



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**PESQUISA DE ANTIFÚNGICOS DE
ORIGEM VEGETAL**

Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Telma Sofia Rodrigues Domingos

Faro

2009



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**PESQUISA DE ANTIFÚNGICOS DE
ORIGEM VEGETAL**

Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Telma Sofia Rodrigues Domingos

Orientadora: Prof.^a Doutora Anabela Romano

Co-orientadoras: Prof.^a Doutora Célia Quintas

Doutora Sandra Gonçalves

Faro

2009

O documento apresentado é da inteira responsabilidade da autora.

Telma Sofia Rodrigues Domingos

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Doutora Anabela Romano por me ter concedido a possibilidade de fazer parte do seu grupo de trabalho, por toda a assistência e disponibilidade e por toda a força e encorajamento.

À Doutora Sandra Gonçalves pela dedicação, pela interminável paciência, pela ajuda disponibilizada e por todo o conhecimento transmitido.

À Prof.^a Doutora Célia Quintas por me ter recebido no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve, pela disponibilidade incomparável e por todos os esclarecimentos prestados.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal por me terem acolhido e me terem feito sentir bem-vinda. Agradeço particularmente ao Tomás Grevenstuk por toda a ajuda com o material vegetal e com as fotografias.

A todos do Laboratório de Microbiologia por me terem feito sentir em casa, pelo auxílio em alturas complicadas e pelos bons momentos.

Aos meus pais, irmão e restante família pelo apoio e ânimo incondicionais ao longo destes anos.

Aos amigos que me acompanharam nesta aventura por toda a amizade, por toda a força, pela paciência e pelos bons momentos de descontração.

Sinceramente, muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

a_w	coeficiente de actividade da água
g, mg, μ g	grama, miligrama, micrograma
h	hora
MIC	concentração mínima inibitória
mL, μ L	mililitro, microlitro
mm	milímetro
MS	meio de cultura Murashige and Skoog (1962)
MUM	Micoteca da Universidade do Minho
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
$^{\circ}$ C	grau Celsius
PDA	meio de cultura <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	meio de cultura <i>Potato Dextrose Broth</i>
PYCC	Colecção Portuguesa de Cultura de Leveduras
UFC	unidades formadoras de colónias
YM	meio de cultura <i>Yeast Malt</i>

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objectivo de avaliar *in vitro* as propriedades antifúngicas de vários extractos de *Drosophyllum lusitanicum* Link. e *Drosera intermedia* Hayne. A actividade antifúngica foi avaliada em várias espécies de fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium expansum*) e leveduras de alteração alimentar (*Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*), pelo método de difusão em agar e pela determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC).

Os extractos de ambas as espécies vegetais evidenciaram um potencial antifúngico relevante. Contudo, os extractos de *D. lusitanicum* apresentaram uma capacidade inibitória superior quando comparada com a dos extractos de *D. intermedia*.

Os extractos mais eficazes foram os extractos hexânicos que deram origem a actividades antimicrobianas elevadas em todos os microrganismos, induzindo zonas médias de inibição e concentrações mínimas inibitórias apreciáveis. O extracto metanólico de *D. lusitanicum* apresentou também boas actividades inibitórias em todos os microrganismos. No caso do extracto metanólico de *D. intermedia* observou-se inibição do crescimento em todas as leveduras e nos fungos filamentosos *A. niger* MUM 03.43, *P. expansum* MUM 02.03 e estirpes de *A. fumigatus*. Os extractos aquosos, apesar de terem mostrado menor potencial antifúngico, evidenciaram também uma actividade inibitória relevante, particularmente no caso das leveduras.

Os resultados obtidos revelaram-se bastante promissores, confirmando os efeitos antimicrobianos anteriormente reportados em leveduras e bactérias e sugerindo que estas plantas podem ser uma fonte de produtos naturais para o controlo de fungos filamentosos e leveduras de contaminação alimentar. No entanto, é imprescindível identificar os compostos responsáveis por essa actividade e a sua toxicidade antes de qualquer aplicação.

Palavras-chave: Fungos filamentosos; Leveduras; Resistência; Produtos naturais; Plumbagina; Extractos vegetais; Halo de inibição; MIC.

ABSTRACT

This work was performed to test *in vitro* the antifungal properties of several extracts from *Drosophyllum lusitanicum* Link. and *Drosera intermedia* Hayne. The antifungal activity was evaluated against various species of filamentous fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium expansum*) and spoilage yeasts (*Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*), by the disc diffusion method and the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC).

The extracts of both plant species showed relevant antifungal properties. However, *D. lusitanicum* extracts showed a higher inhibitory effect compared to *D. intermedia* extracts.

The most effective extracts were the hexane extracts, to which all the microorganisms were susceptible with remarkable inhibition zones and minimum inhibitory concentrations. The *D. lusitanicum* methanol extract also showed good inhibitory activity in all microorganisms. In the case of *D. intermedia* methanol extract all yeasts and the filamentous fungi *A. niger* MUM 03.43, *P. expansum* MUM 02.03 and *A. fumigatus* strains showed growth inhibition. The aqueous extracts, despite having the lowest antifungal potential, also showed a relevant inhibitory activity, particularly in the case of yeasts.

The results obtained are very promising, confirming the antimicrobial effects previously reported in yeast and bacteria and suggesting that these plants may be a source of natural products to be used in the control of filamentous fungi and spoilage yeasts. Nevertheless, it is still necessary to identify the compounds responsible for this activity and their toxicity, before any application.

Key-words: Filamentous fungi; Yeasts; Resistance; Natural products; Plumbagin; Plant extracts; Inhibition zone; MIC.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fungos.....	1
1.1.1. Fungos nos alimentos.....	2
1.1.2. Fungos patogénicos.....	4
1.2. Caracterização dos microrganismos em estudo.....	6
1.2.1. Fungos filamentosos.....	6
1.2.2. Leveduras.....	8
1.3. Resistência a antibióticos e a conservantes alimentares.....	9
1.4. Produtos naturais e a descoberta de fármacos.....	11
1.5. Caracterização das plantas em estudo.....	11
1.5.1. <i>Drosophyllum lusitanicum</i>	11
1.5.2. <i>Drosera intermedia</i>	13
1.6. Objectivos.....	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1. Material vegetal.....	15
2.2. Preparação de extractos.....	15
2.2.1. Extracção com solventes orgânicos.....	15
2.2.2. Extracção aquosa.....	16
2.2.3. Purificação do extracto hexânico de <i>Drosera intermedia</i>	16
2.3. Microrganismos.....	17
2.4. Ensaio de actividade antifúngica para fungos filamentosos.....	18
2.4.1. Preparação do inóculo.....	18
2.4.2. Método de difusão em agar.....	18
2.4.3. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC).....	19
2.5. Ensaio de actividade antifúngica para leveduras.....	19
2.5.1. Preparação do inóculo.....	20
2.5.2. Método de difusão em agar.....	20
2.5.3. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC).....	21
2.6. Análise e tratamento estatístico dos resultados.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1. Actividade antifúngica de extractos de <i>Drosophyllum lusitanicum</i>	22
3.1.1. Fungos filamentosos.....	22

3.1.2. Leveduras	27
3.2. Actividade antifúngica de extractos de <i>Drosera intermedia</i>	31
3.2.1. Fungos filamentosos.....	31
3.2.2. Leveduras	35
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos

Os fungos são organismos eucariotas e heterotróficos incluídos no Domínio Eucarya, no Reino Fungi (Deacon, 2006). A sua parede celular é constituída por glicoproteínas e polissacáridos, principalmente glucano e quitina (Bowman & Free, 2006).

No Reino Fungi (Mycota) estão incluídas as seguintes divisões: Chytridiomycota Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, estando os fungos mais associados a problemas alimentares contidos na divisão Ascomycota (Deacon, 2006). Existem ainda os fungos mitospóricos, anteriormente denominados Deuteromicetes, em relação aos quais não é conhecida a reprodução sexuada (Deacon, 2006). Os fungos podem ser multicelulares e produzir estruturas filamentosas microscópicas sendo designados de fungos filamentosos e podem ser fungos unicelulares, como as leveduras.

Este tipo de microrganismos está adaptado a viver numa larga variedade de ambientes e nichos ecológicos constituindo um grupo microbiano muito diverso (Sullivan *et al.*, 2005). A sua relação com a espécie humana é bastante variada podendo desempenhar diversos papéis, como por exemplo (Deacon, 2006):

- causar doenças nas culturas, originando consideráveis perdas económicas;
- decompor e reciclar matéria orgânica;
- produzir metabolitos tóxicos em alimentos humanos e animais;
- originar doenças fúngicas, ou até morte, em indivíduos imunocomprometidos;
- desempenhar grande actividade bioquímica, produzindo, por exemplo, antibióticos, esteróides, ciclosporinas e enzimas alimentares;
- auxiliar no processamento alimentar de pão, produtos lácteos e bebidas alcoólicas;
- ser consumidos directamente na alimentação, como os cogumelos e o queijo;
- ser agentes de controlo biológico contra pragas e outros fungos patogénicos de plantas.

