo de orientação e ao co-orientador Prof. Dr Moises Silva, pela primeira oportunidade, pelos ensinamentos, conselhos, pela “paciência”, inspiração e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Dermato-Imunologia (LDI): Angélica, Ana Caroline, Raquel (as pós-graduandas- pelo apoio e contribuições), a Erika, Gisele, Marcos, André, Rafael e Seu Raimundinho.

As amigas de todas as horas, as amigas de bancada e da vida: Sâmela e Aline.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

Agradeço também a Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr Marcello Candia e aos pacientes que colaboraram gentilmente para a realização deste projeto.

Às instituições: Universidade Federal do Pará (UFPA), ao programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular (PNBC) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional e financeiro, respectivamente.

RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose por implantação, crônica, de distribuição cosmopolita, causada por fungos melanizados. Após implantação transcutânea, os propágulos dos agentes da CBM apresentam uma plasticidade celular e morfológica única, ocorrendo a diferenciação celular, resultando nas células muriformes. O tratamento dessa micose é um desafio pela ausência de um antifúngico padrão. Vários métodos de terapia são utilizados (físicos e farmacológicos), isoladamente ou associados, no entanto, com pouco sucesso de cura clínica. A região amazônica tem uma vasta biodiversidade de vegetais que precisam ser melhor caracterizados quanto à sua composição química e aplicabilidade no tratamento de diferentes doenças. Nessa variedade de plantas, o fruto da *Malpighia glabra* Linn. (acerola) apresenta um alto teor de vitamina C, apresentando também vitaminas do complexo B, A, antocianinas e flavonoides, que destacam-se por apresentarem diferentes ações biológicas e terapêuticas já demonstradas tanto em *in vitro* quanto *in vivo*. Um grande interesse está atualmente centrado nas atividades biológicas de um destes flavonoides, a quercetina, pois exerce múltiplas atividades farmacológicas, apresentando propriedades biológicas únicas que podem melhorar o desempenho mental e/ou físico, e reduzir o risco de diferentes infecções. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato da *M. glabra* em conídios e nas células muriformes de cepas de *Fonsecaea spp.* O extrato da *M. glabra* apresentou atividade antifúngica tanto em conídios quanto em células muriformes das cepas avaliadas. Além do extrato bruto, os conídios de diferentes cepas também foram sensíveis a diferentes diluições do extrato. Foram avaliadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). A média geométrica da CIM da quercetina para os conídios foi de 4,75 µg/mL e a média geométrica da CFM foi de 11,31 µg/mL, isso sugere que a quercetina apresenta ação fungistática. São necessários mais estudos para que futuramente a *M. glabra* ou a quercetina, isolada ou associada com outro componente isolado do extrato, possa ser usada para o tratamento da CBM.

Palavras-chave: Cromoblastomicose, *Malpighia glabra*, Quercetina.

ABSTRACT

Chromoblastomycosis (CBM) is a mycosis by implantation, chronic, with a cosmopolitan distribution, caused by melanized fungi. After transcutaneous implantation, the propagules of the CBM agents present a unique cellular and morphological plasticity. The cellular differentiation results in the appearance of muriform cells. The treatment of this mycosis is a challenge due to the absence of a standard antifungal, resulting in several therapy methods (physical and pharmacological), used isolated or associated, with little clinical cure success. Amazon region has a vast biodiversity of vegetables that need to be better characterized as to their chemical composition and applicability in the treatment of different diseases. In this variety of plants, the fruit of *Malpighia glabra* Linn. (acerola) has a high content of vitamin C, also presenting vitamins of the complex B, A, anthocyanins and flavonoids, which stand out for having different biological and therapeutic actions already demonstrated both *in vitro* and *in vivo*. A major interest is currently focused on the biological activities of quercetin, belonging to the class of flavonoids, as it exerts multiple pharmacological activities, presenting unique biological properties that can improve mental and/or physical performance and reduce the risk of different infections. This study aims to evaluate the *in vitro* antifungal activity of *M. glabra* extract in conidia and muriform cells of *Fonsecaea spp.* The extract of *M. glabra* presented antifungal activity in both, conidia and muriform cells, of the evaluated strains. Much interest is now centered on biological activities of the flavonoid quercetin. In addition to the crude extract, the conidia of different strains were also sensitive to different dilutions of the extract. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) were evaluated. The geometric mean of the quercetin MIC for the conidia was 4.75 µg/mL and the geometric mean of the CFM was 11.31 µg/mL. Further study is needed so that *M. glabra* or quercetin, isolated or associated with another isolated component of the extract, may be used for the treatment of CBM in the future.

Key words: Chromoblastomycosis, *Malpighia glabra*, Quercetin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diferentes formas clínicas presente nos pacientes de cromoblastomicose.
- Figura 2:** Aspectos morfológicos das células muriformes.
- Figura 3:** Principais agentes etiológicos da cromoblastomicose.
- Figura 4:** Aspectos botânicos da *Malpighia glabra*.
- Figura 5:** Inibição dos conídios de cepa de fungo causador de cromoblastomicose frente ao extrato de acerola.
- Figura 6:** Cepa de *C. albicans* em interação como extrato de *M. glabra*.
- Figura 7:** Avaliação do pH em diferentes cepas causadoras da cromoblastomicose e da *C. albicans*.
- Figura 8:** Avaliação de diferentes meios para verificar a influência do pH no conídios da cepa 06
- Figura 9:** Concentração fungicida mínima das diferentes diluições do extrato.
- Figura 10:** Dados clínicos e laboratoriais da cepa 06
- Figura 11:** Comparação da densidade óptica dos conídios em relação as diferentes concentrações do extrato da acerola.
- Figura 12:** Avaliação da concentração fungicida mínima da quercetina.
- Figura 13:** Ação da quercetina em diferentes cepas de *Fonsecaea* spp. e da cepa de *C. albicans*.
- Figura 14:** Avaliação da atividade do extrato da acerola em células muriformes.
- Figura 15:** Células muriformes (cepa 04) em interação com diferentes concentrações de quercetina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MICOSES POR IMPLANTAÇÃO	1
1.2. CROMOBLASTOMICOSE	1
1.3. EPIDEMIOLOGIA	2
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO	4
1.5. AGENTES ETIOLÓGICOS	6
1.6. TRATAMENTO.....	8
1.7. FITOTERÁPICOS.....	10
1.8. <i>Malpighia glabra</i> Linn. (ACEROLA).....	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVOS GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. AMOSTRAS FÚNGICAS.....	16
3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO FRUTO	17
3.3. PREPARAÇÃO DA QUERCETINA.....	17
3.4. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS	17
3.5. INDUÇÃO DE CÉLULAS MURIFORMES <i>in vitro</i>	18
3.6. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	18
3.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	19
3.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	19
3.9. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA	20
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. ATIVIDADE <i>in vitro</i> DO EXTRATO EM CONÍDIOS DE CEPAS de <i>Fonsecaea spp.</i>	21
4.2. INFLUÊNCIA DO pH NA VIABILIDADE CELULAR DOS CONÍDIOS	23
4.3. AÇÃO <i>in vitro</i> DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO EM CONÍDIOS DAS CEPAS DE <i>Fonsecaea spp.</i>	25
4.4. ATIVIDADE <i>in vitro</i> DA QUERCETINA EM CONÍDIOS DAS CEPAS DE <i>Fonsecaea spp.</i>	29
4.5. AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA AÇÃO DO EXTRATO E DA QUERCETINA EM CÉLULAS MURIFORMES	32
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. MICOSES POR IMPLANTAÇÃO

As micoses por implantação, também classificadas como "micoses subcutâneas", se referem a um grupo diverso de doenças fúngicas heterogêneas nas quais o modo de infecção compreende vários tipos de traumatismo transcutâneo, com maior incidência na América Latina, outras áreas tropicais e subtropicais (QUEIROZ-TELLES et al., 2003). Embora essas infecções raramente causem doenças disseminadas ou invasivas, elas geram um impacto importante na saúde pública, pelo tratamento difícil e frequentemente refratários (LUPU; TYRING; MCGINNIS, 2005).

A lista de micoses de implantação inclui infecções globais como feohifomicose (PHM) e entomofotoromicose, micoses endêmicas como esporotricose, eumicetoma, lacaziose (lobomicose) e cromoblastomicose (CBM) (QUEIROZ-TELLES et al., 2011). Também conhecida como cromomicose, a CBM é uma das infecções fúngicas de implantação mais prevalentes, sendo a mais comum das doenças causadas por fungos melanizados (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Os fungos melanizados denominados também de fungos demáceos, dematiáceos ou simplesmente "fungos negros" (FADER; MCGINNIS, 1988; REVANKAR; SUTTON, 2010) recebem essa classificação pois apresentam pigmentos melânicos como moléculas estruturais da parede celular, o que os caracteriza por apresentarem pigmentação, castanha, olivácea ou negra (DE HOOG et al., 2000).

1.2. CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose (CBM) é uma micose crônica de aspecto polimórfico, que acomete a pele e o tecido subcutâneo, causada por uma variedade de fungos dematiáceos ou melanizados (BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; MATTE et al., 1997). A CBM é observada principalmente em pessoas que vivem em zonas tropicais e subtropicais ao redor do planeta (BURSTEIN, 2004; MCGINNIS, 1983).

A infecção geralmente ocorre após traumatismo da pele e inoculação percutânea de propágulos fúngicos (fragmentos de hifas, conídios e de células

conidiogênicas) (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). Geralmente os pacientes não se recordam dos traumas ou injúrias na pele, uma vez que as manifestações da doença ocorrem algum tempo após a exposição ocupacional (SALGADO et al., 2004). O período médio de incubação para o desenvolvimento da CBM ainda não é conhecido, embora na maioria dos casos a progressão da doença é lenta podendo levar anos ou até mesmo décadas para se estabelecer (BANSAL; PRABHAKAR, 1989; LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007).

A virulência, viabilidade e quantidade de inóculo do parasita, além de fatores relacionados ao hospedeiro como idade e condições imunológicas são determinantes do curso da infecção. Os mecanismos de defesa influenciam no surgimento e na severidade das infecções fúngicas, assim como a forma clínica da doença depende da resposta imune do hospedeiro (GIMENES et al., 2006; ROMANI, 2011).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

A CBM apresenta distribuição cosmopolita com maior incidência nas regiões tropicais e subtropicais de clima quente e úmido (MCGINNIS, 1983). A maioria dos casos reportados da doença ocorrem na África (Madagascar e África do Sul) (Esterre et al. 1996a) e na América Latina (México, América Central, Brasil e Venezuela) (BONIFAZ; SAU, 2001; FAZIOLI, 1985; MINOTTO et al., 2001; PÉREZ-BLANCO et al., 2006; QUEIROZ-TELLES et al., 2003; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998). Existem registros da doença também em países da Ásia (Índia, China, Japão e Malásia) e Austrália (ATTAPATTU, 1997; LESLIE; BEARDMORE, 1979; RAJENDRAN et al., 1997). Casos raros de pacientes com CBM são observados no norte da Europa e nos EUA (Martínez and Tovar 2007a; Queiroz-Telles et al. 2009).

As taxas de incidência variam de 1:6.800 (14/100.000) em Madagáscar a 1:8.625.000 (0,012/100.000) nos EUA (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). No Brasil, estudos realizados no Maranhão, Rio Grande do Sul e na Amazônia mostram que estas áreas podem ser consideradas endêmicas da doença (MARQUES et al., 2006; MINOTTO et al., 2001; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998). Destacando o Estado do Pará como a principal área endêmica do País com 325 casos registrados

em 55 anos. Sendo assim a Amazônia é considerada a principal área de ocorrência da doença, pois as condições climáticas, incluindo precipitação anual média de 1500-1700 mm³, temperatura média de 28°C e umidade anual relativa de aproximadamente 83% parecem contribuir, decisivamente, para o crescimento do fungo em condições ambientais (MARQUES et al., 2006).

A maioria dos pacientes estão na faixa etária entre 40 a 50 anos, ocorrendo raramente na adolescência, embora a CBM não seja frequente em crianças, Pérez-Blanco et al, entre os anos de 1992 a 2004, relataram 22 casos (com idades entre 2 e 19 anos) dessa infecção no estado semi-árido de Falcón, Venezuela (PÉREZ-BLANCO et al., 2006). A CBM ocorre predominantemente em homens (78 a 82 % dos paciente) (MINOTTO et al., 2001). A diferença relacionada à distribuição de sexo em pacientes com CBM pode estar relacionada à proteção hormonal, como observado para pacientes com paracoccidiodomicose (SHANKAR et al., 2011). Nessa micose sistêmica, sugere-se que as mulheres são protegidas das manifestações clínicas pelo "estradiol", enquanto que na CBM a proteção hormonal pode estar relacionada à progesterona (RESTREPO et al., 1984; SHANKAR et al., 2011).

A maioria das lesões são observadas nos membros inferiores de trabalhadores rurais. Pés, joelhos, pernas e mãos são os locais mais comuns, mas também foram relatadas infecções de outras regiões, como o tronco, nariz, orelhas, pálpebras, ombros e nádegas (ESTERRE; ANDRIANTSIMAHAVANDY; RAHARISOLO, 1997; GARNICA; NUCCI; QUEIROZ-TELLES, 2009; LONDERO; RAMOS, 1976; QUEIROZ-TELLES et al., 2003). É considerada uma patologia ocupacional, afetando trabalhadores agrícolas, jardineiros, lenhadores, vendedores de produtos agrícolas e outros trabalhadores expostos a solos e materiais vegetais contaminados (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2009, 2011; SHI; LEI, 1986). Os principais fatores de risco associados à infecção por CBM são: não utilização de sapatos, luvas ou vestuários de proteção, má nutrição e hábitos de higiene (MINOTTO et al., 2001; QUEIROZ-TELLES et al., 2009, 2011) .

