

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS E ANIMAIS DA REGIÃO DO CARIRI

Karla K. A. Santos¹

Edinardo F.F. Matias¹

Thiago S. Almeida²

José G. M. Costa^{2,3}

Henrique D.M. Coutinho⁴

Resumo

Fungos dermatofíticos são patógenos oportunistas, cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. O gênero *Trichophyton* é composto por diversas espécies, dentre as quais *Trichophyton rubrum* se destaca pela frequência com que é isolado, podendo produzir praticamente todos os quadros clínicos de dermatofitose. Suas características principais são a tendência à cronicidade e a resistência aos tratamentos convencionais. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito antifúngico através da técnica de diluição em HIA de extratos de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e produtos naturais de *Rhinella jimi*. Os extratos de *C. campestris* e *O. gratissimum* demonstraram atividade antifúngica, assim como os extratos, frações e solução de *R. jimi*, com exceção da fração hexânica do extrato metanólico. Estes resultados indicam que os organismos testados devem ser estudados como uma possível fonte de produtos naturais com atividade antifúngica, principalmente contra dermatófitos.

Palavras-Chave: dermatófitos, fungos, *Trichophyton rubrum*, *Rhinella jimi*, *Croton campestris*, *Ocimum gratissimum*

¹ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE);

² Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

Antifungal activity of animal and plant extracts from the region of Cariri

Abstract

Dermatophytic fungi are opportunistic pathogens with etiological agents mainly on the genus *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. The main pathogen of the genus *Trichophyton* is *T. rubrum*, due its isolating frequency and producing all clinical features characterized as dermatophytosis. The main characteristics of this pathogen are the high probability of a chronic infection and the resistance to the usual clinical treatments. This work was realized with the objective to evaluate the antifungal effect of extracts and other natural products of *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. and *Rhinella jimi* (Stevaux) by the dilution method using HIA. All natural products assayed shown antifungal activity, except the hexane fraction of the methanol extract from *R. jimi*. These results indicate that these organisms must be studied as a possible source of natural compounds with antifungal activity, mainly against dermatophytic ones.

Key-words: dermatophytes, fungi, *Trichophyton rubrum*, *Rhinella jimi*, *Croton campestris*, *Ocimum gratissimum*

3 Faculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte (CE), Brasil;

4 Doutor em Farmacologia pela UFPB. Professor efetivo da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Ano IV - Vol. 1- Nº 2 2010

Introdução

Fungos dematiáceos ou demáceos são caracterizados por apresentarem pigmentação melaninogênica em suas paredes celulares, que é a principal característica do grupo dos fungos escuros. Alguns autores têm mostrado os fungos dematiáceos como patógenos oportunistas geralmente com baixa patogenicidade, que poderiam entrar no corpo humano ou animal por inoculação traumática repetida (WARNOCK; JOHNSON, 1991; WILHELMUS, 2005). As dermatofitoses, cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica (CHIMELLI et al., 2003).

O gênero *Trichophyton* é composto por vinte e duas espécies identificadas, dentre as quais se destaca *Trichophyton rubrum*, que pode produzir praticamente todos os quadros clínicos de dermatofitose e tem como

características principais a tendência para cronicidade e a resistência aos tratamentos convencionais (LACAZ et al., 1998; VELAZQUEZ, 2002). Vários motivos são aventados para explicar o aumento da incidência destas dermatofitoses nas últimas décadas, entre eles: o uso abusivo de antibióticos, drogas imunossupressoras e citostáticas, bem como o aparecimento de pacientes com HIV/SIDA, os quais constituem alvo para o desenvolvimento destas infecções (LACAZ et al., 1991; SIDRIM; MOREIRA, 1999). A terapia anti-dermatofítica é realizada através da utilização de alguns antifúngicos como anfotericina B, 5-fluorocitosina e itraconazol (MINOTTO et al., 2001; SCHWARTZ, 2004).

O uso de plantas medicinais na medicina popular está espalhado por todo o mundo (HERNÁNDEZ et al., 2003). Com base neste amplo uso de plantas para fins medicinais, diversas espécies de plantas foram estudadas em relação a seu perfil fitoquímico e propriedades farmacológicas (DUARTE et al., 2005; MANSARAY, 2000). A

atividade antifúngica de plantas medicinais e derivados foi cientificamente provada em ensaios com óleos essenciais, extratos, fitoalexinas, cumarinas, terpenos, flavonóides, amidas, imidas e alcalóides (AQUINO et al., 2003; DAFERA et al., 2003; GAYOSO et al., 2005; SOUZA et al., 2005).