Os fungos constituíram a microbiota alvo deste estudo, nomeadamente os fungos filamentosos e as leveduras.

1.1.1. Fungos nos alimentos

Os alimentos apresentam não só um valor nutricional importante para quem os consome como também constituem um meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano. Dependendo do microrganismo e do alimento, a multiplicação microbiana pode resultar na conservação ou contaminação alimentar (Novais, 1998). Por exemplo, as leveduras presentes nos alimentos podem ser consideradas contaminantes indesejáveis ou desempenhar uma função benéfica, como nos casos em que os metabolitos secundários produzidos contribuem para os sabores e aromas do produto final (Loureiro & Querol, 1999; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). A actividade microbiana das leveduras pode ser aproveitada e utilizada na produção de alimentos, como queijos, pão ou bebidas alcoólicas.

Os microrganismos contaminantes dos alimentos variam geralmente entre fungos e bactérias, ou assumem-se como uma mistura de ambos. A existência de certos nutrientes e parâmetros físico-químicos no alimento influencia a competição entre fungos e bactérias, de modo que os melhor adaptados às condições de cada alimento prevalecerão. Os fungos tornam-se contaminantes dominantes quando a competição das bactérias diminui, o que ocorre, em geral, quando os valores de actividade da água (a_w), do pH e da temperatura são baixos, quando existem elevadas concentrações de açúcares e etanol e quando os ácidos fracos são utilizados como conservantes (Novais, 1998; Robinson *et al.*, 2000; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009). Contudo, os fungos filamentosos predominam em meios sólidos e à superfície de líquidos, devido ao facto de serem, em geral, aeróbios obrigatórios. As leveduras dispersam-se mais rapidamente em meios líquidos devido à sua natureza somática unicelular e por serem, predominantemente, aeróbias facultativas (Deacon, 2006).

A contaminação alimentar causada por leveduras consiste em alterações visíveis ou detectáveis das propriedades físicas, químicas ou sensoriais dos alimentos, como consequência da sua actividade. Entre as principais alterações alimentares que podem ocorrer, como consequência de uma contaminação por leveduras, destacam-se o crescimento à superfície do alimento, a alteração de cor, a produção de gases, a existência de turvação, a formação de precipitados e as alterações de sabor e textura (Loureiro & Querol, 1999).

A contaminação dos alimentos por fungos filamentosos é também bastante problemática dado que algumas espécies são micotoxicogénicas ou seja produzem

metabolitos secundários tóxicos, designados por micotoxinas, substâncias altamente tóxicas e cancerígenas (Aljicevic *et al.*, 2008). O consumo directo de produtos contaminados e/ou o consumo de produtos animais contaminados residualmente, como carnes, leite e derivados, constitui uma entrada inevitável das micotoxinas na cadeia alimentar (Aljicevic *et al.*, 2008). As doenças causadas pelas micotoxinas são designadas por micotoxicoses (Aljicevic *et al.*, 2008). A toxicidade causada pelas micotoxinas não é igual entre todas as produzidas pelos fungos (Aljicevic *et al.*, 2008), no entanto, a ingestão de qualquer micotoxina pode provocar toxicidade aguda ou crónica, e ter efeitos mutagénicos ou teratogénicos (Pitt, 2000). A intensidade da toxicidade é essencialmente devida à dose ingerida e ao tempo de exposição à micotoxina. A toxicidade aguda surge como consequência da exposição a altas quantidades de toxinas e pode levar à deterioração das funções renais ou hepáticas e, em casos extremos, provocar a morte (Pitt, 2000). No caso da toxicidade crónica, os efeitos tóxicos são provocados pela exposição prolongada a baixas concentrações de toxinas, podendo induzir a formação de cancro e tumores (Pitt, 2000).

O estilo de vida dos dias de hoje faz com que os consumidores apresentem uma atitude cada vez mais crítica em relação àquilo que consomem (Loureiro & Querol, 1999). Os microrganismos presentes nos alimentos têm uma grande relevância, não só pela patogenezidade de algumas espécies, como também pelas alterações indesejáveis que provocam, tornando os produtos inaceitáveis para o consumo humano.

De uma forma geral, a contaminação dos produtos destinados à alimentação tem-se tornado um problema sério na indústria alimentar, pois à escala em que os alimentos são produzidos, a existência de uma contaminação representa perdas económicas acrescidas, especialmente se as matérias-primas assumem um custo considerável na produção (Loureiro & Querol, 1999; Loureiro, 2000). A proliferação de um microrganismo num alimento depende não só da qualidade microbiológica das matérias-primas e dos procedimentos seguidos durante o processamento de um produto, como também das condições ambientais em que os produtos frescos ou processados são armazenados (Loureiro, 2000). Uma situação bastante comum de condições problemáticas de armazenamento é a que acontece com os cereais, que muitas vezes são mantidos em ambientes húmidos, permitindo o rápido desenvolvimento de fungos filamentosos e consequentemente o aparecimento de metabolitos secundários tóxicos resultantes da sua actividade (Novais, 1998; Magan & Aldred, 2007).

1.1.2. Fungos patogénicos

Os fungos podem causar uma série de doenças infecciosas, classificadas como oportunistas, superficiais ou disseminadas. As infecções oportunistas atingem exclusivamente indivíduos com sistemas imunitários debilitados. Nos casos de infecções superficiais os microrganismos estão confinados às camadas exteriores dos epitélios e quando penetram essa barreira, entrando na corrente sanguínea e disseminando por todo o corpo, são consideradas infecções disseminadas ou sistémicas (Sullivan *et al.*, 2005).

Algumas das infecções humanas mais comuns, superficiais e relativamente inócuas, estão associadas a fungos, como o caso das aftas ou do pé de atleta (Sullivan *et al.*, 2005). No entanto, as cerca de 200 espécies fúngicas consideradas patogénicas humanas (Deacon, 2006), podem também causar doenças muito mais devastadoras, como as aspergiloses invasivas ou as candidíases sistémicas, ambas com elevadas taxas de mortalidade associadas (Sullivan *et al.*, 2005).

Apesar de os humanos possuírem um nível elevado de imunidade inata em relação aos fungos, com excepção dos causadores de infecções na pele, unhas e cabelo, a situação sofre uma considerável alteração quando os alvos são indivíduos com sistemas imunitários muito debilitados, como os encontrados em ambientes hospitalares (Deacon, 2006). Os sistemas imunitários diminuídos, característicos de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV – (Sangamwar *et al.*, 2008; Geweely, 2009; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009), pacientes com leucopenia (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009), pacientes transplantados ou sujeitos a terapias anticancerígenas (Geweely, 2009; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009) pertencem aos principais grupos atingidos por doenças fúngicas, difíceis de ocorrer em pessoas saudáveis.

Certas espécies de fungos são comensais, ou seja, ocorrem naturalmente na microbiota humana (Sullivan *et al.*, 2005). Geralmente estes fungos não causam nenhum dano, no entanto, em certas condições, como as referidas anteriormente, podem despoletar efeitos sintomáticos ou tornarem-se invasores. Algumas leveduras do género *Candida*, por exemplo, estão associadas ao comensalismo humano, ocorrendo naturalmente nas suas mucosas, mas ainda assim, são precursoras de doenças designadas por candidíases (Sullivan *et al.*, 2005; Deacon, 2006).

Os fungos filamentosos são considerados agentes patógenos humanos e uma das razões para que sejam caracterizados como microrganismos oportunistas, é o facto de

muitos conseguirem crescer a 37°C e possuírem esporos tão pequenos, que são capazes de penetrar nos pulmões e chegar aos alvéolos (Deacon, 2006). As espécies pertencentes ao género *Aspergillus* são consideradas as mais significativas na origem de fungémias, designadas por aspergiloses, e que incluem os aspergilomas, as aspergiloses invasivas ou as aspergiloses broncopulmonares alérgicas (Sullivan *et al.*, 2005). Os aspergilomas formam-se, sobretudo em indivíduos com poucas defesas, quando um esporo atinge os pulmões e germina formando colónias densas no tecido pulmonar (Deacon, 2006). As aspergiloses invasivas são as mais relevantes formas de aspergilose em sistemas imunitários severamente comprometidos. Aparecem como consequência de detecções tardias de colonização pulmonar, com a consequente proliferação das mesmas, às vezes até no sistema circulatório, podendo chegar aos diversos órgãos do corpo e causando a morte. As aspergiloses broncopulmonares alérgicas surgem como um mecanismo alérgico aos produtos tóxicos produzidos por células de microrganismos do género *Aspergillus*, colonizadoras do tracto respiratório superior de indivíduos com problemas respiratórios (Sullivan *et al.*, 2005).