1.4. ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO

A lesão inicial geralmente é única e unilateral, cujo aspecto inicial pode ser papular, nodular ou verrucoso, com verrugas planas ou crostosas que podem ulcerar. As pápulas aumentam gradualmente ao longo de algumas semanas ou meses e podem apresentar uma superfície escamosa. Com o tempo, a lesão inicial pode evoluir para vários tipos de lesões cutâneas levando a uma aparência clínica polimórfica (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). O prurido é um sintoma importante da doença, e geralmente é hipótese de conduzir à disseminação por autoinoculação e propagação adjacente (BAYLES, 1995). Disseminação linfática para sítios afastados também foi relatado em um pequeno número de casos (OGAWA et al., 2003; TAKASE; BABA; UYENO, 1988). Para melhor descrever os aspectos clínicos, várias classificações foram propostas por muitos autores (CARRIÓN, 1942; PARDO-CASTELLO; RIO LEON; TRESPALACIOS, 1942).

Entre estes, a classificação introduzida por Carrión em 1950, caracterizou cinco tipos diferentes: Nodular, tumoral, verrucosa, placa e cicatricial (CARRIÓN, 1942). Posteriormente, alguns pesquisadores passaram a classificar as lesões de acordo com o grau de severidade: formas leves, moderadas e severas, baseadas na extensão da área atingida, número de lesões, presença de complicações e resposta ao tratamento (QUEIROZ-TELLES et al., 1992). Em 2005, Salgado et al. descreveram um novo tipo clínico, cromoblastomicose cutânea difusa (SALGADO et al., 2005), caracterizadas por lesões nodulares-verrucosas com distribuição difusa na pele, semelhante ao quadro clínico de outras doenças infecciosas, como leishmaniose cutânea difusa e hanseníase virchowiana (CONVIT; REYES; KERDEL, 1957). Em 2008, esse mesmo grupo, relatou três casos de uma forma clínica classificada em cromoblastomicose cutânea localizada anular (SALGADO et al., 2009). Sendo assim, Leão et al fizeram uma nova classificação, dividindo em cromoblastomicose cutânea localizada (anular, em placa e nodular) e cromoblastomicose cutânea difusa (LEÃO et al., 2013) (figura 1).

Inicialmente, as lesões CBM são oligossintomáticas, não interferindo nas atividades do paciente. Em formas moderadas, dor local e prurido intenso predominam como sintomas. Com o tempo à medida que a gravidade aumenta, o edema e infecções bacterianas secundárias podem trazer significantes limitação às

atividades trabalhistas. Nos casos mais severos, desenvolvem-se linfedema e anquilose crônicas e podem surgir carcinomas de células escamosas não-invasivas (ESTERRE et al., 1999; FOSTER; HARRIS, 1987). Todas essas complicações podem levar o indivíduo a uma incapacidade definitiva (BONIFAZ; CARRASCO-GERARD; SAÚL, 2001; MCGINNIS, 1983; QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

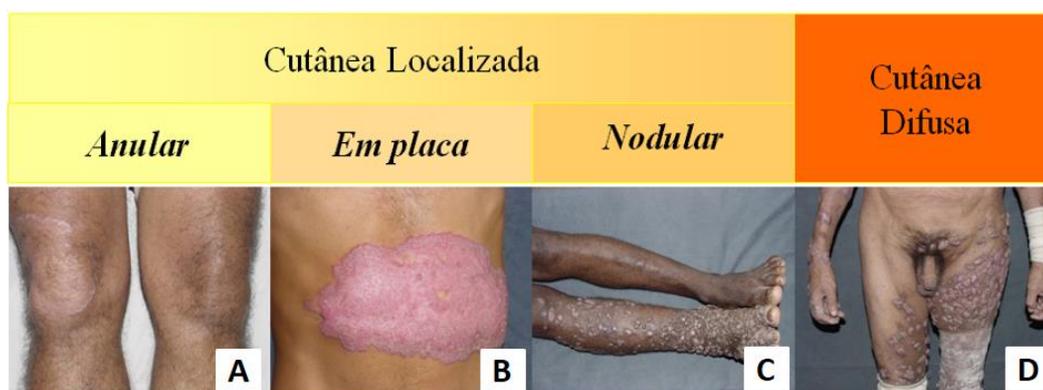


Figura 1: **Diferentes formas clínicas presente nos pacientes de cromoblastomicose.** Cutânea localizada anular (A), em placa (B), nodular (C) e cutânea difusa (D) (Fonte: Leão, R.N.Q. Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia. Ed. Samauma. 2013)

Para diagnóstico é realizado o raspado da lesão, o material biológico é tratado com 20-40% KOH, utilizando a microscopia direta, visualizamos os agentes micóticos que morfológicamente são células leveduriformes, acastanhadas, de parede celular espessa, podendo ser observadas isoladas ou formando uma agregação de 2 a 4 células fúngicas com septação transversal e longitudinal patognomônicas da CBM, independentes das espécies causadoras (A, B, C, D e E da figura 02). Estas células são conhecidas como células muriformes ou células escleróticas. Associado a esse exame, podem ser utilizados para a confirmação do diagnóstico: a cultura em meio Micosel (BD®), exames histopatológicos de fragmento do tecido lesionado (F e G da figura 02), que também tem valor para a avaliação do curso da doença (QUEIROZ-TELLES et al., 2009).

As lesões de CBM são clinicamente polimórficas e são comumente diagnosticadas erroneamente como várias outras doenças infecciosas e não infecciosas. Em casos avançados, esta doença pode levar a uma incapacidade para o trabalho devido a sequelas fibróticas e uma série de complicações clínicas e, se não for diagnosticada numa fase precoce, esta doença pode se tornar refratária à

terapia (QUEIROZ-TELLES et al., 2009; QUEIROZ-TELLES; DE C L SANTOS, 2013).

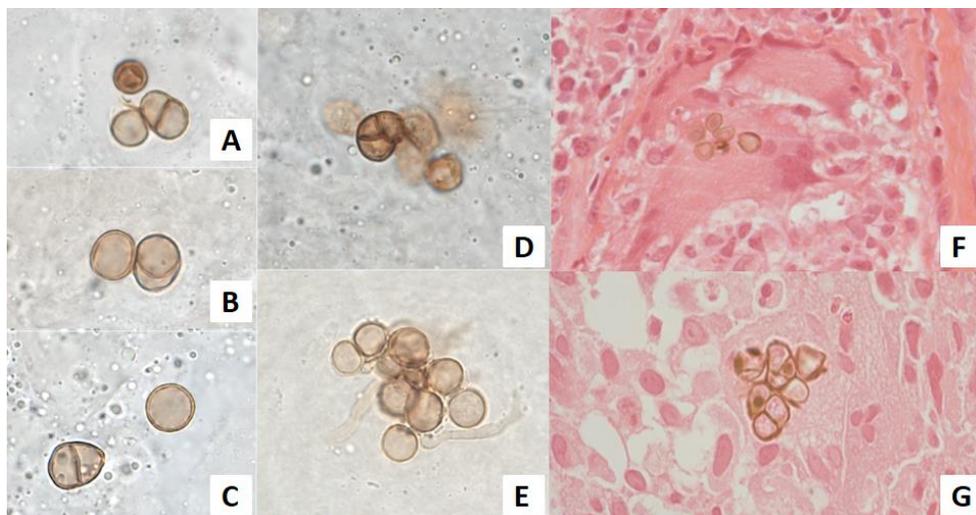


Figura 2: **Aspectos morfológicos das células muriformes.** Presença de células muriformes presentes no exame micológico direto (A, B, C, D e E) e no exame histopatológico (F e G), coloração hematoxilina-eosina. (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia).

1.5. AGENTES ETIOLÓGICOS

Os agentes etiológicos da CBM pertencem principalmente ao gênero *Fonsecaea* e *Cladophialophora*. Outros casos dispersos foram relatados tendo como agentes etiológicos fungos dos gêneros *Phialophora*, *Rhinocladiella* e *Exophiala* (ESTERRE; ANDRIANTSIMAHAVANDY; RAHARISOLO, 1997; RIVITTI; AOKI, 1999). Os agentes mais comuns são *F. pedrosoi* e *C. carrionii*, sendo geralmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais, ambos são fungos melanizados pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* na ordem *Chaetothyriales* (AMEEN, 2010; DE HOOG et al., 2007). No entanto, infecções por *F. pedrosoi*, que constituem a maioria dos casos da doença no Brasil e no mundo (70-90%), ocorrem mais frequentemente em regiões de clima úmido. Por outro lado, *C. carrionii* é prevalente em climas semiáridos. Isolados com menor frequência, outros agentes da CBM são: *Phialophora verrucosa*, *Exophiala dermatitidis*, *Rhinocladiella aquaspersa* (PEREZ-BLANCO et al., 1998) e *Fonsecaea monophora*, entre outros (ESTERRE et al., 1996; FADER; MCGINNIS, 1988; QUEIROZ-TELLES, 2015; SILVA; DE SOUZA; ROZENTAL, 1998).

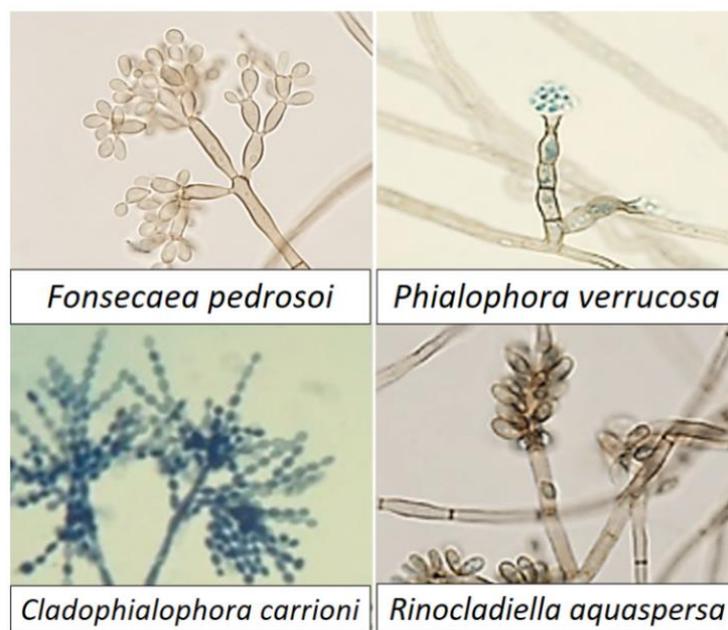


Figura 3: **Principais agentes etiológicos da cromoblastomicose.** (Fonte: Laboratório de Dermatologia)

A CBM está fortemente associado às atividades agrícolas, durante as atividades de trabalho, os indivíduos que vivem em áreas endêmicas, são provavelmente infectados por diversos traumas relacionados com materiais ambientais (farpas de madeira, gravetos e espinhos de plantas vivas ou mortas) (SALGADO et al., 2004; SILVA et al., 1995). Formas arredondadas, similares a corpos escleróticos, também foram verificadas em tecido medular vegetal e espinhos, sendo indicativo da existência *in natura* de estruturas fúngicas pré-adaptadas ao parasitismo (NAJAFZADEH et al., 2010), o *F. pedrosoi* tem sido isolado do coco Babaçu (*Orbignyaphalerata*), no Estado do Maranhão (MARQUES et al., 2006b), e nos espinhos da *Mimosa pudica*, conhecida popularmente como dormideira ou maria-fecha-a-porta (SALGADO et al., 2004). Rubin et al. e Zeppenfeldt et al. Relataram a identificação de *Cladophialophora* em plantas de cactus (RUBIN et al., 1991; ZEPPENFELDT; RICHARD-YEGRES; YEGRES, 1994), mas de Hoog et al. mostrou que este era um irmão molecular, *Cladophialophora yegresii* (DE HOOG et al., 2007).

1.6. TRATAMENTO

Várias estratégias terapêuticas têm sido utilizadas para o tratamento da CBM, pois até o momento não existe um tratamento padronizado para esta doença (TORRES-GUERRERO et al., 2012), representando assim um desafio, uma vez que, várias formas de intervenções são relatadas na literatura. A terapia é longa e sujeita a recidivas, e dependendo da situação clínica e da extensão das lesões, os procedimentos terapêuticos podem variar (FERREIRA; CARDOSO, 2006; TORRES-GUERRERO et al., 2012). O sucesso terapêutico depende de outros fatores tais como: tipo de lesão, adesão ao tratamento, estado de saúde do paciente, diversidade dos agentes etiológicos e a sensibilidade aos fármacos (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004; LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; QUEIROZ-TELLES et al., 1992)

Entre os métodos terapêuticos utilizados destaca-se: farmacoterapia, terapias físicas e combinação de ambas. Quanto aos métodos físicos, incluem a termoterapia, crioterapia e a terapia fotodinâmica, podendo ainda ser utilizadas cirurgias convencionais ou a laser, indicadas em casos de lesões iniciais ou de pequena extensão (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004). Tanto o método físico quanto a terapia fotodinâmica, associados aos antifúngicos sistêmicos podem contribuir mais efetivamente para a redução do tempo de tratamento, a terapia fotodinâmica também tem demonstrado bons resultados (LYON et al., 2011).

