

**Pensando em não pegar UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL – UFRGS
Faculdade de Farmácia**

Trabalho de Conclusão das Disciplinas de TCCI e TCCII

**Atividade Antifúngica das Flores de Girassol (*Helianthus
annuus*) contra cepas de *Sporothrix schenckii***

Júlia Bijoldo Fontoura

Porto Alegre, junho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão das Disciplinas de TCCI e TCCII

Atividade Antifúngica das Flores de Girassol (*Helianthus annuus*) contra cepas de *Sporothrix schenckii*

Júlia Bijoldo Fontoura

Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques

Orientadora

Profa. Msc. Rafaela Marin

Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2010

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Prof.^a Amélia T. Henriques por aceitar orientar este trabalho, pela oportunidade de realizá-lo em seu laboratório assim como pelo apoio prestado.

À Prof.^a Rafaela Marin, pela dedicação, paciência e ensinamentos desde a realização dos experimentos até a elaboração do texto.

À Carolina Passos pela atenção dada e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

À D. Marinês Breda e Manuela C. Breda pelo envolvimento na busca das amostras assim como pela gentil ajuda na compra e transporte das mesmas até Porto Alegre.

À Prof.^a Maria Lúcia Scroferneker pela colaboração com os experimentos antifúngicos e à Cheila Stopiglia pela ajuda, explicações e prontidão nas horas de dúvida.

Este trabalho foi elaborado em formato de artigo, de acordo com as normas estabelecidas pela revista *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases* apresentadas no ANEXO I.

Resumo

A incidência de micoses vem aumentando nos últimos anos. Fatores como toxicidade, interações e, principalmente, a resistência apresentada aos fármacos antifúngicos atualmente disponíveis, tornam necessária a busca de novos compostos com essa atividade. Tendo em vista a abundância, o fácil cultivo e a potencial ação antifúngica do girassol (*Helianthus annuus*), o objetivo deste trabalho foi verificar as atividades inibitória e fungicida de extratos das flores do raio e do disco desta espécie contra o fungo *Sporothrix schenckii*, causador da esporotricose, e determinar a quantidade de compostos fenólicos totais dos mesmos. As amostras foram testadas contra cinco cepas de *S. schenckii* através do método de microdiluição em caldo. Foram observadas atividades inibitórias contra todas as cepas empregadas e em todas as concentrações testadas, com concentrações inibitórias mínimas variando de 3,59 a 14,58 mg ml⁻¹ e concentrações fungicidas mínimas variando entre 7,19 e 57,5 mg ml⁻¹. Na quantificação de compostos fenólicos totais foram encontrados valores de 31,15 e 34,69 mg ácido gálico g⁻¹ de extrato seco nos extratos de flores do raio e do disco, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que o girassol é uma potencial fonte de substâncias antifúngicas contra *S. schenckii* que podem representar uma futura alternativa no tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: ANTIFÚNGICO, ESPOROTRICOSE, CIM, CFM, FLORES.

Introdução

Durante muitos séculos, preparações a base de plantas constituíram os principais tratamentos contra as inúmeras doenças que acometiam a humanidade. Com o avanço científico, muitos produtos naturais foram identificados e isolados, possibilitando tratamentos mais eficazes. O Reino vegetal forneceu aproximadamente 25% dos fármacos de origem natural utilizados atualmente e continua sendo uma fonte rica em compostos ativos devido a sua vasta diversidade química ^[1].

O girassol (*Helianthus annuus* – Asteraceae) é uma erva de crescimento anual que pode alcançar mais de 3,5 m de altura, dependendo das condições em que é cultivada ^[2]. Esta espécie é uma das cinco principais oleaginosas no panorama mundial ^[3] e por esse motivo há uma grande quantidade de estudos realizados com as sementes e o óleo. Entretanto pouca atenção é dada às demais partes da planta. Para as flores, hastes e folhas foram relatados diversos metabólitos secundários, como compostos fenólicos ^[4,5], cumarinas ^[6,7], flavonóides ^[6], e terpenóides ^[8-11].