Tem também sido referido que as micotoxinas produzidas por alguns dos fungos filamentosos, além de exercerem um efeito nocivo por ingestão de alimentos contaminados, também o podem exercer por inalação, contribuindo para um problema relativamente recente e designado por “sick building syndrome” (Sullivan *et al.*, 2005). Este termo tem sido utilizado para descrever as doenças ou indisposições que os ocupantes de determinados edifícios experimentam e que parecem estar ligadas ao período de permanência nesse edifício (Terr, 2009). Os sintomas não são específicos e em geral incluem fadiga, pequenos problemas respiratórios, dores de cabeça, ansiedade, perturbações no sono e dificuldades de concentração (Sullivan *et al.*, 2005; Terr, 2009). A maioria das construções fornece nichos adequados para o crescimento de certos fungos filamentosos, acarretando consigo a produção de micotoxinas. Entre algumas causas que podem contribuir para este acontecimento são de mencionar a má qualidade do ar e ventilação, as contaminações microbianas e até as limpezas constantes com produtos químicos, que representam um foco de resistências para os microrganismos (Sullivan *et al.*, 2005).

1.2. Caracterização dos microrganismos em estudo

1.2.1. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium expansum* fazem parte do conjunto de microrganismos utilizados no presente trabalho. Estas espécies foram cedidas pela Micoteca da Universidade do Minho como sendo produtoras de micotoxinas. Na Tabela 1 estão resumidos os principais alimentos onde os referidos fungos podem causar problemas e algumas das micotoxinas produzidas.

Para além da produção de micotoxinas, alguns dos fungos filamentosos estudados têm revelado uma série de características e particularidades que os tornam interessantes industrialmente e outras que reforçam a sua perigosidade em termos de saúde pública, nomeadamente:

- *A. fumigatus*, apesar de habitualmente crescer no solo, é um fungo oportunista que se pode tornar num fungo invasivo em procedimentos cirúrgicos, podendo provocar aspergiloses invasivas nos pacientes com taxas de mortalidade associadas entre os 30% e 90% (Deacon, 2006; Osherov & Romano, 2007);
- *A. flavus* é a segunda causa mais comum, depois de *A. fumigatus*, de aspergiloses invasivas ou não invasivas (Hedayati *et al.*, 2007 citado por Fedorova *et al.*, 2009) estando também muito relacionado com infeções nos olhos (Hedayati *et al.*, 2007 citado por Bennett, 2009) e infeções pulmonares sistémicas (Larone, 2004);
- *A. niger* está associado a infeções dos ouvidos (Bennett, 2009) e provoca o aparecimento de aspergilomas (Larone, 2004); produz também alguns metabolitos primários com interesse industrial, como o ácido cítrico e também algumas enzimas, como a galactosidase (Bennett, 2009);
- *P. expansum* é um dos fungos mais comuns de contaminação de frutos (Andersen *et al.*, 2004).

Tabela 1. Principais alimentos alvo de contaminações pelas espécies de fungos filamentosos estudadas e micotoxinas por eles produzidas^a.

Fungo filamentoso	Tipos de alimentos alvo	Micotoxina produzida
<i>A. flavus</i>	Milho; cevada; nozes; especiarias; presunto curado; carnes curadas; carnes secas; mariscos secos; peixe seco salgado; peixe seco fumado; oleaginosas; algodão	Aflatoxina B1 e B2; aflatrem; aflavinas; ácidos aspergílicos; ácido ciclopiazónico; ácido kójico; ácidos neoaspergílicos; ácido B-nitropropiónico; paspalinas
<i>A. fumigatus</i>	Cevada; arroz; especiarias; presunto curado; carnes curadas; peixe seco salgado	Fumigaclavinas; fumagilina; fumigatina; fumitoxinas; fumitremorginas; gliotoxina; ácido kójico; spinulosina; triptoquivalinas; verruculogeno
<i>A. parasiticus</i>	Nozes; carnes secas; oleaginosas	Aflatoxina B1, B2, G1 e G2; aflavinina; ácidos aspergílicos; ácido kójico; ácidos neoaspergílicos
<i>A. niger</i>	Milho; trigo; cevada; nozes; especiarias; frutos secos; presunto curado; carnes curadas; mariscos secos; peixe seco salgado; peixe seco fumado; cebolas; tomates	Malforminas; nigragilina
<i>P. expansum</i>	Maçãs; pêras; uvas; mangas; tomates; abacates; sumos de frutos; cerejas; ameixas	Citrinina; patulina; ácido ciclopiazónico; aflatrem; ocratoxina A; roquefortina C

^a De acordo com Larsen (1998), Pitt (2000), Robinson *et al.* (2000), Andersen *et al.* (2004) Abnet (2007) e Aljicevic *et al.* (2008).

1.2.2. Leveduras

As leveduras de alteração alimentar *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii* foram parte dos microrganismos estudados ao longo deste trabalho. A Tabela 2 resume os principais alimentos alvos de alterações/degradações devidas à actividade das referidas leveduras.

Tabela 2. Principais alimentos contaminados pelas leveduras em estudo e efeitos gerais da sua actividade^a.

Levedura	Tipo de alimentos alvo	Principais efeitos
<i>D. hansenii</i>	Carnes curadas, fermentadas e picadas; produtos de charcutaria; iogurtes; queijos; salmouras de vegetais; saladas à base de maionese; molhos de peixe e marisco	Formação de películas e/ou filmes; aparecimento de crescimentos à superfície; produção de sabores e cheiros desagradáveis
<i>P. membranaefaciens</i>	Salmouras de azeitonas; vinhos; cerveja; ketchup; maionese; queijos; sumos de frutos	Formação de películas e/ou filmes; aparecimento de crescimentos à superfície; produção de sabores e cheiros desagradáveis
<i>S. cerevisiae</i>	Produtos transformados à base de frutos; bebidas alcoólicas; salmouras de vegetais	Aparecimento de turvações e sedimentos; alteração de aromas e sabores; ocorrência de fermentações indesejáveis
<i>Z. bailii</i>	Pickles; maionese; molhos ácidos; ketchup; sumos e refrigerantes; concentrados de maçã e uva; bebidas alcoólicas	Produção de gases e rebentamento de embalagens; ocorrência de fermentações indesejáveis

^a De acordo com Loureiro & Querol (1999), Loureiro (2000), Robinson *et al.* (2000) e Loureiro & Malfeito-Ferreira (2003).

As leveduras testadas, para além de contaminarem uma grande variedade de alimentos e bebidas, possuem características fisiológicas muito particulares que tornam o seu controlo, enquanto microrganismos contaminantes/deterioradores alimentares, muito importante e justificam a sua inclusão na microbiota alvo deste estudo. Podem assim destacar-se algumas particularidades:

- *D. hansenii* é uma levedura que possui elevada tolerância a altas concentrações de NaCl (Almagro *et al.*, 2000);
- *P. membranaefaciens* é resistente a benzoatos (Davidson & Harrison, 2002);
- *S. cerevisiae* possui uma relativa tolerância a ácidos orgânicos fracos (Quintas *et al.*, 2005) e é resistente ao etanol (Quintas *et al.*, 2000);
- *Z. bailii* é muito tolerante a ácidos orgânicos fracos (Mollapour & Piper, 2001 citado por Smits & Brul, 2005) e ao etanol (Quintas *et al.*, 2000); esta levedura possui ainda uma elevada capacidade fermentativa podendo as suas células, em repouso, produzir dióxido de carbono (Leyva *et al.*, 1999).

1.3. Resistência a antibióticos e a conservantes alimentares

Actualmente, o aparecimento de microrganismos patogénicos multirresistentes, essencialmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos, tem sido relatado em todo o mundo e tem-se tornado num alarmante problema de saúde pública (Davis, 1994; Ahmad & Beg, 2001).