A terapêutica baseada em antifúngicos sistêmicos é realizada principalmente com o itraconazol, utilizado em concentrações que variam entre 100 e 400 mg/dia ou em pulsoterapia (UNGPAKORN; REANGCHAINAM, 2006). O itraconazol, derivado triazólico de primeira geração, com ação fungistática atua na inibição do sistema do citocromo P-450, responsável pela 14-desmetilação do lanosterol, precursor do ergosterol, um componente vital da membrana celular do fungo (SAAG; DISMUKES, 1988). Deste modo, o medicamento prejudica a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e conduz ao acúmulo de lanosterol e 14-alfa-metilesteróis, os quais podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema do transporte de elétrons, inibindo, conseqüentemente, o crescimento dos fungos (DE BEULE, 1996;

KOKS et al., 2002), geralmente considerado a primeira opção no tratamento da CBM, devido aos excelentes resultados obtidos com esse fármaco nos tratamentos de diferentes aspectos clínicos (leve, moderada e severa) da doença (QUEIROZ-TELLES et al., 1992). Alguns resultados favoráveis com o uso de itraconazol foram obtidos no tratamento da cromoblastomicose causada por *F. pedrosoi* (QUEIROZ-TELLES et al., 1992).

Associações terapêuticas têm apresentado bons resultados, como por exemplo, os sinergismos entre itraconazol e terbinafina, 5-fluorocitocina e itraconazol (BONIFAZ; PAREDES-SOLÍS; SAÚL, 2004). anfotericina-B e 5-fluorocitosina, 5-fluorocitosina e itraconazol, terbinafina e voriconazol e anfotericina B e terbinafina (DABOIT et al., 2013; POIRRIEZ et al., 2000). A associação de antifúngicos tem o objetivo de reduzir o aparecimento de isolados resistentes, diminuir a toxicidade relacionada às doses individuais e aumentar a eficácia em infecções mistas. Embora a avaliação de interações entre antifúngicos *in vitro* ainda necessite de mais detalhamento na padronização (RYDER; LEITNER, 2001; ZHANG et al., 2009).

Sabe-se que a diversidade dos agentes etiológicos pode influenciar diretamente a suscetibilidade às drogas, com altas variações entre diferentes cepas analisadas (ANDRADE et al., 2004), demonstrando a necessidade de estudos que avaliem a sensibilidade aos fármacos antifúngicos, o que pode servir como parâmetro para ajustes de doses e mudanças no esquema terapêutico, resultando em maior eficiência na evolução clínica.

O tratamento convencional para as doenças fúngicas é muito limitado, particularmente devido ao espectro limitado dos antifúngicos atuais, e por conta do alto custo do tratamento, ainda mais quando se necessita de um uso mais prolongado. Esses fatores vêm encorajar a adoção de novas terapêuticas, dentre elas, o uso mais extenso de produtos naturais (SILVA et al. 2008).

1.7. FITOTERÁPICOS

Em 1978, a Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos. No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos remonta de 1981 por meio da Portaria n.º 212, que define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica e, 1982, o Ministério da Saúde (PPPM/Ceme) lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos para obter o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais (“Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira”, 2011).

De acordo com Sixel e Pecinalli (2005), a seleção de plantas para pesquisa farmacológica pode ser planejada baseando-se em um reestudo da planta, levando-se em consideração algumas propriedades farmacológicas já descritas em literatura, no levantamento ecológico, no “screening” farmacológico e nos critérios quimiotaxonômicos através do conhecimento da estrutura química de um determinado princípio ativo encontrado em uma espécie vegetal e que seja responsável por suas atividades farmacológicas; bem como a seleção por meio de investigações etnofarmacológicas (SIXEL; PECINALLI, 2005)

Fitomedicamentos são produtos terapêuticos feitos a partir de vegetais (plantas medicinais), extratos integrais ou concentrados de princípios ativos vegetais. Eles estão disponíveis em forma sólida e líquida. Entre as formas farmacêuticas temos os sucos de plantas (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002). Os extratos são preparações de consistência líquida, viscosa ou na forma de pó, geralmente feitas a partir de partes secas de plantas (da droga vegetal) por maceração ou percolação. Relativamente, poucos produtos fitoterápicos são fabricados a partir de sucos frescos das plantas ou de destilados (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

As plantas produzem diversos compostos orgânicos que são chamados de metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2002). Sendo os compostos fenólicos metabólitos secundários das plantas, eles apresentam uma grande diversidade de estruturas, que diferem entre si, em termos de estrutura química, complexidade e

reatividade (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Os flavonoides são compostos polifenólicos acumulados em plantas superiores. Fazendo parte da nossa nutrição, principalmente sob a forma de vegetais, frutas, e chá - assim como de plantas medicinais usadas em fitomedicamentos. Os flavonoides podem ser classificados em flavonóis (tais como quercetina, kaempferol, isoquercetina, etc., encontrados em cebolas, maçãs, bagas, couve, alho-poró, brócolis, mirtilos, vinho tinto e chá), flavonas (como glicosídeos de luteolina, crisina e apigenina), isoflavonas (como a genisteína, a daidzeína e a glicetina presentes em leguminosas, principalmente soja e derivados), flavanonas (como naringenina, eriodictilol e hesperidina, excluindo citrinos), flavanóis (epicatequina, a catequina, a galocatequina, a epigalocatequina, o galato de epigalocatequina e também as formas poliméricas ou os taninos condensados encontrados no cacau e no chá), e antocianidinas (tais como pelargonidina, cianidina e malvidina, encontradas em vinho tinto e frutas de bagas) (PÉREZ-CANO; CASTELL, 2016).

Quimicamente, os flavonoides têm uma estrutura polifenólica que lhes confere atividades antioxidantes, propriedades reconhecidas há mais de 40 anos (KÜHNAU, 1976). Porém, as atividades biológicas dos flavonoides vão além das propriedades antioxidantes, embora algumas estejam relacionadas. Alguns tipos particulares de flavonoides têm mostrado efeitos protetores contra o câncer (FANTINI et al., 2015; FARZAEI; BAHRAMSOLTANI; RAHIMI, 2016), doenças cardiovasculares (EL HAOUARI; ROSADO, 2016; GRASSI et al., 2015), alterações gastrointestinais (JAIN, 2015) e síndromes relacionadas ao sistema nervoso, como depressão (GUAN; LIU, 2016), epilepsia (DINIZ et al., 2015; SUCHER; CARLES, 2015), doença de Alzheimer (SPINELLO et al., 2016) e doença neurodegenerativa (BELL et al., 2015), entre outras condições patológicas.

Dentre os flavanoides, a quercetina (C₁₅H₁₀O₇), que está presente em chá, vinho tinto, frutas e os vegetais, sendo considerados assim as principais fontes dietéticas de quercetina em populações ocidentais (BOHM et al., 1998; RADTKE; LINSEISEN; WOLFRAM, 1998), exerce múltiplas atividades farmacológicas (SKIBOLA; SMITH, 2000). Tem propriedades biológicas únicas que pode melhorar o desempenho mental/físico e reduzir o risco de infecção (DAVIS; MURPHY; CARMICHAEL, 2009), supõe-se que estes efeitos protetores e potencialmente curativos derivam da atividade antioxidante e eliminação de radicais livres que a

quercetina mostra em experimentos *in vitro* (MIDLETON; KANDASWAMI. 1993). como outros flavonóides antioxidantes similares, a quercetina é eliminador de radicais livres excepcional (BORS; MICHEL; SARAN, 1994) e dessa característica surge a habilidade da quercetina para eliminar espécies altamente reativas como o peroxinitrito e o radical hidroxilo; por esta razão, sugere-se que a quercetina esteja envolvida em efeitos benéficos imagináveis para a saúde (D'ANDREA, 2015). Li et al. Relatam os efeitos e os mecanismos da quercetina sobre a inflamação e a função imunológica *in vitro*, *in vivo* e em estudos clínicos (LI et al., 2016).

Estudos mostram que o consumo da quercetina pode estar associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, desenvolvimento de tumores, derrames cerebrais e doenças neurodegenerativas (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; RATNAM et al., 2006) que são justificados pela proteção contra danos oxidativos ao DNA (FAROMBI, 2006), peroxidação lipídica (LIMA; FERNANDES-FERREIRA; PEREIRA-WILSON, 2006) e inibição da liberação de mediadores da inflamação (CHO et al., 2003; MAMANI-MATSUDA et al., 2006). Embora possua diversos efeitos benéficos à saúde humana, a quercetina demonstra atividades citotóxica (SOARES; VARANDA; RADDI, 2006) e mutagênica (GASPAR et al., 1994)

1.8. *Malpighia glabra* Linn. (ACEROLA)

A acerola ou cereja das Antilhas (*Malpighia glabra*) da família das Malpighiaceas, gênero *Malpighia*, é uma planta frutífera, originárias das Antilhas, norte das América do Sul e América central (MARINO NETTO, 1986) foi introduzida no Brasil na década de 50, devido à sua boa adaptação ao solo e ao clima (MARINO NETTO, 1986; MATSUURA et al., 2001).

De acordo com a descrição de Araújo e Minami (1994), a aceroleira é uma planta arbustiva de hábito de crescimento que varia de prostrado a ereto, com copa aberta ou compacta, que pode chegar a 2,5 - 3,0 m de altura, quando adulta. A casca do caule e dos ramos é levemente rugosa. As folhas são simples, inteiras, opostas, de pedolo curto e forma que varia de oval a elíptica. As flores, dispostas em pequenos cachos pedunculados, surgem na axila das folhas de ramos novos ou em esporões laterais após surtos de crescimento vegetativo, a coloração varia, entre

genótipos, de branca a diferentes tonalidades de rosa (ARAÚJO, MINAMI, 1994.) . É uma fruta, carnosa, variando na forma, tamanho e peso. Nela, o epicarpo (casca) é uma película fina; o mesocarpo (polpa) é carnoso e suculento e o endocarpo é constituído por três caroços unidos, que dão ao fruto o aspecto trilobado. (GOMES; PERECIN; MARTINS, 2000). O mesocarpo ou polpa representa 70% a 80% do peso total do fruto (MAIA et al., 2007).



Figura 4: Aspectos botânicos da *Malpighia glabra* Linn.. Flores (A e B) e fruto maduro (C).

A acerola é considerada uma excelente fonte de vitamina C (ácido ascórbico), além de ser uma fonte razoável de pró-vitamina A. Também contém vitaminas do complexo B como tiamina (B1), riboflavina (B2) e niacina (B3), e minerais como cálcio (Ca), ferro (Fe) e fósforo (P), embora os teores sejam baixos (GOMES et al., 2001). O consumo de 2 a 4 unidades da fruta é capaz de atender as necessidades médias de vitamina C de um adulto saudável (GONSALVES, 2001; MARINO NETTO, 1986).

O teor de vitamina C e outras características atribuídas a qualidade da acerola, tais como coloração, peso e tamanho dos frutos, teor dos sólidos solúveis e pH do suco, além de serem afetadas pela desuniformidade genética dos pomares, sofrem influência de vários outros fatores, como precipitações pluviométricas, temperatura,

altitude, adubação, irrigação e a ocorrência de pragas e doenças (NOGUEIRA; MORAES; BURITY, 2000).

Este fruto é fonte de antocianinas (MUSSEER et al., 2004) e de carotenoides (LIMA et al., 2005), compostos que exercem efeitos benéficos à saúde humana uma vez que possuem reconhecida ação antioxidante (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003; KRINSKY, 1989). Além da propriedade do corante, verificou-se que as antocianinas apresentam potencial efeito terapêutico como inibição anti-inflamatória, protetora de radiação, quimioprotetor, vasoprotetor da oxidação de LDL e diminuem os riscos de doenças cardiovasculares. Particularmente a quercetina, um flavonol, atraiu um interesse substancial nos últimos anos, pois é o flavonóide que mais se acumula em plantas superiores onde forma glicosídeos com uma grande variedade de açúcares. A ingestão de quercetina contida em alimentos e medicamentos tem sido associada a vários benefícios para a saúde e efeitos terapêuticos ou protetores que se acredita serem baseados na sua atividade antioxidante (HARBORNE, 1994). Além da presença na *Malpighia glabra*, a quercetina também é encontrada em plantas medicinais, como Ginkgo biloba, Hypericum perforatum e Sambucus canadenses (HÄKKINEN et al., 1999; WICZKOWSKI et al., 2008)

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade de espécies vegetais, onde muitas delas ainda não foram devidamente estudadas quanto a sua composição e aplicação (SIMÕES et al., 2002). Sendo o estado do Pará rico em diversidade de frutos, foram testadas no Laboratório de Dermato-Imunologia algumas plantas regionais como: *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), *Bactris gasipaes* (pupunha), *Euterpe oleracea* (açai) e *Malpighia glabra* (acerola). As cepas de pacientes de CBM mantidas LDI se comportaram de maneiras diferentes frente as diferentes frutas, tendo apenas a *M. glabra* uma ação inibitória de crescimento dessas cepas, por isso a necessidade de se investigar como o extrato do fruto apresenta essa ação, podendo ser usada como uma terapia alternativa, ou futuramente um novo fármaco para o tratamento de micoses por implantação, já que não se tem um antifúngico padrão para o tratamento da cromoblastomicose.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAL

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato aquoso da *Malpighia glabra* (acerola) em conídios e células muriformes dos agentes da cromoblastomicose

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o extrato aquoso do fruto (acerola) é capaz de inibir o crescimento de fungos causadores da cromoblastomicose.
- Avaliar a inibição de crescimento de conídios e células muriformes em interação com o extrato aquoso da acerola e suas diferentes concentrações.
- Avaliar a atividade *in vitro* da quercetina tanto em conídios quanto em células muriformes das cepas utilizadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS FÚNGICAS

As cepas foram obtidas através do exame micológico direto das lesões dos pacientes portadores de CBM atendidos na Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia (Marituba-Pa). Após o diagnóstico, as amostras foram semeadas em Agar Mycosel (Sigma, USA), observando o crescimento de colônias, essas colônias foram isoladas e mantidas por repiques sucessivos em ágar-Sabouraud. As cepas dos pacientes são mantidas na micoteca do Laboratório de Dermato-Imunologia (LDI) (esse esquema é feito no laboratório para todos as cepas dos pacientes de cromoblastomicose atendidos na URE).