Em ensaios antifúngicos realizados com extratos metanólicos das flores foram verificadas atividades inibitórias significativas, principalmente contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* ^[5]. Embora os testes tenham apresentado atividades antifúngicas consideráveis foram realizados apenas com fungos patogênicos a vegetais, com a finalidade de determinar marcadores para identificação de genótipos resistentes da planta ^[5]. Esses dados apontam a importância de avaliar a atividade antifúngica do girassol frente a outros fungos, especialmente aqueles que podem infectar os humanos. Um exemplo é o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, agente causador da esporotricose. O patógeno está presente no ambiente na forma de hifas e é encontrado em espinhos, madeira, plantas e no solo. A infecção se dá principalmente por inoculação

traumática das conídias do fungo na pele ou tecido subcutâneo do hospedeiro onde se diferenciam na forma de levedura ^[12].

A esporotricose é uma micose amplamente distribuída no planeta, sendo mais frequente em países de zonas tropicais e subtropicais ^[13]. Pode manifestar-se de três formas principais, possivelmente relacionadas com a virulência da cepa infectante ^[14]: a forma cutânea fixa, que apresenta lesões verrucosas no local da inoculação; a forma linfocutânea, a mais comum de todas, representando aproximadamente 80% dos casos e caracterizada pelo aparecimento de nódulos que seguem trajetória linfática regional; e a forma disseminada, na qual o fungo atinge a corrente sanguínea do hospedeiro ^[15]. Esta última é a menos incidente de todas e se estabelece principalmente em pacientes imunocomprometidos, especialmente portadores do vírus HIV, alcoolistas, diabéticos e transplantados ^[13], sugerindo que o fungo é um patógeno oportunista ^[12]. A micose sistêmica pode ser contraída através da inalação de conídias, levando à infecção pulmonar e subsequente disseminação pelos ossos, olhos, sistema nervoso central e vísceras ^[16].

As lesões da forma linfocutânea podem curar-se espontaneamente após semanas ^[16], mas a maioria dos pacientes necessita utilizar medicamentos por longo período ^[13]. O tratamento para todas as formas da doença geralmente é sistêmico e o arsenal terapêutico é constituído principalmente por solução saturada de iodeto de potássio, itraconazol e anfotericina B, fármacos com problemática já conhecida ^[17]. Se negligenciada, a esporotricose sistêmica pode ser fatal ^[18].

Fatores como toxicidade, interações e biodisponibilidade insuficiente dos fármacos antifúngicos atualmente utilizados na terapia, tornam necessária a busca de novos compostos para o tratamento de micoses ^[19]. Tendo em vista a abundância, o fácil cultivo e a potencial ação antifúngica do girassol, o objetivo deste trabalho é verificar a atividade de extratos das flores do raio e disco desta espécie contra diferentes cepas do fungo *S. schenckii* e determinar o teor de compostos fenólicos totais presentes nesses extratos.

Materiais e métodos

1. Coleta do material vegetal e Preparação da amostra

Os girassóis foram coletados em fevereiro de 2010 em área de cultivo na cidade de Veranópolis – RS (Brasil) três meses após a germinação. O material foi seco a temperatura ambiente, ao abrigo da luz direta.

A matéria-prima foi separada manualmente em flores do raio e flores do disco.

Preparação dos extratos

Às flores foi acrescentado solvente de extração. O material foi submetido a maceração e posteriormente as amostras foram liofilizadas.

3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada conforme técnica modificada por Xu *et al.* ^[20] originalmente descrita por Singleton & Rossi ^[21]. Para tubos de ensaio, foram transferidos 150 µl de soluções a 5 mg ml⁻¹ dos extratos, 3 ml de água destilada, 250 µl de solução do reagente Folin-Ciocalteu e 750 µl de solução aquosa Na₂CO₃ 7%, com subsequente agitação em vórtex. Após 8 minutos, foram adicionados 850 µl de água destilada e as amostras foram deixadas em repouso ao abrigo da luz por 2 horas. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro UV-visível com comprimento de onda de 765 nm utilizando água destilada como branco. O conteúdo de fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg de GAE g⁻¹ de extrato seco), calculados através da curva de calibração realizada com as concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 12 e

14 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e $r=0,9995$. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

4. Ensaio antifúngico

4.1. Preparação do inóculo

As amostras de *S. schenckii* utilizadas no ensaio antifúngico foram obtidas de isolados clínicos fornecidos pela Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo (Ss 864) e Universidade do Rio de Janeiro (Ss s31, Ss s53, Ss s57, Ss s79).