O gênero *Croton*, que possui 700 espécies, com distribuição pantropical, das quais a maioria ocorre nas Américas. (HELUANI et al., 2000; LIMA, 2008). A espécie *Croton campestris* A., popularmente conhecida como velame-do-campo, é um arbusto originário do Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões sudeste e nordeste (CORRÊA, 1975), possuindo largo emprego popular como poderoso depurativo, usado no combate à escrofulose, doenças venéreas, impingens, tumores, moléstias de pele, reumatismo, úlcera do útero, diarreia e artrismo (CRUZ, 1982).

Ocimum gratissimum L., é um subarbusto aromático, originário da Ásia e África (LORENZI et al. 2002; MARTINS et al., 2008). Conhecida como alfavaca, manjeriço, suas folhas

são usadas na medicina popular. A bioatividade do óleo essencial encontrado nas folhas dessa espécie tem sido verificada sobre organismos de elevada patogenicidade, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Leishmania amazonensis* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006; MATASYOH. et al., 2007; MARTINS et al., 2008).

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (UGAZ, 1994; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Acredita-se que cerca de 80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (YAMADA, 1998; GRAGG et al., 1997). O uso de extratos como agentes antimicrobianos, apresenta um baixo risco de aumento da resistência microbiana a sua ação, porque são misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para

adaptabilidade microbiana (DAFERERA et al., 2003).

A pele dos Anuros apresenta um verdadeiro arsenal de produtos químicos naturais, com diversas atividades biológicas. A partir da pele desses animais, já foram isolados mais de 300 compostos bioativos, pertencentes a cinco grupos químicos: aminas biogênicas, peptídeos, proteínas hemolíticas, alcalóides e esteróides. Farmacologicamente, esses compostos são capazes de agir como irritantes locais, cardio, mio e neurotoxinas, agentes colinomiméticos, simpatomiméticos, alucinogênicos, agentes citotóxicos e inibidores de crescimento de bactérias, fungos e protozoários e participam de um eficiente sistema de defesa contra o ataque de predadores (LAZARUS; ATTILA, 1993; ERSPAMER, 1994; DALY, 1995; CLARKE, 1997; RINALDI, 2002). Os anuros podem ser considerados o maior depósito natural de compostos alcaloídicos do reino animal (DALY et al., 2004).

Rhinella jimi está geograficamente distribuído em toda a região nordeste do Brasil, tanto em lugares de baixas altitudes, como em

lugares de altitudes elevadas, não havendo especializações entre as populações (STEVAUX, 2002). Apesar de sua ampla distribuição geográfica e de sua abundância na região Nordeste do Brasil, existem poucos estudos realizados com substâncias biologicamente ativas extraídas a partir da pele desses anfíbios, porém existem relatos de atividades microbiológicas para extratos obtidos desses animais, que demonstram atividade antileishmania e antitripanossomica, essa atividade é determinada principalmente pela ação de bufadienólídeos, que são esteróides cardiotônicos (TEMPONE et al, 2008).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito antifúngico dos extratos metanólico e hexânicos de *C. campestris* A. e *O. gravisimum* L., dos extratos metanólico e butanólico de *Rhinella jimi* e das frações metanólica, clorofórmica e hexânica, bem como da solução não alcaloídica do extrato metanólico de *Rhinella jimi*.

Material e Método

Material fúngico

A cepa de fungo utilizado foi *Trichophyton rubrum* (ATCC 1683) que foi mantido em *Heart Infusion Agar* (HIA - Difco Laboratories Ltda.) e armazenado a 4°C. Antes do ensaio, o fungo foi semeado e cultivado em HIA no período de 7-10 dias em câmara úmida.

Material animal e vegetal

Folhas de *Croton campestris* A e *Ocimum gravissimum* L., foram coletados no município de Crato, Ceará,

Brasil. O material vegetal foi identificado e uma exsicata foi depositada na respectiva identificação com números apresentados na Tabela 1. Os espécimes de *Rhinella jimi* foram coletados no município de Grangeiro-CE, a sua identificação foi realizada mediante literatura especializada (STEVAUX, 2002). Após isso, os animais foram depositados na coleção de vertebrados do laboratório de Zoologia da Universidade Regional do Cariri- URCA e identificados com os seguintes números de tombo: LZ-URCA 0469-500, 0503, 0504.0506-508.