A identificação molecular dos agentes causadores da CBM das cepas mantidas no LDI, foi realizada no laboratório de microbiologia molecular da UFPR (Universidade Federal do Paraná). Nesses estudos foram avaliadas 6 cepas de pacientes, 5 cepas foi possível identificar a espécie causadora, e foi utilizada como padrão uma cepa de *Candida albicans*.

Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética. (Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, sob o protocolo nº 081/07 CEP-ICS/ UFPA.)

Isolado Clínico	Ident. Molecular	Forma Clínica
Cepa 01	<i>F. pedrosoi</i>	C.L Nodular
Cepa 02	<i>F. pedrosoi</i>	C.L Nodular
Cepa 03	<i>Fonsecaea</i>	C.L Nodular
Cepa 04	<i>F. pedrosoi</i>	C.L Nodular
Cepa 05	<i>F. pedrosoi</i>	C.L Nodular
Cepa 06	<i>F. monophora</i>	C. Difusa
INCQS 40175	<i>C. albicans</i>	-

Tabela 1: **Perfis de cepas utilizadas no estudo.** Mostrando os diferentes agentes etiológicos e as diferentes formas clínicas correspondente a cada cepa avaliada.

3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO FRUTO

Os frutos foram colhidos e lavados com água estéril, foram pesados até atingirem 100 g, que corresponde aproximadamente a 14 a 18 unidades, o extrato foi obtido a partir da maceração manual do fruto, apenas o suco da polpa foi utilizado, o rendimento final foi de 45 a 50 ml de suco. Após a maceração o suco foi distribuído em tubos Falcon (BD, USA) de 15 mL para serem centrifugados (3000rpm/5 min) esse procedimento foi repetido 3x, após sucessivas centrifugações o extrato foi filtrado em membrana PES 22 µm, posteriormente foi verificado o pH que variou entre 3,4 a 3,6 e logo após o material foi autoclavado (127°C) e armazenado (4°C) até o momento dos experimentos - técnica adaptada de Silva et al., 2008.

3.3. PREPARAÇÃO DA QUERCETINA

A suspensão foi realizado como descrito pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M38-A2 (“M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition”, 2008), para estudo de suscetibilidade *in vitro*, a quercetina Sigma® (St. Louis, MO, USA) foi preparada em uma concentração 100X em relação à concentração final. Inicialmente, a solução-estoque de quercetina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-aldrich, MO, USA) em concentrações variando de 3.200 a 6.25 µg/ml. Posteriormente, estas concentrações foram diluídas 1:50 em meio RPMI 1640 (Sigma-aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-aldrich, MO, USA) atingindo concentrações de 64 µg/ml a 0.125 µg/ml.

3.4. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS

Todos os isolados clínicos foram cultivados em ágar batata-dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA) por 15 dias a 30 °C. A suspensão de inóculo foi preparada por raspagem suave da superfície da colônia usando uma alça microbiológica com solução salina, homogeneizada em vortex por cerca de 5 min. Foi feita a centrifugação da suspensão (3.000 rpm/ 5 min), o sobrenadante foi transferido para

um tubo estéril e a densidade celular ajustada entre 0.15 a 0.17 (68 a 71% de transmitância) por espectrofotômetro (530 nm) que correspondia, aproximadamente, a uma faixa de 10^5 - 10^6 cels/ml. Esta suspensão foi diluída 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI (Sigma-aldrich, MO, USA), tamponado com MOPS (Sigma-aldrich, MO, USA).

3.5. INDUÇÃO DE CÉLULAS MURIFORMES *in vitro*

A metodologia de indução de células muriformes a partir de conídios pode ser descrita da seguinte forma: Após o isolamento dos conídios, foi feita a contagem na câmara de Neubauer, onde a concentração final para o experimento foi de 10^4 células/mL por poço, o meio quimicamente definido, composto por 4,0g de Dextrose, 1,9g de Nitrato de Potássio, 4,0g de Fosfato de Sódio Monobásico e 0,9g de Sulfato de Magnésio em 100mL de água destilada, sendo o pH ajustado para 2.6. O cultivo ocorreu em 1000 μ L de meio e 10^4 /mL de conídios por poço da placas de poliestireno de 24 poços, em um tempo de 10 dias à 30°C, obtendo-se células muriformes com características morfológicas semelhantes as células muriformes observadas *in vivo*. Posteriormente à indução, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, sendo usadas 10.000 células em cada poço da placa de 96 poços.

3.6. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Após a obtenção do extrato bruto da acerola, foi realizada uma diluição em série, para verificar se ocorre ação do extrato em diferentes concentrações (1:1, 1:2, 1:4, 1:8), a diluição foi feita com solução fisiológica. Além do meio acerola, foi utilizado também o meio limão (*Citrus limon*), outro meio natural usado para comparar a ação antifúngica, e também para verificar se o pH poderia influenciar na destruição do fungo. Dois limões foram lavados com água esterilizada, foram pressionados manualmente para a obtenção do extrato do fruto, o rendimento final foi de 50 mL, o pH foi medido e o valor foi de 2,64, logo em seguida foi autoclavado (127°C) e estocado a 4°C até o momento do experimento.

Outro meio utilizado foi o RPMI modificado, onde o meio foi acidificado com a adição do ácido clorídrico, o pH foi igualado ao meio acerola (pH 3,5).

Meios utilizados	Teste com conídios	Teste com céls. muriformes	Interferência do pH
RPMI 1460	x	x	x
RPMI pH 3,5	-	-	x
Acerola	x	x	x
Limão	-	-	x

x: realizado -: não realizado

Tabela 2: **Meios de crescimento utilizados nos experimentos.**

3.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O ensaio de sensibilidade *in vitro* foi realizado em placas estéreis de 96 poços com o fundo em U, como descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) norma M38-A2. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada após cinco dias de incubação a 30 °C, sendo definida como a mínima concentração do fármaco capaz de inibir em 100% o crescimento visual do fungo quando comparado com o controle do crescimento (controle positivo), bem como gerar uma diferença estatística significativa na leitura de DO a 530 nm em leitor de microplaca quando comparado com os grupos onde houve crescimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Após a leitura da CIM para os conídios, células muriformes e *C. albicans* determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM). Uma alíquota de 20 µl dos poços onde houve interação foi transferida para placas com ágar Sabouraud-Dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA). Incluíram-se no teste um controle positivo (controle de crescimento) e um controle negativo (controle de esterilidade). As placas foram incubadas por 2 dias (*C. albicans*) e 7 dias (conídios e células muriformes) a 30 °C e o crescimento foi visualmente observado e fotografado. Determinou-se como CFM a concentração mínima em que impede o crescimento fúngico em meio de cultura sólido.

3.9. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Os conídios, células muriformes e a cepa padrão foram tratados com diferentes concentrações da quercetina e do extrato aquoso, após 5 dias de incubação a 30°C, as amostras foram transferidas para ependorffs, em seguida foram centrifugadas a 3000rpm/5min, 20µL da suspensão resultante foi colocado entre lâmina e lamínula e posteriormente observado e fotografado em microscópio óptico (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Alemanha).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste-t de *Student* com nível de significância de 5%, utilizando-se o software GraphPadPrism. Versão 6.00 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ATIVIDADE *in vitro* DO EXTRATO EM CONÍDIOS DE CEPAS de *Fonsecaea spp.*

Os conídios de *Fonsecaea spp.* foram mantidos em interação com o extrato aquoso (maior concentração) da acerola em um período de 5 dias, após isso verificou-se pela microscopia óptica, que não houve diferenciação dos conídios em hifas, sugerindo que o extrato da *M. glabra* apresenta um atividade fungicida (fig 5 A, B,C e D). Essa atividade foi confirmada pela ausência de crescimento na placa de cultura com meio sólido (fig 5 F). Pela microscopia óptica, foi possível verificar que os conídios não se diferenciaram em hifas melanizadas septadas, como foi observado com os conídios em meio RPMI 1460 (controle positivo de crescimento) (fig 5 E), foi possível observar também a presença de vacúolos citoplasmáticos nos conídios em interação com o extrato (setas na fig 5 A e B).

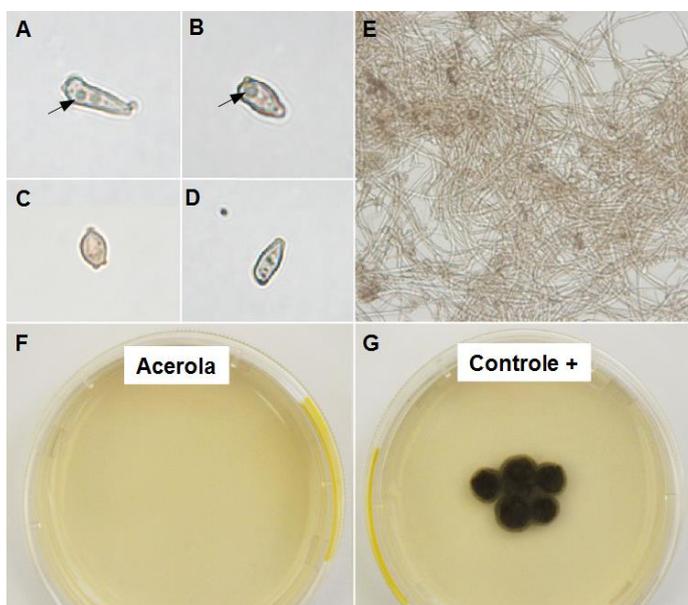


Figura 5: **Inibição dos conídios de cepa de fungo causador de cromoblastomicose frente ao extrato de acerola.** A seta preta mostra a presença de vacúolos (A, B, C e D), diferenciação de conídios em hifas no meio RPMI 1460 (E), cultura em meio sólido mostrando ausência de crescimento da colônia em interação com o extrato (F) e o crescimento da cepa dos conídios em interação com RPMI 1460 (G) .

Estudos a respeito das alterações morfológicas induzidas em conídios de *F. pedrosoi* não são muito encontrados, principalmente com extratos de plantas. Entre os estudos envolvendo alterações morfológicas, outros fungos já foram testados, no entanto com drogas utilizadas para tratamento de micoses (itraconazol, anfotericina

B e voriconazol), onde foi observado a alteração da parede celular, além da deformação mitocondrial e no núcleo (GANGWAR et al., 2006)

Além de verificar a inibição do crescimento dos agentes da CBM, utilizamos uma cepa padrão de *Candida albicans* para nosso controle de qualidade, pois estudos que relacionam a atividade de moléculas antifúngicas *in vitro* com a resposta clínica vêm sendo realizados para algumas espécies de candidas (MIKUS; SCHOLZ; WEISS, 2011).

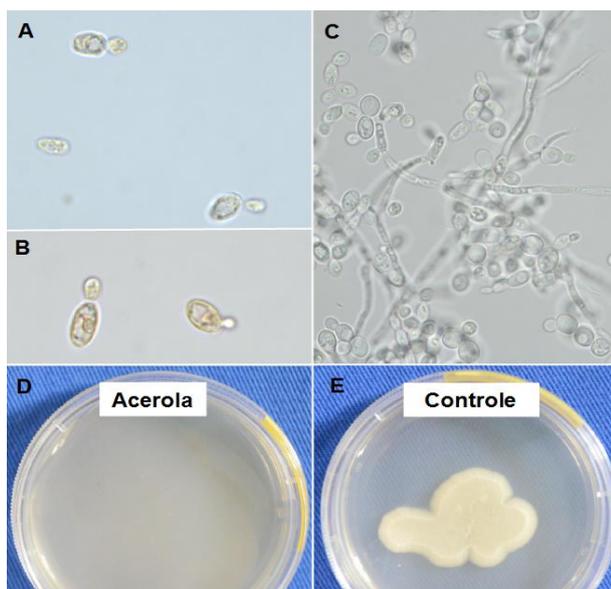


Figura 6: **Cepa de *C. albicans* em interação como extrato de *M. glabra* (A e B); em meio RPMI (C), cultura para verificar a ação fungicida do extrato (D e E).**

As alterações encontradas no nosso estudo, inclui a presença de vacúolos (fig 5 A e B), possível irregularidade da membrana (fig 6 A e B) e também a retenção dos pigmentos presentes no extrato (fig 6 A e B), para confirmar a ação fungicida, foi feita a cultura no meio sólido, observando a ausência de crescimento fúngico (fig 6 D e E). Dornellas-Ribeiro (2012) observou ultraestruturalmente a formação de vacúolos citoplasmáticos e membrana celular com irregularidades em *Candida tropicalis* após a exposição ao fluconazol (DORNELAS-RIBEIRO et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que além da inibição do crescimento do fungo *Fonsecaea spp.* o extrato da *M. glabra* também foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans* mostrando que o extrato da acerola pode agir tanto em fungos melanizados como em fungos hialinos, além disso pode atuar tanto em fungos filamentosos quanto em fungos leveduriformes, no entanto é necessária uma melhor investigação para verificar o potencial antifúngico da acerola.