Nas últimas décadas o problema das doenças fúngicas nosocomiais severas tornou-se preocupante, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Malani & Kauffman, 2007; Sangamwar *et al.*, 2008; Geweely, 2009; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Karkowska-Kuleta *et al.* (2009) sugerem que o desenvolvimento nas áreas da medicina, cirurgia e transplantação dos últimos trinta anos tem causado um aumento dramático do número de indivíduos imunodeprimidos, que são mais susceptíveis a doenças fúngicas. O uso profilático de terapias antifúngicas é também uma das causas mais frequentes de resistência a antifúngicos. Em muitos casos, a mortalidade entre os pacientes infectados é elevada, mesmo após tratamento antifúngico intensivo, devido ao nível da imunodeficiência, ao diagnóstico tardio ou a resistências ao tratamento (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

No presente cenário de emergência de múltiplas resistências aos fármacos utilizados no controlo de microrganismos patogénicos humanos, torna-se necessária e muito importante, a descoberta de novas substâncias antimicrobianas a partir de outras fontes, incluindo as plantas (Ahmad & Beg, 2001). Além disso, os compostos extraídos de plantas podem inibir o crescimento microbiano por mecanismos diferentes dos conhecidos actualmente, apresentando valores clínicos significativos e constituindo uma alternativa sócio-económica benéfica (McGaw *et al.*, 2008; Barbour *et al.*, 2004).

A conservação dos alimentos constitui igualmente um problema bastante relevante dado que a segurança alimentar é uma questão de saúde pública cada vez mais importante (Burt, 2004).

De entre as várias técnicas de preservação alimentar existentes (redução da actividade da água – a_w , embalagem a vácuo, pasteurização, adição de conservantes, entre outras) uma das formas mais utilizadas diz respeito ao uso de conservantes químicos, de que são exemplos os ácidos orgânicos fracos, como os ácidos benzóico, sórbico e propiónico (Gould, 1995). Os ácidos orgânicos fracos funcionam como agentes antimicrobianos alimentares e são utilizados devido à sua capacidade para inibir a presença de microrganismos contaminantes e assim prolongar o tempo de vida do alimento e a sua qualidade. No entanto, a evidência de que os microrganismos podem adquirir diversos níveis de resistência ou tolerância a condições de stress, reveste-se de alguma preocupação. Esta situação confere aos microrganismos patogénicos presentes nos alimentos um certo nível de protecção em relação aos agentes antimicrobianos e aos processos de preservação (Davidson & Harrison, 2002).

Considera-se que algumas das leveduras de maior perigosidade em termos de contaminação alimentar são muito resistentes/tolerantes a conservantes e ao stress osmótico. É o caso de *Zygosaccharomyces bailii*, uma das leveduras mais resistentes aos ácidos fracos utilizados na indústria (Quintas *et al.*, 2000; Piper *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2001; Davidson & Harrison, 2002).

Pelo exposto, a identificação de novas substâncias, sobretudo de origem natural, que possam ser utilizadas como conservantes na indústria alimentar e que possibilitem o contorno deste problema, torna-se importante e necessária. Além disso, os consumidores têm demonstrado um interesse crescente em alimentos de elevada qualidade, minimamente processados e isentos de conservantes, com garantias em termos de segurança e vasto tempo de vida (Brul & Coote, 1999; Fitzgerald *et al.*, 2003).

1.4. Produtos naturais e a descoberta de fármacos

A história do desenvolvimento de novos fármacos tem o seu fundamento firmemente assente no estudo de remédios naturais utilizados no tratamento de doenças ao longo dos séculos (Rishton, 2008). Segundo Samuelsson (2004) e Balunas & Kinghorn (2005), durante milhares de anos as plantas terão sido utilizadas com fins terapêuticos, assumindo inicialmente a forma de tinturas, chás, cataplasmas, pós e outras formulações de ervas. Este facto tem sido a força impulsionadora para a procura de novos compostos anti-infecciosos em investigações no campo da etnofarmacologia (Ríos & Recio, 2005).

As plantas possuem uma vasta capacidade biossintética, o que faz delas uma valiosa fonte de compostos terapêuticos (Schmidt *et al.*, 2008). Nas últimas décadas, aproximadamente um quarto das drogas utilizadas a nível mundial, são produtos naturais ou seus derivados (Balunas & Kinghorn, 2005). Os produtos naturais são ainda importantes porque funcionam como modelos para a síntese de novos compostos (Newman *et al.*, 2000). De facto, as estruturas químicas derivadas das plantas não só podem ser utilizadas directamente, como podem servir de molde à síntese química de produtos análogos. No entanto, a natureza apresenta uma larga vantagem sobre a química de síntese, essencialmente devido à diversidade estrutural das misturas de produtos naturais, que se reflecte num elevado custo por processamento de amostra e dificuldade no isolamento e caracterização de compostos activos (Lee & Schneider, 2001; Feher & Schmidt, 2003; Koehn & Carter, 2005; Schmidt *et al.*, 2008). De acordo com Schmidt *et al.* (2008) as plantas serão por muito tempo uma fonte terapêutica para além da capacidade actual da química sintética, dado o vasto número de produtos naturais e a complexidade dos metabolitos secundários produzidos por elas.

1.5. Caracterização das plantas em estudo

1.5.1. *Drosophyllum lusitanicum*

Drosophyllum lusitanicum (L.) Link (Figura 1) é uma planta carnívora que cresce ao longo da costa de Portugal, sul de Espanha e norte de Marrocos (Adlassing *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2003). Ao contrário da maioria das plantas carnívoras, esta planta tem preferência por habitats secos e áridos (Adlassing *et al.*, 2006), sendo mesmo

referida como a única existente no hemisfério norte, adaptada ao crescimento neste tipo de habitats (Garrido *et al.*, 2003). As suas características únicas têm enfatizado a distinção filogenética desta espécie, sugerindo a criação de uma família monoespecífica, a família Drosophyllaceae (Garrido *et al.*, 2003). Os habitats preferenciais de *D. lusitanicum* são encostas ensolaradas, com vegetação pouco cerrada, onde os substratos são derivados de areias ou arenito, ácidos, ricos em grandes partículas minerais e pobres em nutrientes (Müller & Deil, 2001; Correia & Freitas, 2002; Adlassing *et al.*, 2006).

D. lusitanicum tem sido considerada uma planta medicinal (Nahálka *et al.*, 1996a), desde que foram reconhecidas as suas propriedades terapêuticas. As folhas desta planta contêm flavonóides, compostos fenólicos e grandes quantidades de plumbagina (Nahálka *et al.*, 1996b; Budzianowski *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2009a). A plumbagina, também conhecida como 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, é uma naftoquinona natural que apresenta um vasto leque de actividades farmacêuticas (Nahálka *et al.*, 1996b) e que tem recebido grande atenção devido às suas propriedades antimaláricas (Likhitwitayawuid *et al.*, 1998), antimicrobianas (Didry *et al.*, 1994), anticancerígenas e anticarcinogénicas (Parimala & Sachdanandam, 1993), antimutagénicas (Hakura *et al.*, 1994), antiarteroescleróticas e hipolipidémicas (Sharma *et al.*, 1991) devido aos seus efeitos cardiotónicos (Itoigawa *et al.*, 1991) e por manifestar actividade contra infecções devidas ao vírus da imunodeficiência humana HIV-I (Min *et al.*, 2002). Estudos recentes de Gonçalves *et al.* (2009b) revelaram que o extracto hexânico desta espécie contém maioritariamente plumbagina e que a sua utilização como agente antimicrobiano manifestou boas actividades em bactérias e leveduras.

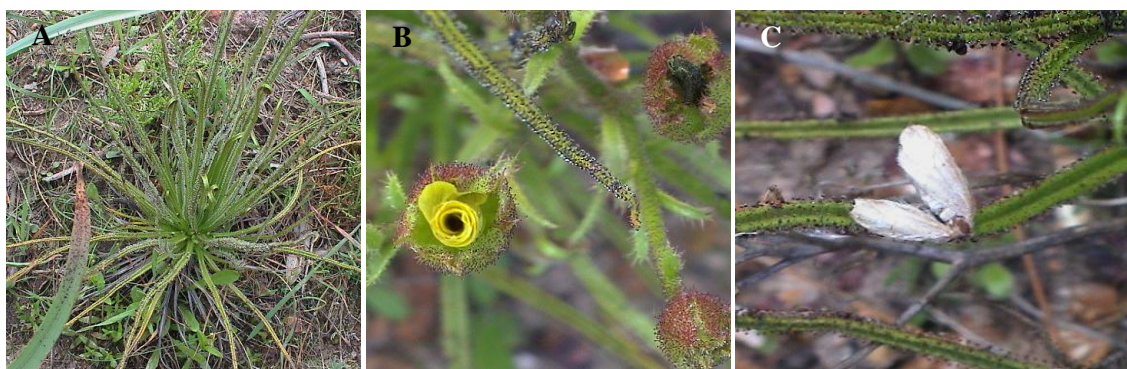


Figura 1. *Drosophyllum lusitanicum* [A – planta no campo; B – planta na fase de floração; C – folha com uma presa capturada].