Utilizou-se o meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico 0,165 mol l^{-1} a pH 7,0 filtrado em membrana de 0,22 μm (RPMI-MOPS).

Os fungos foram cultivados em ágar batata dextrose (PDA) (PDA/ Difco, Becton, Dickinson and Company, USA) a 35°C por 7 dias. Após o tempo de incubação, foram adicionados aproximadamente 2 ml de solução salina nos tubos e as superfícies das culturas foram suavemente raspadas com pipeta de vidro esterilizada, a fim de liberar os esporos. As suspensões obtidas foram ajustadas para exibir transmitância de 80-82% em 530 nm. Após, foi realizada diluição em meio RPMI-MOPS (1:50) para se obter uma concentração final de 10^4 UFC ml^{-1} .

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima

As amostras foram diluídas em meio RPMI-MOPS, originando soluções estoque de concentração 115 mg ml^{-1} . Como controle positivo foi utilizado itraconazol (Janssen Pharmaceutica N. V., Beerse, Belgium) solubilizado em dimetil sulfóxido (DMSO) (Vetec) e diluído em meio RPMI-MOPS nas concentrações de 16 a 0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Foram utilizadas também as cepas *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019) e *Candida krusei* (ATCC® 6258) para o controle de qualidade dos testes de diluição com o itraconazol.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas através do método de microdiluição em caldo utilizando placas de ELISA com 96 poços, de acordo com as diretrizes recomendadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* para fungos filamentosos, conforme a norma M38-A [22]. Alíquotas de 100 µl de inóculo foram adicionadas a cada poço da placa contendo 100 µl dos extratos diluídos. Foram testadas as amostras nas concentrações 57,50; 28,75; 14,38; 7,19; 3,59; 1,79; 0,89; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg ml⁻¹ e os controles de crescimento (sem extrato) e de esterilidade (sem inóculo).

A CIM foi determinada, após 46-50 horas de incubação a 35 °C, por comparação com o controle de crescimento e definida como a menor concentração de agente antifúngico que inibiu visualmente o crescimento dos fungos testados.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada de acordo com Favre *et al.* [23]. Alíquotas de 100 µl retiradas dos poços contendo as amostras que inibiram completamente o crescimento dos fungos foram transferidas para tubos de cultura contendo 2 ml de meio caldo Sabouraud-dextrose (Difco, Becton, Dickinson and Company, USA) e incubadas por 10 dias a 35 °C. A concentração fungicida mínima foi determinada como a menor concentração que preveniu o crescimento fúngico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados

1. Concentração de fenólicos totais

As quantidades de compostos fenólicos totais nos extratos ER e ED foram determinadas através da reação de oxi-redução utilizando reagente Folin-Ciocalteu. Foram encontrados valores médios de 31,15 ± 0,32 e 34,69 ± 0,55 mg GAE g⁻¹ de extrato seco nos extratos de flores do raio e do disco, respectivamente.

2. Ensaio antifúngico

2.1 Concentração inibitória mínima

As CIMs obtidas no ensaio de suscetibilidade estão representadas na tabela 1 e demonstram que as concentrações testadas de ambos os extratos exibiram atividade antifúngica contra todas as cepas. No teste de controle da qualidade do Itraconazol, as CIMs obtidas encontraram-se dentro das faixas estabelecidas pela norma M38-A do CLSI.

Nos ensaios com os extratos, foram encontradas CIMs na faixa de 3,59 a 14,38 mg ml⁻¹ sendo que ED apresentou valores ligeiramente inferiores aos obtidos com ER. A CIM obtida com ED contra Ss 864 e Ss s53 foi de 3,59 mg ml⁻¹, enquanto que para as demais cepas foi de 7,19 mg ml⁻¹. ER apresentou CIMs de 7,19 mg ml⁻¹ contra Ss 864, Ss s53 e Ss s79 e 14,38 mg ml⁻¹ frente as demais amostras do fungo. Para todas as cepas as CIMs encontradas com ED foram a metade das obtidas em ER, com exceção de Ss s79, cujos valores foram os mesmos para ambos extratos. As menores CIMs observadas para Ss 864 e Ss s53 quando testadas com os dois extratos sugerem maior sensibilidade destas cepas.