4.2. INFLUÊNCIA DO pH NA VIABILIDADE CELULAR DOS CONÍDIOS

Observamos que o pH do extrato da acerola apresentou um caráter ácido que correspondeu a 3,5. Para verificar se o pH poderia estar influenciando na viabilidade dos conídios e da cepa padrão, foram realizados teste com diferentes meios de cultura. Além do extrato da acerola, foram usados os meios: RPMI 1460 (meio padrão - pH 7,0), o RPMI acidificado (pH 3,5), o extrato do *Citrus limon* (pH 2,6) que além de pH ácido, apresenta também um grande teor de vitamina C e possui diversas ações terapêuticas conhecidas na medicina popular (Agra et al. 2007; Fenner et al. 2006).

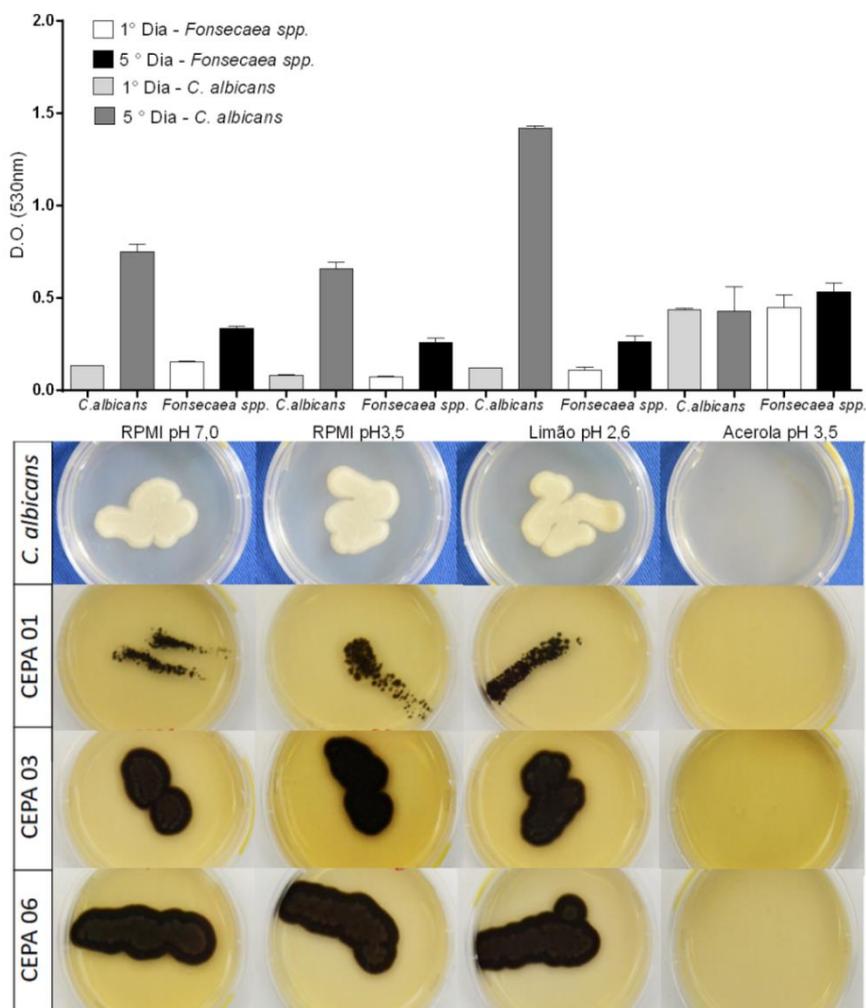


Figura 7: Avaliação do pH em diferentes cepas causadoras da cromoblastomicose e da *C. albicans*. Apenas o extrato de acerola foi capaz de inibir o crescimento dos fungos mesmo os outros meios apresentando pH semelhante ao extrato.

Os resultados confirmaram que o pH ácido não influencia na viabilidade das cepas avaliadas (fig 7), pois em ambos os meios, RPMI acidificado e o extrato de limão, os conídios e a *C. albicans* apresentaram crescimento celular. Silva et al. demonstraram que em meios de frutas naturais (*Theobroma grandiflorum* e *Bactris gasipaes*), com pH ácido (2,7), os conídios de cepas de *Fonsecaea pedrosoi* se diferenciavam em células muriformes (SILVA et al., 2008). Além disso o meio quimicamente definido usado para a indução de células muriformes é um meio ácido (pH 2,6) o que corrobora com nossos resultados sobre a não influencia do pH na inviabilidade celular dos conídios de *Fonsecaea spp.*

Estudos realizados com *Citrus limon* mostraram que ele apresenta uma ação antifúngica, no entanto esses estudos foram realizados com o óleo essencial, (SALAS et al., 2011; TAO; JIA; ZHOU, 2014), diferente do nosso experimento que usou o extrato aquoso do fruto, onde se verificou que não apresentou ação contra os conídios de *Fonsecaea spp.* e na cepa de *C. albicans*.

Observamos também que os diferentes meios apresentam densidade óptica inicial diferente, devido a diferença da turbidez dos meios (fig 8). O extrato de acerola apresentou D.O. inicial maior que os outros meios avaliados. Mesmo não tendo o crescimento do fungo no extrato da acerola, a D.O do extrato apresentou um aumento após 5 dias de interação, esse aumento pode estar relacionado ao “debrí” celular ou até mesmo a sedimentação dos componentes do extrato de *M. glabra* (fig 8).

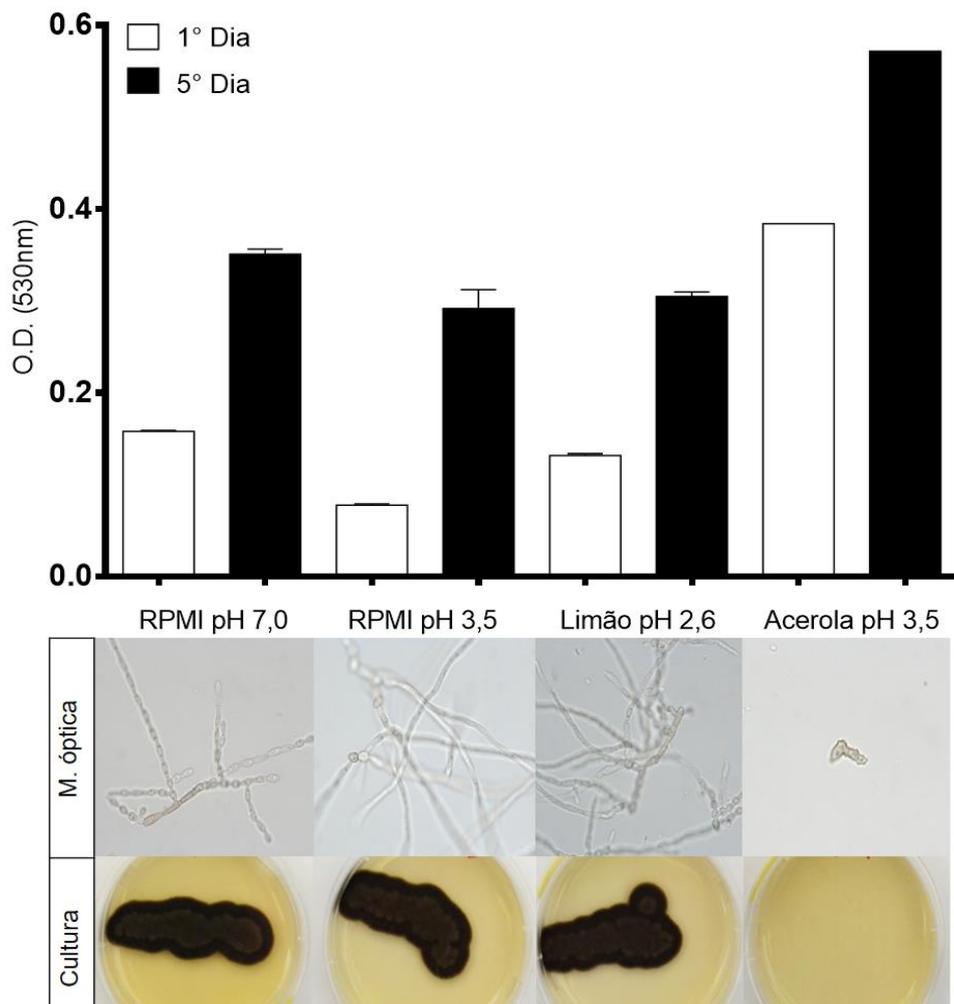


Figura 8: Avaliação de diferentes meios para verificar a influência do pH no conídios da cepa 06. Entre os meios verificados apenas o meio acerola apresentou a inibição do crescimento do fungo.

4.3. AÇÃO *in vitro* DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO EM CONÍDIOS DAS CEPAS DE *Fonsecaea spp.*

Foram utilizadas diferentes perfil de cepas como nos mostra a tabela 1, levando em conta os diferentes agentes etiológicos e formas clínicas. Além do extrato de *M. glabra* apresentar ação na maior concentração (1:1), ele apresentou ação em diferentes concentrações em conídios de *Fonsecaea spp.* (fig 9). As cepas se comportaram de maneira semelhante em relação a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), como podemos observa na tabela 3. Mostrando que diferentes agentes causadores de cromblastomicose,

causando diferentes formas clínicas, são sensíveis ao extrato de *M. glabra* na sua maior concentração, e em suas diferentes diluições.

Extrato da Acerola (Diluição)	Cepa 01	Cepa 02	Cepa 03	Cepa 05	Cepa 06	<i>C. albicans</i>
1:1	-	-	-	-	-	-
1:2	-	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	+	+
1:8	+	+	+	+	+	+
C+	+	+	+	+	+	+
C-	-	-	-	-	-	-

C+: controle positivo C-: controle negativo

Tabela 3: **Concentração inibitória mínima das diluições do extrato.** Entre as cepas avaliadas, temos que a CIM para as cepas 01, 02, 03 e 05 é de 1:4, enquanto que a cepa 06 e *C. albicans* apresentaram CIM de 1:2.

Todas as cepas apresentaram inibição de crescimento nas diferentes diluições, no entanto as cepas 01, 02, 03 e 05, mostraram ser mais sensíveis ao extrato do que a cepa 06 e a cepa padrão. Sendo a cepa 06 identificada como *Fonsecaea monophora*, diferente das outras cepas avaliadas (*F. pedrosoi*), podendo esse ser o fator de diferença de sensibilidade dessa cepa, outro interferente pode ser a forma clínica, uma vez que apenas essa cepa é classificada com cromoblastomicose cutânea difusa enquanto as outras são classificadas como cutânea localizada nodular. Ameen em 2009, mostrou que mesmo sendo o agente etiológico mais comum, o *F. pedrosoi* mostra-se o menos suscetível as terapias antifúngicas quando comparado com o *C. carrionii* ou *P. Verrucosa* (AMEEN, 2009). Nosso resultado mostra que o *F. pedrosoi* apresentou melhor inibição em interação com diferentes concentrações do extrato, no entanto é necessária mais amostras fúngicas para confirmar e também avaliar outros agentes etiológicos.

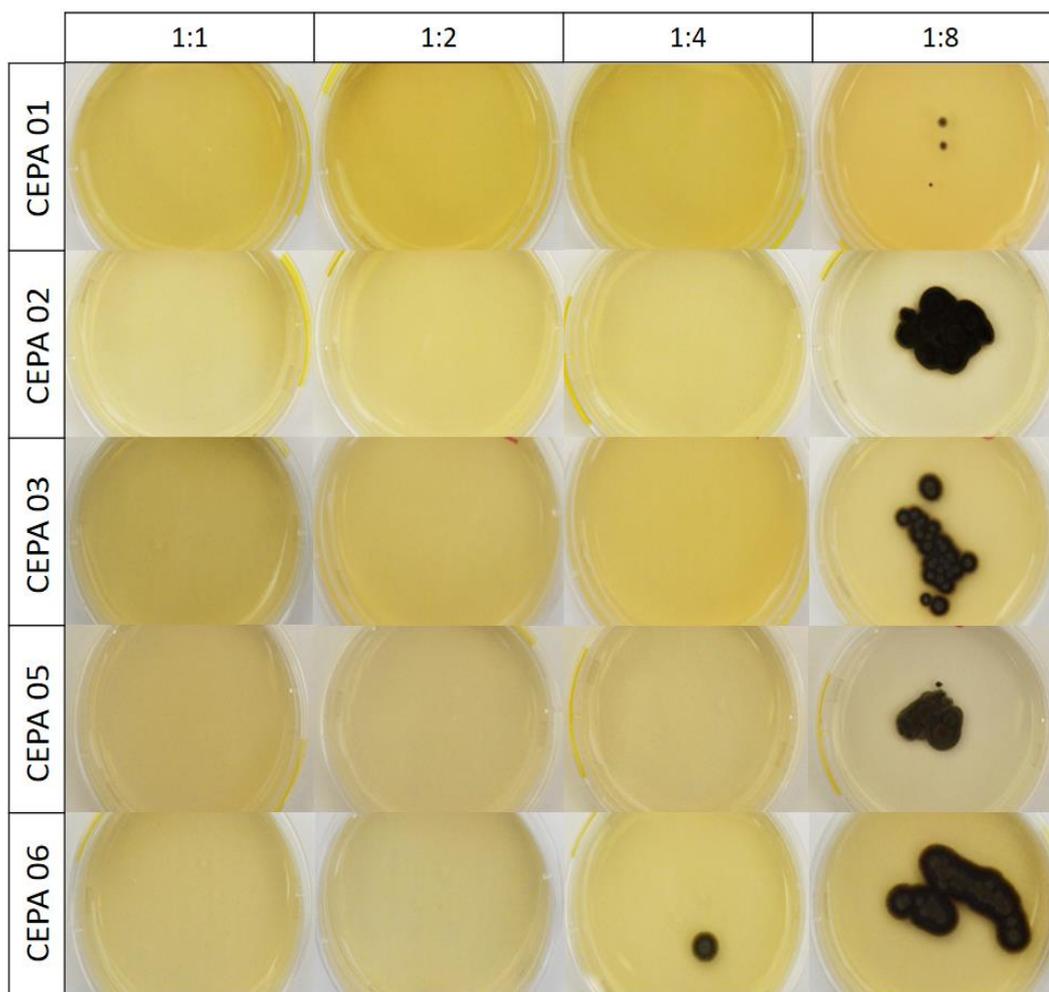


Figura 9: **Concentração fungicida mínima das diferentes diluições do extrato.** Diferentes concentrações do extrato é capaz de inibir o crescimento de diferentes cepas, a CFM das cepas foi a diluição 1:4, exceto para cepa 06.