Tabela 1. Famílias botânicas, espécies e exsicata das plantas utilizadas neste estudo.

Família	Espécie	Número	Herbário
Euphorbiaceae	<i>Croton campestris</i>	#7095	UFRN
Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum</i>	#3978	Dárdano Andrade Lima-URCA

Preparação de extratos metanólicos e hexânicos de *Croton campestris* A. (EMCC/EHCC) e *Ocimum gravissimum* L. (EMOG/EHOG)

Folhas foram coletadas, cortadas para aumento da superfície de contato e submersas em metanol e hexano separadamente por 72h. Após esse período, o material foi filtrado e

concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B – Quimis, Brazil) e banho ultratermostatizado (model Q-214M2 – Quimis, Brazil) (BRASILEIRO et al., 2006), obtendo-se

rendimentos de extratos brutos de acordo Tabela 2. A solução utilizada nos testes foi preparada a uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO e em seguida, diluída com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

Preparação do extrato butanólico e metanólico (EBRJ/EMRJ), das frações metanólica (FM), clorofórmica (FC) e hexânica (FH) e da solução não alcaloídica do extrato metanólico (SNA) de *Rhinella jimi*

Os animais foram coletados no município de Grangeiro-CE, sendo em seguida sacrificados por hipotermia e dessecados. Após a dessecação as peles foram limpas, secas em temperatura ambiente e trituradas. O extrato metanólico e butanólico da pele de *R. jimi* foi obtido por extração prolongada a frio. O solvente foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo. Na obtenção da solução não alcaloídica o extrato metanólico foi diluído em HCl a 10%, a partir do extrato bruto

metanólico, posteriormente foi feito uma partição com acetato obtendo-se uma solução aquosa alcaloídica, depois de alcalinizar até PH 9 foi realizado uma nova partição com acetato obtendo-se a solução não alcaloídica. Os rendimentos de extratos e frações são mostrados na tabela 2. Após análise por cromatografia de camada delgada, usando o reagente de Dragendorff's como agente revelador, as frações foram separadas baseadas em seus perfis cromatográficos. Grupos funcionais de compostos presentes nas frações foram identificados por análise de espectro na região do infravermelho, obtido em espectômetro PERKIN-ELMER model FT-IR spectrophotometer, spectrum 1000 usando pastilha de Kbr. A bioprospecção do extrato metanólico revelou a predominância de alcalóides, assim como terpenos, esteróides e saponinas. Nas análises espectrofotométricas na região infravermelha indica a presença de grupos NH e /ou grupos OH, que são característicos de aminas e alcoois.

Tabela 2. Preparação de extratos e frações de *C. campestris* A., *O. gravissimum* L. e *R. jimi*.

Espécie Biológica	Solvente	Rendimento(g)
<i>Croton campestris</i> A.	Metanol	1,74
	Hexano	0,87
<i>Ocimum gravissimum</i> L.	Metanol	2,49
	Hexano	1,49
<i>Rhinella jimi</i> (extratos)	Metanol	1,52
	Butanol	1,52
<i>Rhinella jimi</i> (frações)	clorofórmio	0,29
	hexano	0,23
	metanol	0,40

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima dos extratos foi determinada em HIA pelo ensaio de diluição usando suspensões de 10^5 CFU/ml e um intervalo de concentração de drogas de 512 a 32 μ g/ml (diluições seriais 1:2) (JAVADPOUR et al., 1996). As concentrações das soluções foram preparados de acordo com GAYOSO et al. (2004). O período de incubação foi

de 7-10 dias a 25°C. No fim do período de incubação, o CIM foi a menor concentração que inibiu completamente o crescimento do fungo (LIMA et al., 1993; STANGARLIN et al., 1999). O controle foi realizado através da observação da capacidade de crescimento em HIA sem adição dos extratos, frações ou solução. Cada ensaio antimicrobiano foi realizado três vezes e os resultados foram expressos como a média das três repetições (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da atividade inibitória de extratos, frações e soluções testados contra *T. rubrum* ATCC 1683

<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 1683	
Extratos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
EMCC	1024
EHCC	512
EMOG	512
EHOG	256
EMRJ	1024
FM	1024
FC	1024
FH	=2048
EBRJ	1024
SNA	512