Tabela 1. CIMs obtidas com os extratos de flores do raio (ER) e flores do disco (ED) testados e do padrão Itraconazol.

Cepa	ER (mg ml ⁻¹)	ED (mg ml ⁻¹)	Itraconazol (ug ml ⁻¹)
Ss 864	7,19	3,59	0,5
Ss s31	14,38	7,19	0,5
Ss s53	7,19	3,59	0,5
Ss s57	14,38	7,19	0,06
Ss s79	7,19	7,19	0,5

2.2. Concentração fungicida mínima

As CFMs obtidas após o cultivo de amostras que apresentaram as CIMs e concentrações superiores a estas, estão indicadas na tabela 2. Ambos extratos produziram as duas menores CFM do experimento quando testados com a cepa Ss 864, apresentando valores de 7,19 mg ml⁻¹ e 14,38 mg ml⁻¹ para ED e ER, respectivamente. ED também apresentou CFMs inferiores a ER quando testado contra as cepas Ss s31 e Ss s53, com valores de 14,38 mg ml⁻¹ e 28,75 mg ml⁻¹. Este extrato, quando avaliado contra as cepas Ss s57 e Ss s79, originou concentração fungicida mínima com um valor mais elevado, 57,5 mg ml⁻¹. A mesma CFM foi observada em todas as cepas testadas com ER, com exceção de Ss 864.

Tabela 2. CFMs obtidas com os extratos de flores do raio (ER) e flores do disco (ED) testados e do padrão Itraconazol.

Cepa	ER (mg ml ⁻¹)	ED (mg ml ⁻¹)	Itraconazol (ug ml ⁻¹)
Ss 864	14,38	7,19	8
Ss s31	57,5	14,38	>16
Ss s53	57,5	28,75	16
Ss s57	57,5	57,5	1
Ss s79	57,5	57,5	>16

Discussão

Fungos estão presentes em todo o ambiente e a frequência de infecções invasivas por estes microorganismos vem aumentando nos últimos anos [24]. O limitado número de classes de fármacos disponível para tratamento de micoses assim como o aparecimento de fungos multirresistentes estimula a pesquisa para a descoberta de novos agentes antifúngicos, incluindo derivados de plantas medicinais, que são conhecidas fontes de compostos ativos [25].

O tratamento da esporotricose é realizado principalmente com solução saturada de iodeto de potássio, itraconazol e anfotericina B ^[15]. Não obstante, o uso indiscriminado destes fármacos levou ao aparecimento de isolados resistentes, inclusive ao itraconazol, que em geral apresenta bons resultados contra a infecção ^[26,27]. Alternativas terapêuticas são importantes no manejo de casos de resistência, principalmente em pacientes imunocomprometidos que são mais suscetíveis a infecções oportunistas ^[28].

Neste trabalho, encontrou-se atividade inibitória de flores de *Helianthus annuus* frente a cinco cepas do fungo dimórfico *S. schenckii*. Foram observadas menores CIMs e maior teor de compostos fenólicos no extrato das flores do disco. Muitos estudos evidenciam que a produção de certos metabólitos secundários pode ser induzida através de estresse ao vegetal, como, por exemplo, ataque de microorganismos ^[29]. Por consequência, frequentemente a atividade antifúngica tem sido atribuída a muitas destas substâncias ^[29]. Prats et al. [5] observaram que no girassol a biossíntese de compostos fenólicos é induzida após infecção por fungos como mecanismo de defesa. Em análise do teor de fenólicos totais dos extratos testados e dos resultados obtidos no ensaio antifúngico, observou-se que as menores CIMs e CFMs foram exibidas pelo extrato com maior quantidade de fenólicos totais, sugerindo que estes compostos estejam relacionados com a atividade inibitória encontrada.