1.5.2. *Drosera intermedia*

O género *Drosera*, pertencente à família Droseraceae, consiste num vasto grupo de plantas carnívoras, compreendendo cerca de 152 espécies espalhadas por várias partes do Mundo (Juniper *et al.*, 1989 citado por Marczak *et al.*, 2005), ainda que o maior número de populações se encontre na Austrália (Marczak *et al.*, 2005). As plantas deste género são perenes, habitam solos pobres em nutrientes e crescem quase exclusivamente em locais pantanosos (Thum, 1986).

Às plantas do género *Drosera* tem sido atribuído um valor medicinal significativo (Kawiak *et al.*, 2003). Os seus extractos contêm metabolitos secundários, principalmente naftoquinonas e flavonóides (Marczak *et al.*, 2005), e são usados como agentes antiespasmódicos, no tratamento de doenças do tracto respiratório (Budzianowski, 1996), e fármacos anticancerígenos (Parimala & Sachdanandam, 1993). As plantas do género *Drosera* são utilizadas na formulação de um fármaco, usado no tratamento de infecções do tracto respiratório, como a tosse seca, a tosse convulsa, a asma e a bronquite, desde o século XVII e designado por Droserae Herba (Melzig *et al.*, 2001; Paper *et al.*, 2005).

Uma das plantas pertencente ao género *Drosera* é *Drosera intermedia* Hayne (Figura 2), também conhecida por “orvalhinha” (Cunha *et al.*, 2003), uma planta protegida por lei por ser uma espécie em vias de extinção (Melzig *et al.*, 2001; Grevenstuk *et al.*, 2009a). Em Portugal pode ser encontrada no Estuário do Sado, um habitat de características pantanosas adequado às plantas do seu género.



Figura 2. *Drosera intermedia* [A – habitat natural no Estuário do Sado; B – planta no campo; C – folha com uma presa].

Investigações recentes relativas à utilização de extractos hexânicos, metanólicos e aquosos de *D. intermedia* com fins antimicrobianos, foram desenvolvidas por Grevenstuk *et al.* (2009a) evidenciando boas actividades quando testados em algumas bactérias e leveduras.

1.6. Objectivos

As espécies vegetais estudadas neste trabalho têm demonstrado propriedades medicinais que têm motivado a sua utilização na medicina popular. As investigações existentes parecem relacionar as suas actividades terapêuticas com metabolitos secundários detentores de largo espectro biológico. Apesar de diversas actividades terapêuticas já terem sido descritas, e Gonçalves *et al.* (2009b) e Grevenstuk *et al.* (2009a) terem já demonstrado o seu potencial inibitório para algumas bactérias e leveduras patogénicas humanas, não há informações acerca das suas propriedades antimicrobianas em relação a fungos filamentosos e leveduras de alteração alimentar. Assim, o objectivo geral do presente trabalho foi o de avaliar a actividade antifúngica de extractos de *D. lusitanicum* e *D. intermedia*, obtidos por diferentes técnicas de extracção e utilizando diferentes solventes, em fungos filamentosos e leveduras de alteração alimentar, recorrendo ao método de difusão em agar e à determinação das concentrações mínimas inibitórias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

O material vegetal (folhas) de *Drosophyllum lusitanicum* foi recolhido numa população localizada na Serra de Monchique (Algarve) em Outubro de 2008.

No caso da espécie *Drosera intermedia* utilizou-se como material vegetal culturas crescidas *in vitro* durante 10 semanas em meio $\frac{1}{4}$ MS (Murashige & Skoog, 1962) de acordo com o descrito por Grevenstuk *et al.* (2009b) (Figura 3).

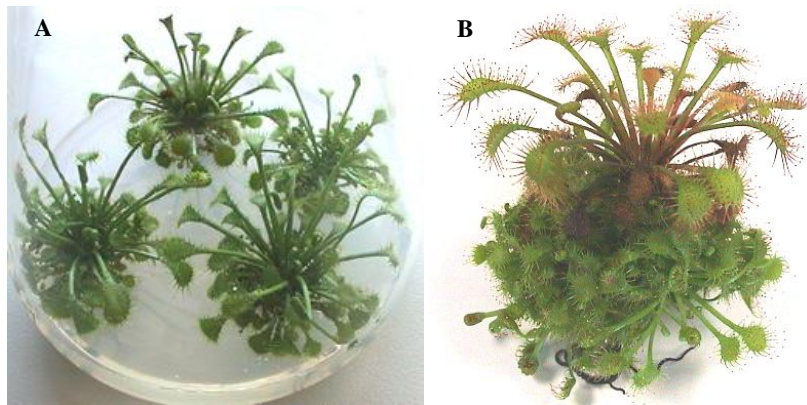


Figura 3. Culturas *in vitro* de *Drosera intermedia* [A – aspecto de rebentos crescidos *in vitro*; B – pormenor das culturas utilizadas para extracção].

2.2. Preparação de extractos

2.2.1. Extracção com solventes orgânicos

Na preparação dos extractos metanólicos e hexânicos de *D. lusitanicum* recorreu-se à extracção Soxhlet (Figura 4). O material vegetal fresco (10 g) foi introduzido no cartucho de extracção e fechado com algodão para prevenir perdas durante o processo. A extracção foi efectuada com 200 mL de metanol ou hexano, durante 5 h.

Os extractos metanólicos e hexânicos de *D. intermedia* foram preparados por maceração dinâmica. O material vegetal foi moído com azoto líquido num almofariz e 100 ou 200 g do preparado foram sujeitas a extracção, respectivamente com 200 mL de metanol ou hexano, durante 24 h com agitação. Após decantação do solvente, a

extracção foi repetida de modo a obter 400 mL de solução de extracto que foi seguidamente filtrado.

Finalizadas todas as extracções, removeram-se os solventes num evaporador rotativo de vácuo a operar a 50°C e ressuspenderam-se os resíduos sólidos obtidos, no mesmo solvente utilizado na extracção, numa concentração de 50 mg/mL e guardaram-se a -20°C.

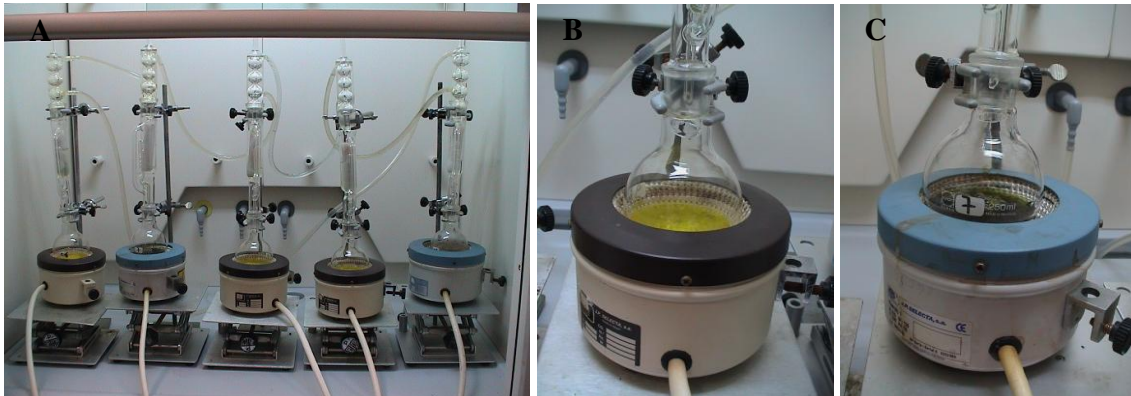


Figura 4. Extracção Soxhlet [A – montagem para extracção Soxhlet; B – aspecto de um extracto hexânico; C – aspecto de um extracto metanólico].

2.2.2. Extracção aquosa

O material vegetal de *D. lusitanicum* foi seco durante 48 h a 40°C e seguidamente moído. O extracto foi obtido por extracção de 5 g de material vegetal com 100 mL de água destilada, durante 24 h com agitação e à temperatura ambiente.

O extracto aquoso de *D. intermedia* foi preparado por maceração mecânica. O material vegetal fresco (100 g) foi moído com azoto líquido num almofariz e posteriormente sujeito a extracção com 200 mL de água destilada, durante 24 h com agitação e à temperatura ambiente.

As misturas obtidas foram filtradas, liofilizadas e os resíduos sólidos resultantes dissolvidos em água destilada numa concentração de 50 mg/mL e conservados a -20°C até à data da sua utilização.