EMCC – Extrato metanólico de *Croton campestris*; EHCC – Extrato hexânico de *Croton campestris*; EMOG - Extrato metanólico de *Ocimum gratissimum*; EHOG – Extrato hexânico de *Ocimum gratissimum*; EMRJ – Extrato Metanólico de *Rhinella jimi*; FM – Fração metanólica do extrato metanólico de *R. jimi*; FC - Fração clorofórmica do extrato metanólico de *R. jimi*; FH - Fração Hexânica do extrato metanólico de *R. jimi*; EBRJ - Extrato Butanólico de *R. jimi*; SNA – Solução não alcaloídica de *R. jimi*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 mostra o efeito antifúngico dos produtos naturais avaliados. A FH não apresentou atividade nas concentrações ensaiadas, enquanto as demais substâncias confirmam a existência de atividade antifúngica contra *T. rubrum*. O extrato hexânico de *O. gratissimum* L. demonstrou maior atividade comparado aos outros extratos utilizados. Dos produtos naturais de *R. jimi*, o que apresentou atividade de relevância clínica foi a solução não alcaloídica do extrato metanólico de *R. jimi*.

Os extratos hexânicos de *C. campestris* e *O. gratissimum* apresentaram uma melhor atividade antifúngica que os extratos metanólicos das mesmas. Este resultado pode ser devido a presença de compostos com reconhecida atividade antimicrobiana e com características apolares, como taninos, flavonóis e terpenos, extraídos principalmente por solventes apolares como hexano.

A atividade antimicrobiana exibida por taninos é explicada pela habilidade que apresentam em complexar-se com macromoléculas tais como polissacarídeos e proteínas (HASLAM, 1996). Os flavonóides são

grupos químicos que também apresentam atividade antimicrobiana e são encontrados frequentemente nas frutas, em muitas espécies vegetais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). Há também relatos recentes de atividade antibacteriana e antifúngica de terpenos (POPOVA et al., 2009).

A solução não alcaloídica do extrato metanólico de *R. jimi* apresentou a melhor atividade antifúngica comparada com os outros produtos naturais do mesmo. Estes resultados são interessantes, pois é amplamente reconhecida a atividade antimicrobiana dos alcalóides, mas no nosso experimento, uma solução destituída destes compostos demonstrou atividade antifúngica, sugerindo que outras substâncias estão envolvidas nesta atividade. Este se trata do primeiro artigo descrevendo atividade antifúngica de produtos naturais da pele de *R. jimi* (HASLAM, 1996; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003; POPOVA et al., 2009).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram a forte ação antifúngica com relevância clínica para os extratos vegetais de *C. campestris* A. e *O. gratissimum* L. Estes dados são promissores e poderão incentivar futuras pesquisas sobre aspectos farmacológicos e toxicidade de subprodutos de *C. campestris* A., *O. Gravissimum* L. e *R. jimi* a fim de apoiar a sua possível utilização racional da terapêutica antifúngica.

Referências Bibliográficas

1. Warnock DW, Johnson EM. Clinical manifestations and management of hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis and other uncommon forms of fungal infection in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson MD, editores. Fungal infection in the compromised patient. Chichester: John Wiley & Sons; 1991; p. 756-89.
2. Wilhelmus KR. Climatology of dematiaceous fungal keratitis. Am J Ophthalmol. 2005; 140(6): 1156-7.
3. Chimelli PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins J. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. Rev Inst Med Trop. 2003; 45: 259-63.
4. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação: Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico. Editora SARVIER-FAPESP, São Paulo, 1998.
5. Velazquez AJMD, Goldstein MHMD, Driebe WTMD. Preseptal cellulitis caused by *Trichophyton* (Ringworm). Cornea. 2002; 21(3): 312-14.
6. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia médica. 8º ed. Editora Sarvier, São Paulo, 1991.
7. Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Editora Guanabara Koogan, São Paulo, 1999.
8. Minotto R, Bernardi CDV, Mallman LF, Edelweiss MIA, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis: a review

1. Warnock DW, Johnson EM. Clinical manifestations and management of hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis and other uncommon forms of fungal infection in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson MD, editores. Fungal infection in the compromised patient. Chichester: John Wiley & Sons; 1991; p. 756-89.