Em seu trabalho, Prats et al. [5], já haviam observado atividade antifúngica do girassol ao testar extratos metanólicos da corola e das brácteas contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, obtendo inibição de aproximadamente 100% do crescimento das hifas com amostras de genótipos resistentes da planta. Nesse mesmo estudo, em extrato acetona/metanol das corolas, foi observada a presença de duas cumarinas, aiapina e escopoletina, ambas já testadas em ensaios de suscetibilidade contra alguns fungos como *S. sclerotiorum*, *Helminthosporium carbonum*, *Cladosporium herbarum* e *Pythium*, apresentando capacidades inibitórias variadas ^[30]. Além disso, em ensaios com *S. sclerotiorum*, atividade antifúngica também foi atribuída a outros compostos isolados do girassol como os fenólicos dimetoxiencecalina, 3-acetil-4-hidroxiacetofenona e 3-acetil-4-

acetoxiacetofenona, isolados das brácteas ^[4] e até mesmo uma proteína, SAP 16, isolada das flores ^[31].

Apesar das CIMs relativamente baixas verificadas nos ensaios, observou-se que os extratos foram capazes de matar os fungos em concentrações de 2 a 8 vezes maiores. O resultado obtido sugere que as amostras podem apresentar substâncias antifúngicas com potencial inibitório relevante. Estas poderiam estar presentes em concentrações suficientes para inibir o crescimento dos microorganismos, mas em baixas concentrações para provocar sua morte. Em vista disso, estudos posteriores visarão o fracionamento e isolamento buscando a identificação da (s) substância (s) responsável (is) pela atividade.

Como esperado, nos testes de suscetibilidade dos fungos aos agentes testados, itraconazol apresentou baixas CIMs, muito inferiores às das amostras. Possivelmente essa diferença seria menor se os extratos testados fossem fracionados ou se os constituintes do mesmo fossem isoladas. Itraconazol é o fármaco de escolha na maioria das formas de manifestação da esporotricose mas, apesar disso, a correlação entre a resposta terapêutica aos fármacos *in vivo* e os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* ainda é controversa ^[18].

As baixas CIMs obtidas com extratos das flores do raio e do disco, assim como a abundância de matéria-prima sugerem que o girassol representa uma potencial fonte de substâncias antifúngicas contra *S. schenckii* que deve ser explorada. Os compostos responsáveis pela atividade, assim como seu espectro de ação são questões a serem elucidadas em estudos posteriores.

Referências

1. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; **27**: 1-93.
2. Helianthus annuus. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Ecocrop. Acesso: 13/06/10. Disponível em: <<http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=1191>>

3. Oilseeds: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service: United States Department of Agriculture (FAS:USDA). Acesso: 13/06/10. Disponível em:<http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2010/June/oilseeds_full06-10.pdf>
4. Prats E, Galindo JC, Bazzalo ME *et al.* Antifungal activity of a new phenolic compound from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype. *J Chem Ecol* 2007; **33**:2245–2253.
5. Prats E, Bazzalo ME, León A, Jorrín JV. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica* 2003; **132**: 321–329.
6. Prats E, Rubiales D, Jorrín J. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia Helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2002; **60**: 155 – 162.
7. Gutierrez M, Parry A, Tena M, Jorrin J, Edwards R. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 1995; **38**: 1185-1191.
8. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K *et al.* Triterpene glycosides from the flower petals of sunflower (*Helianthus annuus*) and their anti-inflammatory activity. *J Nat Prod* 2007; **70**: 813-816.
9. Macías FA, Molinillo JMG, Varela RM, Torres A. structural elucidation and chemistry of a novel family of bioactive sesquiterpenes: heliannuolsT9I. *J Org Chem* 1994; **59**: 8261-8266.