Na análise individual dos resultados, observamos que o paciente da qual a cepa 06 é proveniente, é do gênero masculino, de 81 anos, com tempode evolução de 15 anos, apresentando as lesões no dedo indicador esquerdo (fig 10 A) e disseminadas pelo membro inferior (fig 10 B), caracterizando assim uma lesão cutânea disseminada, o agente causador é o fungo *Fonsecaea monophora*, que o diferencia dos outro agentes causadores avaliados, porém essa diferença da CIM e CFM pode estar relacionada com a forma clínica da doença, sendo necessário mais experimentos para verificar se essa susceptibilidade pode estar relacionada com a forma clínica e/ou a espécie causadora.

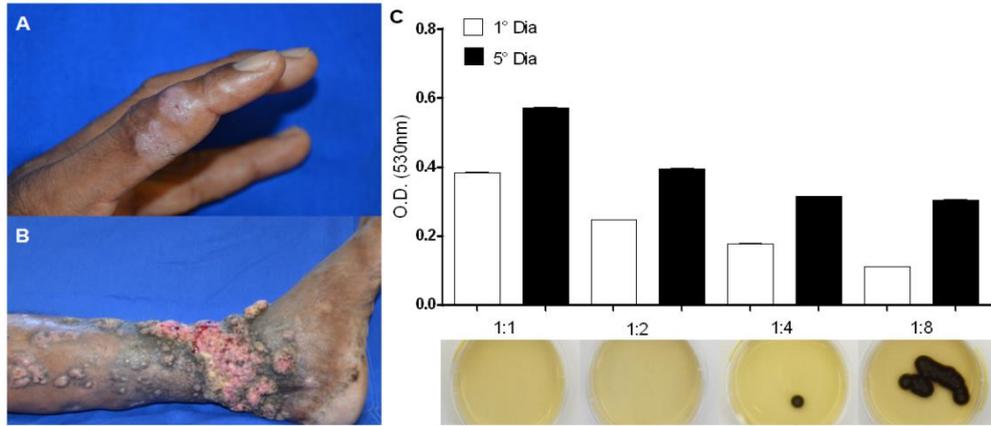


Figura 10: **Dados clínicos e laboratoriais da cepa 06.** Lesões no dedo da mão e disseminada na perna (A e B), gráfico da densidade óptica do crescimento dos conídios em diferentes concentrações do extrato de acerola e verificação da ação fungicida em meio sólido.

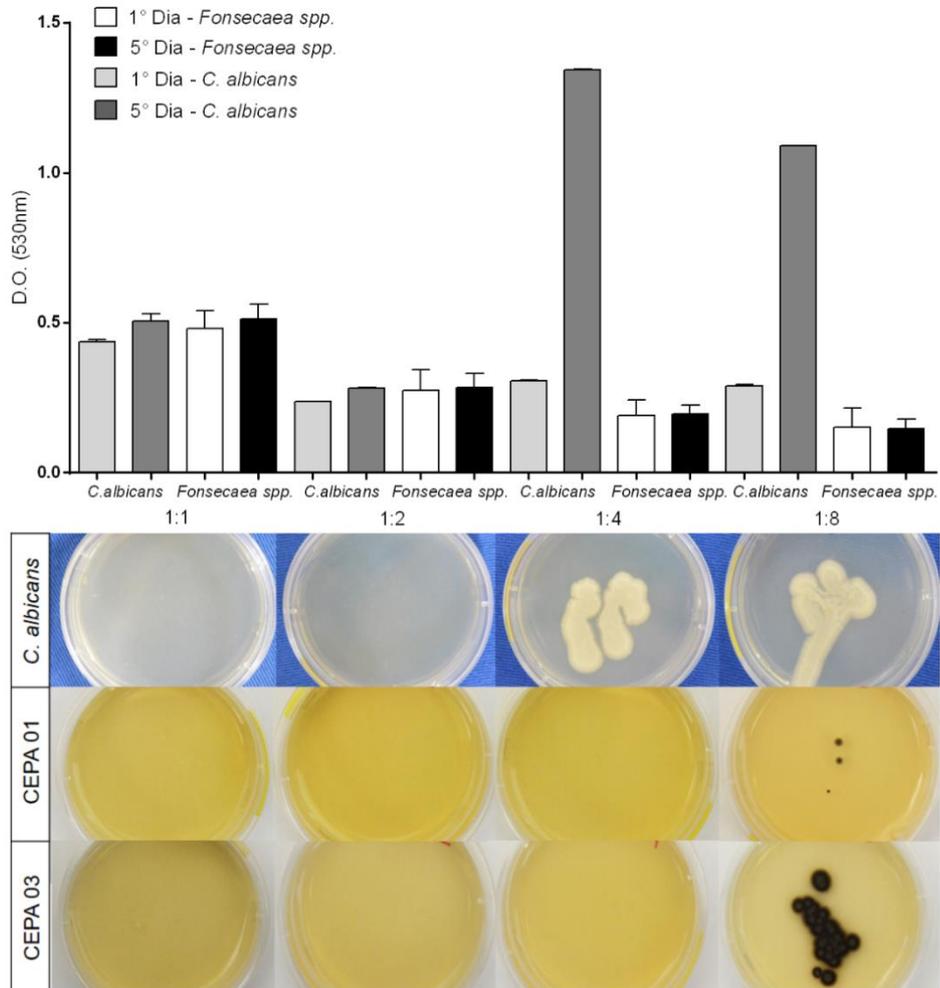


Figura 11: **Comparação da densidade óptica dos conídios em relação as diferentes concentrações do extrato da acerola.** O aumento da D.O. da *C. albicans* corresponde ao crescimento da colônia, apesar do crescimento de colônia das cepas de *Fonsecaea spp.* não temos o aumento da D.O.

A análise pela espectrometria das diferentes diluições do extrato, revelou o aumento significativo ($< 0,0001$) da densidade óptica da *C. albicans* após 5 dias de interação com a concentração 1:4 do extrato, esse aumento está relacionado com o desenvolvimento/crescimento da levedura, que foi confirmado através do crescimento da colônia no meio sólido. Além da atividade fungicida, podemos sugerir que o suco de *M. glabra* tem ação fungistática, pois mesmo tendo crescimento no meio de cultura sólido percebemos a manutenção da D.O. após 5 dias de interação dos conídios na concentração 1:8 das cepas 01 e 03.

4.4. ATIVIDADE *in vitro* DA QUERCETINA EM CONÍDIOS DAS CEPAS DE *Fonsecaea spp.*

As plantas são fontes ricas de uma grande variedade de metabolitos ativos tais como, taninos, terpenoides, alcaloides e flavonoides que têm sido relatados devido às suas propriedades antifúngicas testadas *in vitro* (ARIF et al., 2009; SALAS et al., 2011; SERPA et al., 2012). A quercetina, que é um flavonoide, que está presente na polpa da acerola, na literatura temos relato da presença desse flavonoide em outras plantas da família Malpighiaceae, como por exemplo: *Byrsonima crassa*, *Byrsonima crassifolia*, *Mascagnia pubiflora* (A. Juss.) Griseb., *Tetrapteryx heterophylla* Griseb. e *Byrsonima intermedia* (AGUILAR-GUADARRAMA; RÍOS, 2007; BONACORSI et al., 2012; HERRERA-RUIZ et al., 2011; SANNOMIYA et al., 2007) O extrato aquoso de *Mirabilis jalapa* L., que contém quercetina, apresentou ação contra *A. niger* van Tieghem (HAJJI et al., 2010). A mesma substância foi a principal constituinte no extrato de metanol da casca de *Juglans regia* L., que foi ativo contra *A. flavus* Link, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. sydowii* (Bainier & Sartory) (SHARMA et al., 2009).

Para verificar se a quercetina é a responsável pela atividade fungicida do extrato foi realizado teste de suscetibilidade *in vitro*. A quercetina apresentou ação fungicida em conídios de diferentes cepas causadoras da CBM e também na cepa padrão de *Candida albicans*. A média geométrica da CIM para os conídios foi de 4,75 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 4). A cepa 02 mostrou ser menos sensível que as outras cepas avaliadas, tendo a CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$. A média geométrica da CFM foi de 11,31 $\mu\text{g/mL}$, isso sugere que a quercetina além de ação fungicida, também tem ação fungistática, pois as CFM das cepas são maiores que as CIM.

Cepas que apresentam o mesmo agente etiológico (cepa 01 e 02), *Fonsecaea pedrosoi*, apresentaram comportamento diferente, onde a cepa 02 se mostrou menos sensível (CIM 8 µg/mL) a quercetina que a cepa 01 (CIM 4 µg/mL). Apesar de diferença no agente etiológico (*Fonsecaea monophora*) e na forma clínica (cromoblastomicose cutânea difusa), a cepa 06 apresentou resultados da CIM e CFM semelhantes a outras cepas que apresentam agente etiológico e forma clínica diferentes. Isso nós sugere que mesmo cepas causando uma forma clinica mais grave, são sensíveis a quercetina, no entanto é necessário um aumento das amostras clínica para confirmar essa hipótese.

Isolados clínicos	Quercetina (µg/mL)	
	CIM	CFM
Cepa 01	4	8
Cepa 02	8	8
Cepa 03	4	16
Cepa 06	4	16
Média Geométrica	4,75	11,31

Tabela 4: **Avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Fonsecaea* spp em relação a quercetina.**

Foi realizada a leitura da densidade óptica das diferentes concentrações da quercetina em interação com os conídios após 5 dias. A figura 13 nos mostra que além de ação em conídios a quercetina apresenta atividade também na cepa padrão de *C. albicans*, tendo a CIM de 32 µg/mL, o gráfico nós mostra um aumento significativa da D.O. após 5 dias de interação na concentração 16 µg/mL quando comparada com o controle negativo de crescimento, esse aumento é confirmado com o crescimento da *C. albicans* no meio sólido. Na literatura temos relato que o flavonoide quercetin-3-O-a-arabinofuranose (avicularin), presente nas folhas de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. (goiaba-brava) foi o composto mais ativo, inibindo espécies de *Candida* em concentrações de 32 a 2 µg / mL. Os valores de MIC sugerem a atividade potencial dessas espécies de plantas contra leveduras (DA

SILVA SA et al., 2017) Apesar de haver crescimento/desenvolvimento dos conídios a partir da concentração 8 µg/mL, não temos o aumento da D.O. nessa concentração como nos mostra o gráfico.

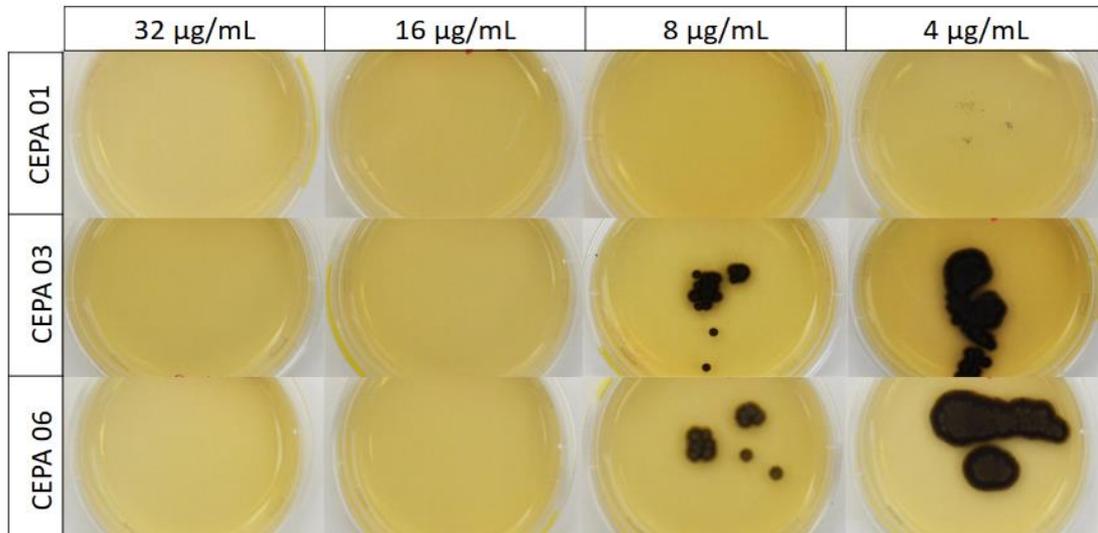


Figura 12: **Avaliação da concentração fungicida mínima da quercetina.** A cepa 01 mostrou ser mais sensível a quercetina do que as cepas 03 e 06, que apresentaram CIM de 16 µg/mL.