2.2.3. Purificação do extracto hexânico de *Drosera intermedia*

Parte do extracto hexânico de *D. intermedia* foi purificado recorrendo a uma coluna de extracção em fase sólida (SPE). Para tal a coluna de SPE (SUPELLEAN™ LC-18

Packing; 60 mL; 10 g) foi activada com 100 mL de metanol, lavada com 100 mL de acetonitrilo e equilibrada com 100 mL de solução aquosa de acetonitrilo a 50% (v/v). Foram preparados 5,2 mL de uma solução do extracto bruto a 40 mg/mL em solução aquosa de acetonitrilo e seguidamente passados pela coluna. Após este procedimento, foram passados pela coluna 100 mL de uma solução aquosa 50% de acetonitrilo de modo a proporcionar a eluição da amostra, e recolhido o eluído. O restante extracto retido na coluna foi eluído com acetonitrilo a 100% e descartado. A coluna foi lavada sucessivamente com 100 mL de acetonitrilo, 100 mL de triclorometano e 100 mL de metanol. A solução contendo o extracto pretendido foi concentrada por evaporação sob vácuo e liofilizada obtendo-se 86 mg de extracto puro.

2.3. Microrganismos

A maioria dos fungos filamentosos testados foi cedida pela Micoteca da Universidade do Minho (MUM), nomeadamente, *Aspergillus flavus* MUM 92.01, *Aspergillus fumigatus* MUM 98.02, *Aspergillus niger* MUM 03.43, *Aspergillus parasiticus* MUM 92.02 e *Penicillium expansum* MUM 02.03 (Figura 5). Foram ainda estudadas duas estirpes de fungos filamentosos, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* (Figura 5), isoladas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Engenharia, na Universidade do Algarve.

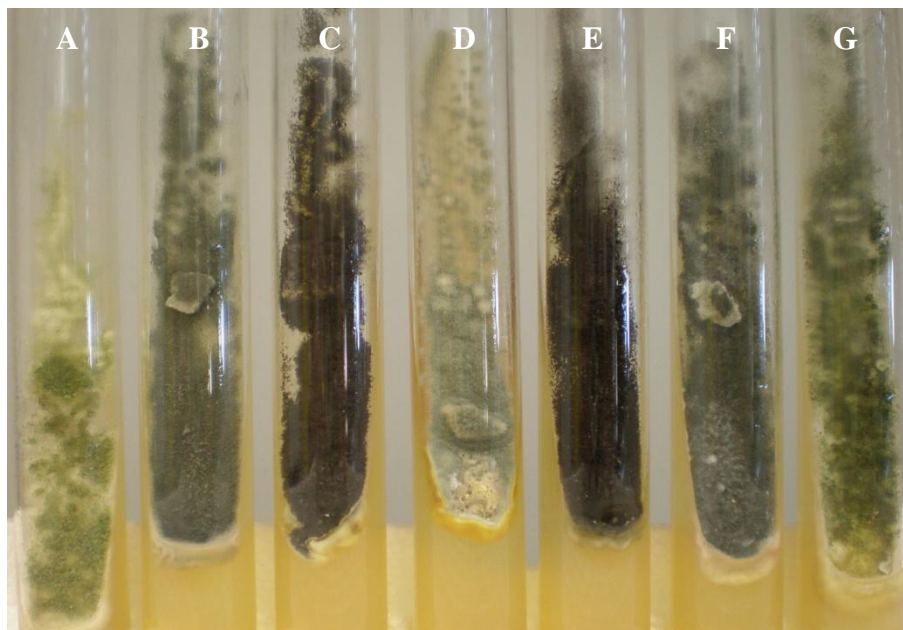


Figura 5. Estirpes de fungos filamentosos estudadas [A – *A. flavus* MUM 92.01; B – *A. fumigatus* MUM 98.02; C – *A. niger* MUM 03.43; D – *P. expansum* MUM 02.03; E – *A. niger*; F – *A. fumigatus*; G – *A. parasiticus* MUM 92.02].

Foram testadas as seguintes leveduras: *Debaryomyces hansenii* PYCC 2968, *Pichia membranaefaciens* PYCC 2489, *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 e *Zygosaccharomyces bailii* PYCC 4806, gentilmente cedidas pela Coleção Portuguesa de Cultura de Leveduras da Universidade Nova de Lisboa.

2.4. Ensaio de actividade antifúngica para fungos filamentosos

A actividade antifúngica dos extractos foi determinada pela aplicação do método de difusão em agar e pela determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC - de acordo com os protocolos do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (NCCLS, 2002). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.4.1. Preparação do inóculo

As estirpes de fungos filamentosos foram crescidas durante sete dias a 25°C em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA – Himedia, Índia). Prepararam-se suspensões de esporos dos fungos filamentosos em solução salina (0,85% NaCl p/v + 0,5% Tween 20 v/v) a partir das culturas de sete dias e ajustou-se a sua densidade óptica a aproximadamente 0,1 (530 nm – GENESYS™ 10S Spectrophotometer, model 335906-02) com solução salina. Foi determinado o número de unidades formadoras de colónias das suspensões de esporos com densidade óptica de aproximadamente 0,1, tendo-se obtido um valor de $4,2 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

2.4.2. Método de difusão em agar

As suspensões de esporos foram inoculadas, com o auxílio de uma zaragatoa estéril, em placas de Petri com cerca de 20 mL de meio PDA. Após inoculação colocaram-se discos de 6 mm no centro de cada placa e impregnaram-se com 20 µL de extracto vegetal (1 mg/disco) previamente preparado (extractos hexânicos, metanólicos e aquosos). Como antifúngicos de referência usaram-se a nistatina (discos de 10 unidades – Oxoid, Reino Unido) e o miconazole (discos impregnados com 0,02 mg – Sigma, Estados Unidos da América) cujos discos foram igualmente colocados no centro de placas de Petri previamente inoculadas com as suspensões de esporos.

Foi ainda testado o efeito inibidor dos solventes de extracção impregnando 20 µL dos solventes de extracção em discos de 6 mm, previamente colocados no centro de placas com meio PDA e inoculadas com as suspensões de esporos.

As placas de Petri foram incubadas a 25°C durante 5 dias e após o tempo de incubação, observaram-se os halos de inibição do crescimento microbiano e mediram-se os seus diâmetros em milímetros (mm).

2.4.3. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC)

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias ou seja, a menor concentração de extracto vegetal capaz de provocar inibição do crescimento do microrganismo, utilizou-se o meio *Potato Dextrose Broth* (PDB – Himedia, Índia).

Prepararam-se soluções dos extractos aquosos, metanólicos e hexânicos e do antifúngico de referência (miconazole) em meio PDB de modo a obter concentrações entre 8000-15,62 µg/mL, para os extractos aquosos, 2000-3,9 µg/mL, para os extractos metanólicos, 500-0,98 µg/mL, para os extractos hexânicos e 40-0,08 µg/mL para o miconazole. Distribuíram-se 100 µL dessas diluições nos poços de microplacas (microplacas de 96 poços, NUNC, Estados Unidos da América). Diluíram-se as suspensões de esporos dos fungos filamentosos com densidade óptica de aproximadamente 0,1, numa proporção de 1:50 ($4,2 \times 10^3 - 3,0 \times 10^4$ UFC/mL), igualmente em meio PDB, e adicionaram-se 100 µL em cada poço da microplaca preparada anteriormente. Assim obtiveram-se concentrações finais entre 4000-7,81 µg/mL, para os extractos aquosos, 1000-1,95 µg/mL, para os extractos metanólicos, 250-0,49 µg/mL, para os extractos hexânicos e 20-0,04 µg/mL para o miconazole. Foram preparados controlos do crescimento sem inibidor. As microplacas foram incubadas a 25°C durante 48 a 52 h. Após incubação, as concentrações às quais o microrganismo não apresentou crescimento foram determinadas pela ausência de turbidez e o poço onde se observou a menor concentração de extracto a produzir inibição de crescimento foi considerado o detentor da MIC.

2.5. Ensaio de actividade antifúngica para leveduras

A actividade antifúngica dos extractos foi determinada de acordo com os protocolos do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997, 1999), pela aplicação do método de difusão em agar e pela determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5.1. Preparação do inóculo

As espécies de leveduras cresceram em meio *Yeast Malt* (YM – Scharlau, Espanha) durante 48 h a 25°C. A partir de colónias isoladas das culturas com 48 h, preparam-se suspensões em solução salina (0,85% NaCl p/v). A turbidez da suspensão foi ajustada ao padrão de McFarland 0,5 (aproximadamente 10^6 UFC / mL).