10. Díaz-Viciedo R, Hortelano S, Girón N *et al.* Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **369**: 761–766.
11. Macías FA, Varela RM, Torres A, Molinillo JMG. New bioactive plant heliannuols from cultivar sunflower leaves. *J Nat Prod* 1999; **62**: 1636-1639.
12. Fernandes KSS, Coelho ALJ, Lopes Bezerra LM, Barja-Fidalgo C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology* 2000; **101**: 563-569.
13. Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol* 2007; **25**: 181–187.
14. Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen H-D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect* 2006; **12**: 1077–1081.
15. Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2006; **78**: 293-308.
16. De Araujo T, Marques AC, Kerdel F. Sporotrichosis. *Int J Dermatol* 2001; **40**: 737-742.
17. Denning DW & Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol* 2010; **18**: 195 – 204.
18. Kohler LM, Hamdan JN, Ferrari TCA. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and in vitro analysis for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **58**: 117– 120.

19. Melo e Silva F, De Paula JE, Espindola LS. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses* 2009; **52**: 511–517.
20. Xu BJ, Chang SKC. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* 2007; **72**: 159 - 166.
21. Singleton VL & Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; **16**:144 -158.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard. Vilanova: NCCLS 2002: 221–7.
23. Favre B, Ghannoum MA, Ryder NS. Biochemical characterization of terbinafine-resistant *Trichophyton rubrum* isolates. *Medical mycology* 2004; **42**: 525-529.
24. Webster D. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of ethnopharmacology* 2008; **115**: 140 – 146.
25. Johann S, Cota BB, Souza-Fagundes EM, Pizzolatti MG, Resende MA, Zani CL. Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* Kunth. *Mycoses* 2008; **52**: 499 – 506.
26. Antunes TA, Nobre MO, Faria RO *et al.* Experimental cutaneous sporotrichosis: *in vivo* evaluation of itraconazole and terbinafine. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; **42**:706-710.

27. Wroblewska M, Swoboda-Kopec E, Kawecki D, Sawicka-Grzelak A, Stelmach E, Luczak M. Infection by a dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* in a immunocompromised patient. *Infection* 2005; **33**: 289 – 291.
28. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 272 – 279.
29. Grayer RJ, Kokubun T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 2001; **56**: 253-263.
30. Urdangarín C, Regente MC, Jorrín J, De La Canal L. Sunflower coumarin phytoalexins inhibit the growth of the virulent pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Phytopathology* 1999; **147**: 441- 443.
31. Giudici AM, Regente MC, Canal L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiol Biochem* 2000; **38**: 881-888.

ANEXO I

Mycoses

Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases

Edited by:

H. C. Korting

Print ISSN: 0933-7407

Online ISSN: 1439-0507

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 53 / 2010

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2008: 26/43 Dermatology; 12/19 Mycology

Impact Factor: 1.529

Author Guidelines

General

Mycoses is dedicated to the publication of manuscripts on topics concerning medical or veterinary mycology. Studies on plant pathology or mycological papers on fungi not related to human or veterinary medicine do not lie within the scope of mycoses and will not be accepted.

Manuscripts may be published as original communication of normal or short length (Short communication). Reports on single cases (Case reports) are

considered as Letters to the editor. The submission of review articles both of the mini-review and the full-length type is particularly encouraged. Only papers submitted in English will be accepted (this does not exclude the Latin text required for the description of new species or genera).

The editors reserve the right not to accept papers unless adherence to the principles given in the Declaration of Helsinki and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals (DHEW Publication NIH) is clear.

No charge is made for publication but authors will be required to pay for extensive alterations to agreed papers at proof stage.

Early View

Mycoses is covered by Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Text

Authors should aim for a concise readable style. Spelling should follow the Concise Oxford Dictionary, and The Oxford Dictionary for Writers and Editors. The

Editor reserves the right to make corrections, both literary and technical, to the papers.

All pages must be numbered consecutively in the upper right-hand corner of each page. Starting with the title page as p.1, the pages should be numbered in the following order: title page, summary and key words, text, acknowledgements, references, tables, figure legends.

The following items should each start on a separate page.

Title Page

This should bear (1) the title, (2) the names of all authors, (3) the institutions of origin with brief addresses, (4) a short title of not more than 50 characters (including spaces) to be used as a running head, (5) a list of up to eight key words for indexing purposes, and (6) the name and full postal address (with phone and fax numbers and e-mail address) of the author who will be responsible for reading the proofs (the corresponding author). The corresponding author must keep the mycoses office informed of any change in details until the paper is published. Authors should keep a copy of their manuscript.