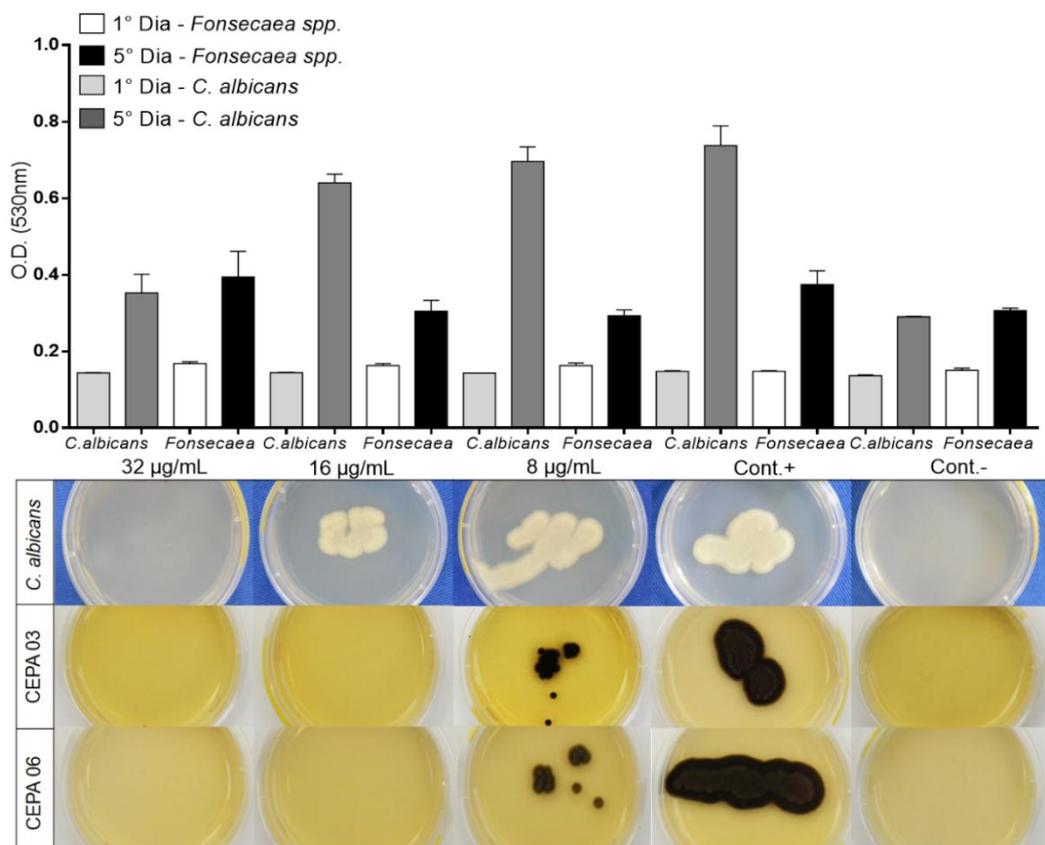


Figura 13: **Ação da quercetina em diferentes cepas de *Fonsecaea spp.* e da cepa de *C. albicans*.** A CIM para as cepas de *Fonsecaea spp.* foi de 16 µg/mL, sendo que a CIM para a cepa padrão foi de 32 µg/mL.

A acerola apresenta vários compostos, a quercetina é apenas um deles, que pode estar atuando como uma molécula antifúngica como sugere nossos resultados, ainda não sabemos sua farmacocinética nos fungos causadores da CBM e também se ela é o principal composto que apresenta essa ação, ou se outros compostos (ainda não identificados) também apresentam a mesma atividade antifúngica, ou sua atuação pode ser maior quando associada a outros compostos presentes no extrato de *M. glabra*, apresentando assim uma ação fungicida muito maior quando comparado com ela isolada. Vários testes ainda são necessários para verificar o qual o princípio ativo do extrato de acerola é capaz de causar a inviabilidade celular dos conídios.

4.5. AVALIAÇÃO *in vitro* DA AÇÃO DO EXTRATO E DA QUERCETINA EM CÉLULAS MURIFORMES

A maioria dos trabalhos *in vitro* realizados com os agentes da cromoblastomicose, incluindo testes com drogas, tem utilizados apenas hifas ou a fase conidial do ciclo de vida do fungo (BIANCALANA; LYRA; SCHREIBER, 2011). Diferente das células muriformes, hifas e conídios não são encontradas frequentemente nas lesões dos pacientes, por isso a necessidade de experimentos usando a forma parasitária, e esta é a forma mais adequada de relacionar a atividade *in vitro* de um composto com uma possível eficácia *in vivo*.

Além de usar a fase conidial nos experimentos, as células muriformes também foram usadas, pois há a necessidade de saber se o extrato de acerola e a quercetina apresentam ação na forma encontrada no tecido do hospedeiro – células muriformes. Observou-se que além de atividade fungicida em conídios, o extrato da *M. glabra* também apresenta ação nas células muriformes, como nos mostra a figura 14, onde observamos que na interação com o extrato de *M. glabra* as células muriformes não se diferenciam em hifas, isso não ocorre quando colocamos as células muriformes no meio RPMI. Observamos também uma possível fragilidade da parede celular das células muriformes, além da perda de coloração das células (figura 14).

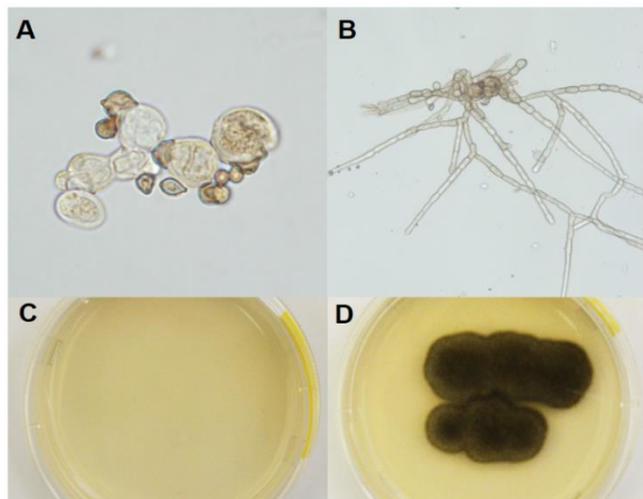


Figura 14: **Avaliação *in vitro* da atividade do extrato da acerola em células muriformes (cepa 02)**. Células muriformes após 5 dias de interação com extrato (A), em interação com o RPMI 1460, onde temos a diferenciação celular (B), ação fungicida confirmada com a cultura (C) formação de colônia em meio sólido (D).

Quando avaliamos a atividade da quercetina frente as células muriformes observamos que a CIM foi $16\mu\text{g/mL}$ (fig 15), igual a CIM dos conídios. Vale ressaltar que a quantidade de células escleróticas utilizadas foi de 10.000 por poço, pois na norma M38-A2 não se tem uma padronização para a suscetibilidade em células muriformes, além disso a concentração inicial foi de $64\mu\text{g/mL}$, diferente da concentração inicial ($32\mu\text{g/mL}$) que foi utilizada nos conídios e *C. albicans*.

São necessários mais estudos de como a quercetina age na parede celular tanto dos conídios como nas células muriformes, no entanto a ação da quercetina nos fungos pode estar relacionada à inibição da enzima dependente de calmodulina presente na membrana celular, tais como ATPases e fosfolipases influenciando assim a permeabilidade da membrana (HAVSTEEN, 1983). Estudos *in vivo* demonstraram que a administração oral de quercetina protege animais de laboratório contra infecção induzida por *Shigella* (VIJAYA; ANANTHAN, 1996). A atividade antifúngica deve-se provavelmente à capacidade destes compostos em formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas (ARIF et al., 2009). Por outro lado, a natureza lipofílica dos flavonoides é também capaz de romper as membranas dos fungos (ARIF et al., 2009; SALAS et al., 2011). A quercetina pode participar das reações complexas com metais,

afetando o transporte, reatividade, biodisponibilidade e toxicidade de íons metálicos. Possui três possíveis locais de quelação em concorrência que poderia ser classificada da seguinte maneira: catecol N-hidroxicarbonil -N-hidroxicarbonilo (D'ANDREA, 2015)

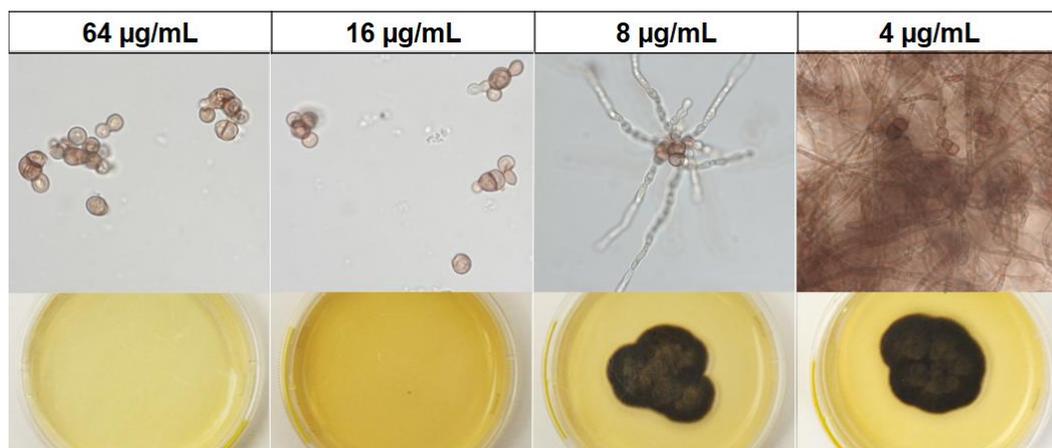


Figura 15: **Células muriformes (cepa 04) em interação com diferentes concentrações de quercetina.** Mostrando que a CIM e CFM da quercetina para as células muriformes é de 16 µg/mL.

O potencial antimicrobiano dos flavonóides vem sendo documentado na literatura. A galangina, flavonóide comumente encontrado no própolis, demonstrou atividade inibitória para *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* (AFOLAYAN; MEYER, 1997). a quercetina também é encontrada em plantas medicinais, como *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Sambucus canadenses* (HÄKKINEN et al., 1999; WICZKOWSKI et al., 2008).

5. CONCLUSÃO

A *Malpighia glabra* (acerola) e a quercetina apresentaram ações fungicidas em diferentes concentrações em ambas as formas (conídios e células muriformes) de *Fonsecaea* spp e em *Candida albicans*, podendo ser colocadas como uma nova possibilidade terapêutica, isoladas ou em associação a antifúngicos clássicos

6. REFERÊNCIAS

- AFOLAYAN, A. J.; MEYER, J. J. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 57, n. 3, p. 177–81, ago. 1997.
- AGRA, M. DE F.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, mar. 2007.
- AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; RÍOS, M. Y. Terpenos y flavonoides glicosídicos de *Tetrapterys heterophylla* (Griseb.) W.R. Anderson (Malpighiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 12, n. 3, 2007.
- AMEEN, M. Chromoblastomycosis: clinical presentation and management. **Clinical and experimental dermatology**, v. 34, n. 8, p. 849–54, dez. 2009.
- AMEEN, M. Managing chromoblastomycosis. **Tropical Doctor**, v. 40, n. 2, p. 65–67, 2010.
- ANDRADE, T. S. et al. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. **Mycoses**, v. 47, n. 5–6, p. 216–221, 2004.
- ARIF, T. et al. **Natural products - Antifungal agents derived from plants** **Journal of Asian Natural Products Research**, jul. 2009.
- ATTAPATTU, M. C. Chromoblastomycosis - A clinical and mycological study of 71 cases from Sri Lanka. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 145–151, 1997.
- BANSAL, A. S.; PRABHAKAR, P. Chromomycosis: a twenty-year analysis of histologically confirmed cases in Jamaica. **Tropical and geographical medicine**, v. 41, p. 222–226, 1989.
- BAYLES, M. A. Chromomycosis. **Current topics in medical mycology**, v. 6, p. 221–43, 1995.
- BELL, L. et al. A review of the cognitive effects observed in humans following acute supplementation with flavonoids, and their associated mechanisms of action. **Nutrients**, 2015.

BIANCALANA, F. S. C.; LYRA, L.; SCHREIBER, A. Z. In vitro evaluation of the type of interaction obtained by the combination of terbinafine and itraconazole, voriconazole, or amphotericin B against dematiaceous molds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4485–4487, 2011.

BOHM, H. et al. Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. **Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft**, v. 37, n. 2, p. 147–163, 1998.

BONACORSI, C. et al. Effect of *Byrsonima crassa* and phenolic constituents on *Helicobacter pylori*-induced neutrophils oxidative burst. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 133–141, 2012.

BONIFAZ, A.; CARRASCO-GERARD, E.; SAÚL, A. Chromoblastomycosis: Clinical and mycologic experience of 51 cases. **Mycoses**, v. 44, n. 1–2, p. 1–7, 2001.