2.5.2. Método de difusão em agar

As suspensões de leveduras foram inoculadas, com o auxílio de uma zaragatoa estéril, em placas de Petri com cerca de 20 mL de meio YM. Após inoculação colocaram-se discos de 6 mm no centro de cada placa e impregnaram-se com 20 µL de extracto vegetal (1 mg/disco), previamente preparado (extractos hexânicos, metanólicos e aquosos e hexânico purificado de *D. intermedia*). Como antifúngicos de referência usaram-se a nistatina (10 unidades/disco – Oxoid, Reino Unido) e o miconazole (0,02 mg/disco – Sigma, Estados Unidos da América) cujos discos foram igualmente colocados no centro de placas de Petri previamente inoculadas.

De modo a avaliar o efeito inibidor dos solventes utilizados nas extracções, foram impregnados 20 µL dos solventes de extracção em discos de 6 mm, previamente colocados no centro de placas com meio YM e inoculadas com as suspensões.

As placas de Petri foram incubadas a 25°C durante 48 h, observaram-se os halos de inibição do crescimento microbiano e mediram-se os diâmetros em milímetros (mm).

2.5.3. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC)

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias, dos extractos em estudo, em leveduras utilizou-se o meio YM líquido (3 g/L de extracto de levedura – Oxoid, Reino Unido, 3 g/L de extracto de malte – Scharlau, Espanha, 5 g/L de peptona – Difco, Estados Unidos da América, 10 g/L de glucose – Merck, Alemanha).

Prepararam-se soluções dos extractos aquosos, metanólicos e hexânicos e do antifúngico de referência (miconazole) em meio YM de modo a obter concentrações entre 2000-3,9 µg/mL, para os extractos aquosos e metanólicos, 500-0,98 µg/mL, para os extractos hexânicos e 10-0,02 µg/mL para o miconazole. Distribuíram-se 100 µL dessas diluições nos poços de microplacas (microplacas de 96 poços). Diluíram-se as suspensões de leveduras com turbidez ajustada ao padrão MacFarland 0,5 numa proporção de 1:10 (aproximadamente 10^5 UFC/mL), igualmente em meio YM, e adicionaram-se 100 µL em cada poço da microplaca anteriormente preparada. Assim obtiveram-se concentrações finais entre 1000-1,95 µg/mL, para os extractos aquosos e metanólicos, 250-0,49 µg/mL, para os extractos hexânicos e 5-0,01 µg/mL para o miconazole. Foram preparados controlos do crescimento sem inibidor. Incubaram-se as microplacas a 25°C durante 48 h. Após incubação, e à semelhança do descrito para os fungos filamentosos, as concentrações às quais o microrganismo não apresenta crescimento foram determinadas pela ausência de turbidez e o poço onde se verifica a menor concentração de extracto a produzir inibição de crescimento, foi considerado o detentor da MIC.

2.6. Análise e tratamento estatístico dos resultados

Os resultados obtidos relativamente aos halos de inibição foram tratados estatisticamente através da realização de uma análise de variância. Para tal recorreu-se ao software SPSS para Windows versão 15 e para valores de F significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $P = 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Foi efectuada uma análise comparativa de médias entre extractos vegetais diferentes, para um mesmo microrganismo, e uma análise comparativa de médias entre os vários microrganismos, para um mesmo extracto vegetal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Actividade antifúngica de extractos de *Drosophyllum lusitanicum*

3.1.1. Fungos filamentosos

Todos os fungos filamentosos em estudo se mostraram sensíveis aos extractos metanólico e hexânico, evidenciando inibição do seu crescimento. Contudo, apenas as espécies de *A. fumigatus* se mostraram sensíveis ao extracto aquoso. Tal como esperado, todos os fungos filamentosos foram sensíveis aos antifúngicos de referência. Nenhuma das espécies utilizadas foi inibida pelos solventes de extracção.

Os maiores halos de inibição do crescimento foram observados para o extracto hexânico (Tabela 3, $P < 0,05$). Estes resultados são reforçados pelos resultados das concentrações mínimas inibitórias pois o extracto hexânico originou ausências de crescimento a concentrações mais baixas que os restantes extractos, tendo variado entre 15,63 $\mu\text{g/mL}$ e 62,50 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Ainda assim, de entre todas as espécies testadas, *A. fumigatus* MUM 98.02 e *A. fumigatus* foram aquelas em que se verificou uma maior inibição do crescimento ($P < 0,05$) quando o extracto hexânico foi utilizado como inibidor (Figura 6A), apresentando halos de inibição médios de $48,67 \pm 1,76$ mm e $49,00 \pm 3,51$ mm, respectivamente (Tabela 3). Do mesmo modo, *A. fumigatus* apresentou a menor concentração mínima inibitória (15,63 $\mu\text{g/mL}$, Tabela 4). Estes resultados revestem-se de uma grande importância dado que *A. fumigatus* é a espécie do género *Aspergillus* mais relacionada com doenças em vertebrados (Bennett, 2009).

Os fungos filamentosos que apresentaram uma menor susceptibilidade ao extracto hexânico foram *A. flavus* MUM 92.01 (Figura 6D) e *P. expansum* MUM 02.03 ($P < 0,05$), sem diferenças significativas nas médias de diâmetro dos halos de inibição ($16,67 \pm 2,85$ mm e $14,00 \pm 0,58$ mm, respectivamente) (Tabela 3), ainda que os resultados tenham sido relativamente superiores para *A. flavus* MUM 92.01.

O extracto que demonstrou a segunda maior eficácia foi o extracto metanólico e por último, o aquoso. As médias do diâmetro dos halos de inibição do crescimento foram significativamente superiores para o extracto metanólico, quando comparado com o extracto aquoso (Tabela 3, $P < 0,05$), e as concentrações mínimas inibitórias foram superiores para o extracto aquoso, quando comparado com o extracto metanólico

(Tabela 4). A espécie significativamente mais susceptível ao extracto metanólico foi novamente *A. fumigatus* ($P < 0,05$), que apresentou valores médios do diâmetro dos halos de inibição de $40,67 \pm 1,33$ mm e $38,00 \pm 4,04$ mm, respectivamente para *A. fumigatus* MUM 98.02 e *A. fumigatus* (Tabela 3) (Figura 6B). Para o referido extracto, o fungo filamentoso que demonstrou menor sensibilidade foi *A. flavus* MUM 92.01 (zona de inibição média de $10,67 \pm 0,67$ mm, Tabela 3) (Figura 6E), apesar de não se terem verificado diferenças significativas relativamente a *A. niger*, *A. parasiticus* MUM 92.02 e *P. expansum* MUM 02.03 ($P \geq 0,05$) (Tabela 3).

Os resultados obtidos revelam uma diferença significativa de actividade antimicrobiana entre os diferentes extractos de *D. lusitanicum*. Dado que cada tipo de extracto tem como base um determinado solvente, os resultados parecem sugerir que esse mesmo solvente tem implicações na natureza dos compostos extraídos e consequentemente na actividade antifúngica. De facto, os solventes utilizados diferem entre si na polaridade, o que lhes confere uma afinidade para diferentes compostos. De acordo com a bibliografia consultada, as propriedades medicinais de *D. lusitanicum* têm sido referidas e parecem estar associadas às elevadas quantidades de plumbagina que a planta acumula (Budzianowski *et al.*, 2002). Estudos anteriores (Grevnstuk *et al.*, 2008) confirmam que este é efectivamente o composto maioritário dos extractos desta espécie e que é extraído em maiores quantidades na presença de solventes menos polares, como o hexano, em relação a solventes mais polares, como o metanol.

As inibições fúngicas verificadas neste ensaio mostraram-se muito interessantes, pelo que várias aplicações podem ser sugeridas para os extractos de *D. lusitanicum*. Por exemplo, tal como fizeram Yang & Clausen (2007) para um outro tipo de antimicrobianos naturais, os óleos essenciais, seria interessante avaliar as capacidades destes extractos vegetais no controlo de fungos contaminantes em madeiras armazenadas. No seu estudo, os referidos autores referem a problemática do crescimento de fungos filamentosos, essencialmente devido à humidade, em madeiras com aplicações residenciais e cujo controlo se faz por meio de fungicidas químicos, por vezes inapropriados devido à toxicidade que apresentam em termos de saúde humana. Assim alguns produtos naturais extraídos de plantas, eventualmente menos tóxicos, seriam uma alternativa de controlo. Os autores obtiveram resultados positivos na sua investigação, o que indica que os antifúngicos naturais podem constituir uma forma de contornar este problema.