Summary

Normally in less than 210 words, this should indicate clearly the scope and main conclusions of the paper. Original articles should have a structured abstract, comprising the five headings: Background, Objectives, Patients/Methods, Results and Conclusions.

Main Text

Papers should be divided into sections headed (1) introduction, (2) materials and methods (or patients and methods/subjects and methods if human

patients/subjects were used), (3) results, (4) discussion and (5) acknowledgements. Avoid an excess of sub-headings - two further divisions, if necessary, should be adequate.

The introduction should explain why the work was done and briefly introduce the scope and contents of the paper. Essential details should be included in materials and methods, including experimental design and statistical analysis. Results should be recorded in the past tense. The discussion should present the author's results in the broader context of other work on the subject. Acknowledgements should be as brief as possible.

References

Please verify your references before submission and send them as a plain, unstructured list. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. Avoid using 'endnote' programs for the electronic copy. All references must be cited in numerical order in the text following the Vancouver system. The numbers of references should appear in the text in brackets e.g. [1, 21] or [1-4]. If giving the names of authors in the text the following form should be used: Brown & Smith [1] or Brown et al. [2] if there are more than two authors. Unpublished observations and personal communications may be included in the text only.

The reference list should show the references in numerical order as they appear in the text. References should include the following: (1) authors (surname followed by initials), (2) year, (3) title of (a) article or (b) chapter, (4) editors (if a book), (5) title of (a) journal or (b) book, (6) volume number, (7) place of publication and name of publisher (if a book), and (8) first and last page numbers of (a) article or (b) chapter. Journal titles should be abbreviated according to the system adopted in Index Medicus.

The following format should be used:

Journal articles

(List all authors if six or fewer, list the first three then add et al. if there are seven or more).

1 Bloch B, Kretzel A. Econazole nitrate in the treatment of Candida vaginitis. S Afr Med J 1984; 58: 314-472.

Books

2 Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman, W. A. Jr & Sodeman, W. A. (eds) Pathogenic Physiology: Mechanisms of Disease. Philadelphia: W. B. Saunders, 1974: 457-72.

Work that has been submitted but not accepted for publication should not appear in the reference list but may appear in the text as unpublished observations. Work that has been accepted but not published should be included in the reference list stating the journal in which it is to appear followed by '(in press)'. Further details should be supplied as soon as possible.

Tables

These must be numbered consecutively with arabic numerals and typed on separate sheets carrying an appropriate legend and presented in a way that makes the table self-explanatory.

Numerical results should be expressed as means with the relevant standard errors and/or statistically significant differences, quoting probability levels (P-values). Three significant figures are usually sufficient for mean values and standard errors should be quoted two or three more decimals than the mean.

The only lines appearing in the table should be horizontal and all decimals should be aligned in columns. The placement of all tables should be indicated in the text, being referred to as Table 1 or Tables 2 and 3.

Units, symbols and abbreviations

SI (Système International) units should be used and should conform with the lists printed Units, Symbols and Abbreviations - A Guide for Biological and Medical Editors and Authors 4th edn as published by the Royal Society of Medicine. Nomenclature of disease should follow the International Classification of Disease, published by the World Health Organization, as far as possible.

When first mentioned, cumbersome medical names should be abbreviated for later reference in the text. Latin bi-nominals should abbreviate the genera to the initial letter after the first mention unless it begins a sentence.

Doses of drugs should be given as unit weight per body weight, e.g. mmol kg⁻¹. Rates should be expressed with negative indices. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. mmol l⁻¹, not mM.

Numerals are to be used from 10 upwards; and the 24-hour clock, e.g. 21.00 hours, should be used.

Materials

The source of all materials used should be given stating company, city of location and country.

Verification of the identity of living specimens used must take place through sequencing, or by consultation of taxonomists working at a reference centre. Specimens analyzed must remain accessible for later reference. Strains should be deposited in one of the major culture collections, and sequences in a public data

bank. Collection and sequence numbers must be cited in the text. It is recommended that new taxa are deposited in MycoBank. Descriptions of new taxa must comply with the rules of the International Code of Botanical Nomenclature.