BONIFAZ, A.; PAREDES-SOLÍS, V.; SAÚL, A. Treating chromoblastomycosis with systemic antifungals. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 5, p. 247–254, 2004.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **Journal of the German Society of Dermatology: JDDG**, v. 8, n. 8, p. 619–27; quiz 628, ago. 2010.

BORS, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoid antioxidants: Rate constants for reactions with oxygen radicals. **Methods in Enzymology**, v. 234, p. 420–429, 1994.

BURSTEIN, Z. Cromomicosis: Clínica y Tratamiento; situación epidemiológica en latinoamérica. **Rev Peru Exp Salud Publica**, v. 21, p. 167–175, 2004.

CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis. **Mycologia**, v. 34, p. 424–441, 1942.

CHO, S.-Y. et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 243, n. 1–2, p. 153–60, jan. 2003.

CONVIT, J.; REYES, O.; KERDEL, F. Disseminated Anergic American Leishmaniasis. **Archives of Dermatology**, v. 76, n. 2, p. 213, 1 ago. 1957.

D'ANDREA, G. **Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications. Fitoterapia**, 2015.

DA SILVA, M. B. et al. Development of natural culture media for rapid induction of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3839–3841, nov. 2008.

DABOIT, T. C. et al. A Case of Relapsed Chromoblastomycosis Due to *Fonsecaea monophora*: Antifungal Susceptibility and Phylogenetic Analysis. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 139–144, 2013.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D. Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. **Current Sports Medicine Reports**, 2009.

DE HOOG, G. S. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 243–250, 30 dez. 2000.

DE HOOG, G. S. et al. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in mycology**, v. 58, p. 219–34, jan. 2007.

DINIZ, T. C. et al. The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

DORNELAS-RIBEIRO, M. et al. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 31–38, fev. 2012.

EL HAOUARI, M.; ROSADO, J. A. Medicinal Plants with Antiplatelet Activity. **Phytotherapy Research**, 2016.

ESTERRE, P. et al. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1996.

ESTERRE, P. et al. [Squamous cell carcinoma arising from chromomycosis. Report of two cases]. **Ann.Pathol.**, v. 19, n. 0242–6498 (Print), p. 516–520, dez. 1999.

ESTERRE, P. .; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. .; RAHARISOLO, C. . The natural history of Chromoblastomycosis in Madagascar and the Indian ocean. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 90, p. 312–317, 1997.

FADER, R. C.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 2, p. 925–938, 1988.

FANTINI, M. et al. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.

FAROMBI, E. O. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: Protective role of free radical scavengers. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 159–167, maio 2006.

FARZAEI, M. H.; BAHRAMSOLTANI, R.; RAHIMI, R. Phytochemicals as Adjunctive with Conventional Anticancer Therapies. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 27, p. 4201–4218, 2016.

FAZIOLI, A. C . L . SILVA AND RAQUEL Mice were given , intraperitoneally , inocula of a cell-wall preparation and fractions thereof from *Fonsecaea pedros*. v. 0, p. 299–305, 1985.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369–394, set. 2006.

FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G. Cromoblastomicose : Doença presente na realidade populacional brasileira Chromoblastomycosis : present disease in brazilian population reality. v. 38, n. 3, p. 189–192, 2006.

Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira. 2011.

FOSTER, H. M. A.; HARRIS, T. J. Malignant change (squamous carcinoma) in chronic chromoblastomycosis. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 57, n. 10, p. 775–777, out. 1987.

GANGWAR, M. et al. Application of fluorescent probes to study structural changes in *Aspergillus fumigatus* exposed to amphotericin B, itraconazole, and voriconazole. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 103–109, ago. 2006.

GARNICA, M.; NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F. Difficult mycoses of the skin: advances in the epidemiology and management of eumycetoma,

phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 559–63, dez. 2009.

GASPAR, J. et al. On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. **Mutagenesis**, v. 9, n. 5, p. 445–9, set. 1994.

GIMENES, V. M. F. et al. Cellular immune response of patients with chromoblastomycosis undergoing antifungal therapy. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 97–101, ago. 2006.

GOMES, J. E. et al. Comportamento de propriedades físicas, químicas e reológicas do suco de acerola armazenado a baixa temperatura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 2, p. 296–300, maio 2001.

GOMES, J. E.; PERECIN, D. .; MARTINS, A. B. G. Análise de agrupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C). **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, 2000.

GONSALVES, P. E. **Livro dos alimentos**. [s.l.] MG Editores, 2001.

GRASSI, D. et al. Cocoa, Glucose Tolerance, and Insulin Signaling: Cardiometabolic Protection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015.

GUAN, L. P.; LIU, B. Y. Antidepressant-like effects and mechanisms of flavonoids and related analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.

HAJJI, M. et al. GC/MS and LC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1486–1493, 2010.

HÄKKINEN, S. H. et al. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 2274–2279, 1999.

HARBORNE, J. B. (JEFFREY B. . **The Flavonoids : advances in research since 1986**. [s.l.] Chapman & Hall, 1994.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141–1148, abr. 1983.

HERRERA-RUIZ, M. et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of

standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 14, p. 1255–1261, 2011.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.

JAIN, P. Secondary metabolites for antiulcer activity. **Natural product research**, n. May, p. 1–17, 2015.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 628–633, 29 jan. 2003.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free radical biology & medicine**, v. 7, n. 6, p. 617–35, 1989.

KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World review of nutrition and dietetics**, v. 24, p. 117–191, 1976.

LEÃO, R. N. Q. DE et al. *Medicina tropical e infectologia na Amazônia*. v.2. 2013.

LESLIE, D. F.; BEARDMORE, G. L. Chromoblastomycosis in Queensland: a retrospective study of 13 cases at the Royal Brisbane Hospital. **The Australasian journal of dermatology**, v. 20, n. 1, p. 23–30, abr. 1979.

LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 167, 15 mar. 2016.

LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. **Life Sciences**, v. 79, n. 21, p. 2056–2068, 19 out. 2006.

LIMA, V. L. A. G. et al. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 565–568, 2005.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Chromomycosis: a clinical and mycologic study of thirty five cases observed in the hinterland of Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, p. 132–135, 1976.

LÓPEZ MARTÍNEZ, R.; MÉNDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. **Clinics in**

Dermatology, v. 25, n. 2, p. 188–194, 2007a.

LÓPEZ MARTÍNEZ, R.; MÉNDEZ TOVAR, L. J. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 188–194, 2007b.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 6, p. 931–954, 2005.

LYON, J. P. et al. Photodynamic Antifungal Therapy Against Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 293–297, 2011.

M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. 2008.

MAIA, G. A. et al. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 130–134, mar. 2007.

MAMANI-MATSUDA, M. et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 10, p. 1304–1310, 15 nov. 2006.

MARINO NETTO, L. **Acerola a cereja tropical**. [s.l.] Nobel, 1986.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon Region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, n. 4, p. 305–311, 2006a.

MARQUES, S. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the Shell of the Babassu Coconut *Orbignya phalerata* Martius in the Amazon Region of Maranhão Brazil. v. 47, 2006b.

MATSUURA, F. C. A. U. et al. Avaliações Físico-Químicas em Frutos de Diferentes Genótipos de Acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 602–606, dez. 2001.

MATTE, S. M. W. et al. CROMOBLASTOMICOSE NO RIO GRANDE DO SUL : RELATO DE 12 CASOS. v. 30, n. 4, p. 309–311, 1997.

MCGINNIS, M. R. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 8,

p. 1–16, 1983.

MIKUS, G.; SCHOLZ, I. M.; WEISS, J. Pharmacogenomics of the triazole antifungal agent voriconazole. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 6, p. 861–872, jun. 2011.

MINOTTO, R. et al. Chromoblastomycosis: A review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, abr. 2001.

MUSSER, R. DOS S. et al. Características físico-químicas de acerola do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 556–561, dez. 2004.

NAJAFZADEH, M. J. et al. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. [s.l: s.n.]. v. 48

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V. DE; BURITY, H. A. Curso diário e sazonal das trocas gasosas e do potencial hídrico foliar em aceroleiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1331–1342, jul. 2000.

OGAWA, M. M. et al. Lymphoscintigraphic analysis in chromoblastomycosis. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. 8, p. 622–625, ago. 2003.

PARDO-CASTELLO, V. .; RIO LEON, E. .; TRESPALACIOS, F. Chromoblastomycosis in Cuba. **Archives of Dermatology**, v. 45, n. 1, p. 19, 1 jan. 1942.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Phenolic Fractions from Andean Purple Corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4557–4567, 28 jun. 2006.

PEREZ-BLANCO, M. et al. Chromomycosis by *Rhinocladiella aquaspera*: The first case in Venezuela. **Rev Iberoam Micol**, v. 15, n. 1, p. 51–54, 1998.

PÉREZ-BLANCO, M. et al. Chromoblastomycosis in children and adolescents in the endemic area of the Falcón State, Venezuela. **Medical mycology**, v. 44, n. 5, p. 467–71, ago. 2006.

PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M. Flavonoids, inflammation and immune system. **Nutrients**, v. 8, n. 10, 2016.

POIRRIEZ, J. et al. A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 1–2, p. 61–63, 2000.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. **International journal of dermatology**. [s.l.: s.n.].

QUEIROZ-TELLES, F. et al. **Subcutaneous mycoses** *Infectious Disease Clinics of North America*, 2003.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 3–15, jan. 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225–236, abr. 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis: A neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 46–50, set. 2015.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 233–276, jan. 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; DE C L SANTOS, D. W. Challenges in the Therapy of Chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 175, n. 5–6, p. 477–488, 2013.

RADTKE, J.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Phenolsaurezufuhr erwachsener in einem bayerischen teilkollektiv der nationalen verzehrstudie. **Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft**, v. 37, n. 2, p. 190–197, 1998.

RAJENDRAN, C. et al. Chromoblastomycosis in India. **International Journal of Dermatology**, v. 36, n. 1, p. 29–33, jan. 1997.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189–207, 20 jul. 2006.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the

fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized fungi in human disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 884–928, out. 2010.

RIVITTI, E. A.; AOKI, V. **Deep fungal infections in tropical countries** **Clinics in Dermatology**, 1999.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–88, abr. 2011.

RUBIN, H. A et al. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, n. 5 Pt 2, p. 951–954, 1991.

RYDER, N. S.; LEITNER, I. Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 39, n. 1, p. 91–5, 2001.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, p. 1–8, 1988.

SALAS, M. P. et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1411–1415, 2011.

SALGADO, C. G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 46, n. 1, p. 33–36, 2004.

SALGADO, C. G. et al. Cutaneous diffuse chromoblastomycosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 8, p. 528, ago. 2005.

SALGADO, C. G. et al. Cutaneous localized annular chromoblastomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 36, n. 2, p. 257–261, fev. 2009.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.

112, n. 2, p. 319–326, 2007.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. Fitoterapia racional : um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. [s.l.] Manole, 2002.

SERPA, R. et al. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. PART12, p. 1704–1708, 1 dez. 2012.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2011.

SHARMA, N. et al. Microwave-Assisted Efficient Extraction and Stability of Juglone in Different Solvents from *Juglans regia*: Quantification of Six Phenolic Constituents by Validated RP-HPLC and Evaluation of Antimicrobial Activity. **Analytical Letters**, v. 42, n. 16, p. 2592–2609, 2009.

SHI, Z. C.; LEI, P. C. Occupational mycoses. **British journal of industrial medicine**, v. 43, n. 7, p. 500–1, 1986.

SILVA, C. M. et al. The coconut babaçu (*Orbignya phalerata* martins) as a probable risk of human infection by the agent of chromoblastomycosis in the State of Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 1, p. 49–52, 1995.

SILVA, J. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: A retrospective study of 325 cases on Amazonic region (Brazil). **Mycopathologia**, v. 143, n. 3, p. 171–175, 1998.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2002.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características Farmacológicas Gerais das Plantas Medicinais. **Infarma**, v. 16, p. 13–14, 2005.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free radical biology & medicine**, v. 29, n. 3–4, p. 375–83, ago. 2000.

SOARES, V. C. G.; VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 835–838, jun. 2006.

SPINELLO, A. et al. Metal Ions and Metal Complexes in Alzheimer's Disease. **Current pharmaceutical design**, v. 22, n. 26, p. 3996–4010, 2016.

SUCHER, N. J.; CARLES, M. C. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, 2015.

TAKASE, T.; BABA, T.; UYENO, K. Chromomycosis. A Case with a Widespread Rash, Lymph Node Metastasis and Multiple Subcutaneous Nodules: Chromomykose. Ein Fall mit ausgedehntem Rash, Lymphknotenmetastasen und multiplen subkutanen Knoten. **Mycoses**, v. 31, n. 7, p. 343–352, jul. 1988.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, n. November 2011, p. 265–271, 2014.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Chromoblastomycosis. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 4, p. 403–8, 2012.

UNGPAKORN, R.; REANGCHAINAM, S. Pulse itraconazole 400 mg daily in the treatment of chromoblastomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, p. 245–247, 2006.

VIJAYA, K.; ANANTHAN, S. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. **Indian J Pharm Sci**, v. 58, n. 5, p. 191–193, 1996.

WICZKOWSKI, W. et al. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 5, p. 885–888, 2008.

ZEPPENFELDT, G.; RICHARD-YEGRES, N.; YEGRES, F. Cladosporium carrionii: hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. **Revista iberoamericana**, 1994.

ZHANG, J. et al. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. **Mycoses**, v. 52, n. 2, p. 176–81, mar. 2009.