- of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 44(4): 585-92.
9. Schwartz R. Superficial fungal infections. *Lancet*. 2004; 364(9440): 1173-82.
 10. Hernández T, Canales M, Avila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A et al. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitán de las Salinas, Puebla (México). *J Ethnopharm*. 2003; 88(1): 181-8.
 11. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharm*. 2005; 97(2): 305-11.
 12. Mansaray MO. Herbal remedies - food or medicine? *Chem Ind*. 2000; 20(16): 677-8.
 13. Aquino PLP, Lima EO, Farias MP, Freire KRL, Souza EL, Cechinel Filho V et al. Atividade antifúngica de maleimidias contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*. *Rev Bras Anal Clin*. 2003; 35(4): 191-4.
 14. Daferera DJ, Ziogas, BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protect*. 2003; 22(1): 39-4.
 15. Gayoso CW, Lima EO, Oliveira VT, Pereira FO, Souza EL, Lima IO et al. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*. 2005; 76(2): 247-9.
 16. Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. *Braz Arch Biol Technol*. 2005; 48(2): 245-50.
 17. Heluani CS, Catalan CAN, Hernández LR, Tapia EB, Natan PJ. Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. *J Nat Prod*. 2000; 63: 222-5.
 18. Lima LR, Pirani JR. Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotrop*. 2008; 8(2): 177-231.
 19. Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal; 1975.
 20. Cruz GL. Dicionário das plantas úteis do Brasil. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. EDEL; 1982.
 21. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002; p. 512.
 22. Martins JR, Alvarenga AA, Castro EM, Silva APO, Oliveira C, Alves E. Leaf Anatomy of alfavaca-cravo plants cultivated under colored nets. *Cienc Rural* 2009; 39(1): 82-7.
 23. Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Diaz JA, Korehisa Maza P, Prado Dias Filho B, Aparicio Garcia Côtéz

- D et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int.* 2006; 55(2): 99-105.
24. Matasyoh LG, Matasyoh JC, Wachira FN, Kinyua MG, Thairu AWM, Mukiyama TK. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *Afr J Biotechnol.* 2007; 6(6): 760-65.
 25. Ugaz OL. Investigación Fitoquímica; Fondo Editorial. Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima: Peru, 1994.
 26. Cechinel Filho V, Yunes RA. *Quim Nova.* 1998; 21: 99.
 27. Yamada CSB. *Racine.* 1998; 2: 50.
 28. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. *J Nat Prod.* 1997; 60: 52.
 29. Lazarus LH, Attila M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Prog Neurobiol.* 1993; 41(4): 473-507.
 30. Erspamer V. In amphibian biology: bioactive secretions of the amphibian integument. Heatwole, E., Ed. 178-350.
 31. Daly JW. Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. *Braz J Med Biol Res.* 1995; 28: 1033-42.
 32. Clarke BT. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol Rev.* 1997; 72: 365-79.
 33. Rinaldi AC. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6: 799-804.
 34. Daly JW, Noimai N, Kongkathip B, Kongkathip N, Wilham JM, Garraffo HM et al. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. *Toxicon.* 2004; 44(8): 805-15.
 35. Stevaux MN. A new species of *Bufo* Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. *Rev Bras Zool.* 2002; 19 suppl 1: 235-42.
 36. Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, Andrade Jr HF et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* paratoid macrogland secretion. *Toxicon.* 2008; 52: 13-21.
 37. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Ciênc Farmacêut.* 2006; 42: 195-202.
 38. Javadpour MM, Juban MM, Lo W.C, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM. *De novo* antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem.* 1996; 39: 3107-13.
 39. Gayoso CW, Lima EO, Souza EL. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α -pineno e β -pineno sobre fungos isolados de oncomicoses. *J Bras Fitomed.* 2004; 1: 25-9.

40. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. *In vitro* antifungal activity of essential oil obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 1993; 36: 333-6.
41. Stangarlin JR, Schwan-Estrada KR, Cruz MES, Nagaki MH. Plantas medicinais e controle de fitopatógenos. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*. 1999; 2: 16-22.
42. Haslam E. *J Nat Prod*. 1996; 59: 205-16.
43. Zuanazzi JAC, Montanha JA. Flavonóides. In: Simões CMMO. et al. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003; p. 577-614.
44. Popova MP, Chinou IB, Marekov IN, Bankova VS. Terpenes with antimicrobial activity from *Cretan propolis*. *Phytochemistry*. 2009; 70(10): 1262-71.