Vários autores têm também sugerido a utilização de produtos naturais de origem vegetal no controlo de microrganismos patogénicos de plantas, como os fungos (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005; Tegegne & Pretorius, 2007; Bajpai *et al.*, 2009). O controlo de doenças fúngicas realiza-se essencialmente recorrendo a fungicidas cuja utilização pode ser tóxica para quem os manipula e para os consumidores, além de ter consequências ambientais nefastas (McManus *et al.*, 2002). O facto de os patógenos se tornarem cada vez mais resistentes aos fungicidas de origem sintética e os riscos iminentes da utilização dos mesmos serem bastante evidentes, impulsiona o interesse em encontrar alternativas mais seguras e com um maior nível de aceitação, como os óleos essenciais e os extractos vegetais (Bajpai *et al.*, 2009). Os efeitos dos extractos vegetais de *D. lusitanicum* revelaram-se bastante promissores em fungos filamentosos de contaminação alimentar e seria bastante interessante testar a sua capacidade em fungos comumente relacionados com a patogénica de plantas, como *Fusarium oxysporum*.

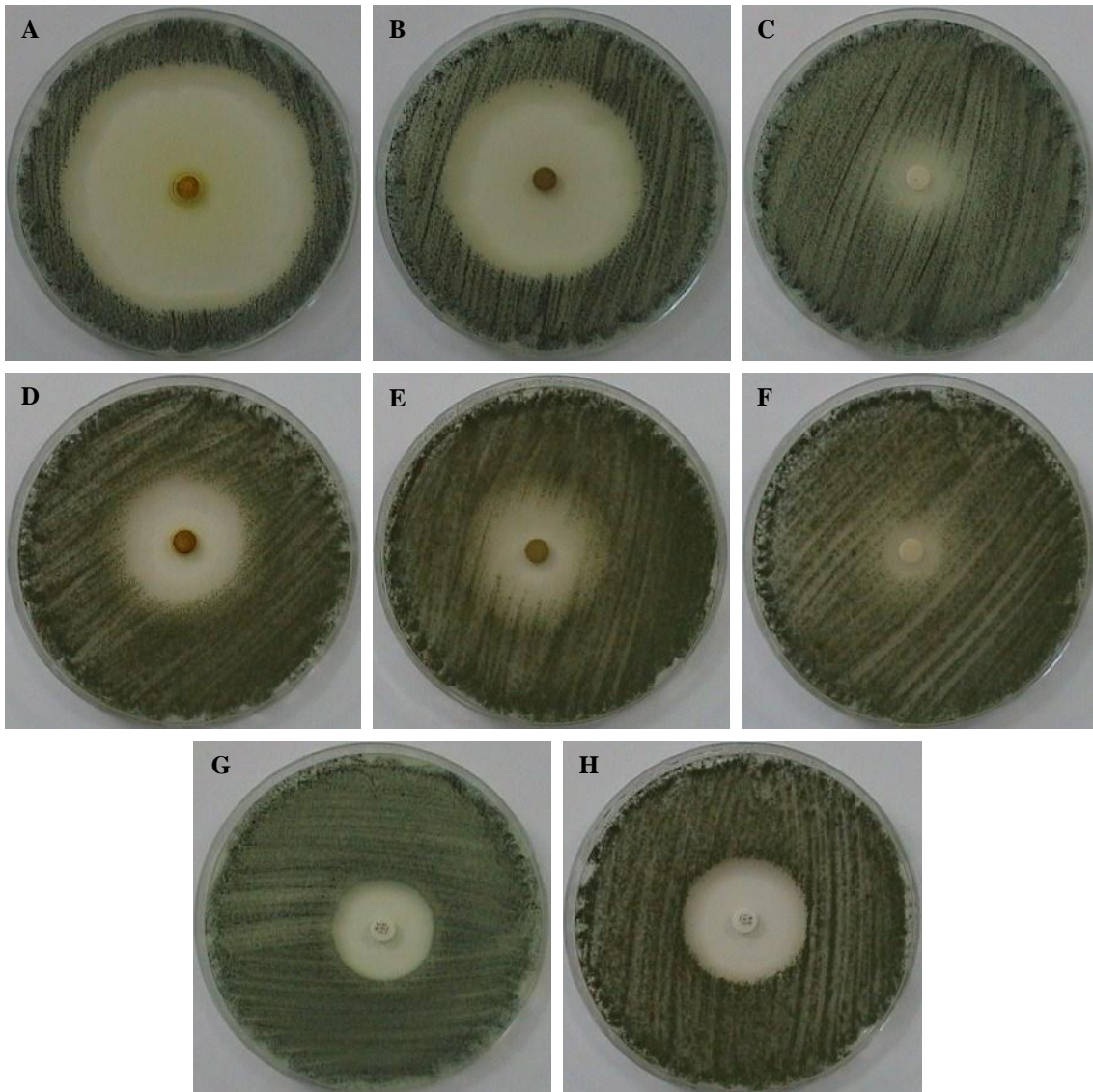


Figura 6. Halos de inibição do crescimento produzidos pelo extracto hexânico (A e D), metanólico (B e E) e aquoso (C e F) de *D. lusitanicum* e pela nistatina (G e H) em *A. fumigatus* e *A. flavus* MUM 92.01, respectivamente.

Tabela 3. Actividade antifúngica de extractos de *D. lusitanicum* em fungos filamentosos, determinada pelo método de difusão em agar^a.

Espécie	Extracto (1 mg/disco)			Antifúngico de referência	
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	Nistatina (10 unidades/disco)	Miconazole (0,02 mg/disco)
<i>A. fumigatus</i> MUM 98.02	48,67 ± 1,76 a	40,67 ± 1,33 b	8,33 ± 0,88 d	16,33 ± 1,86 c	20,00 ± 1,00 c
<i>A. fumigatus</i>	49,00 ± 3,51 a	38,00 ± 4,04 b	8,33 ± 0,33 d	17,00 ± 1,53 bc	20,33 ± 0,33 b
<i>A. niger</i> MUM 03.43	27,33 ± 1,33 a	23,67 ± 0,33 a	-	18,33 ± 1,20 b	17,00 ± 1,00 b
<i>A. niger</i>	24,33 ± 2,40 a	15,33 ± 2,33 b	-	15,00 ± 2,08 b	11,33 ± 0,33 c
<i>A. parasiticus</i> MUM 92.02	23,67 ± 1,33 a	11,00 ± 1,15 b	-	20,00 ± 0,00 a	21,00 ± 1,15 a
<i>A. flavus</i> MUM 92.01	16,67 ± 2,85 ab	10,67 ± 0,67 b	-	23,00 ± 1,00 a	23,00 ± 2,00 a
<i>P. expansum</i> MUM 02.03	14,00 ± 0,58 b	12,33 ± 1,33 b	-	15,67 ± 2,33 b	26,00 ± 1,53 a

^a Diâmetro da zona de inibição (mm), incluindo o diâmetro do disco de 6 mm; extracto inactivo (-). Os valores representam a média ± erro padrão de três repetições. Para um mesmo microrganismo, ou seja, numa mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Tabela 4. Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g/mL}$) dos vários extractos de *D. lusitanicum* e do antifúngico de referência (miconazole) para fungos filamentosos.

Espécie	Extractos			Antifúngico de referência (Miconazole)
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	
<i>A. fumigatus</i> MUM 98.02	31,25	125,00	500,00	1,25
<i>A. fumigatus</i>	15,63	125,00	250,00	2,50
<i>A. niger</i> MUM 03.43	31,25	125,00	500,00	1,25
<i>A. niger</i>	62,50	500,00	1000,00	5,00
<i>A. parasiticus</i> MUM 92.02	31,25	125,00	500,00	0,63
<i>A. flavus</i> MUM 92.01	31,25	125,00	500,00	0,63
<i>P. expansum</i> MUM 02.03	31,25	250,00	500,00	0,31

3.1.2. Leveduras

O crescimento de todas as leveduras estudadas mostrou ser inibido pelos vários extractos de *D. lusitanicum* testados bem como pelos dois antifúngicos de referência testados. Nenhuma das leveduras estudadas foi inibida pelos solventes de extracção.

Apesar de se ter verificado uma actividade antifúngica notável para os extractos, hexânico, metanólico e aquoso, essa mesma actividade demonstrou diferentes intensidades dependendo do extracto aplicado. Observando as zonas de inibição médias, o extracto que desempenhou uma actividade mais acentuada foi o extracto hexânico, seguindo-se o extracto metanólico e por fim, com uma actividade muito menos acentuada, mas também ela expressiva, o extracto aquoso (Tabela 5, $P < 0,05$). Este comportamento foi confirmado com a determinação das concentrações mínimas inibitórias uma vez que os intervalos das mesmas variaram entre valores mais baixos para o extracto hexânico (7,81 – 15,63 $\mu\text{g/mL}$), seguindo-se o extracto metanólico (125,00 – 250,00 $\mu\text{g/mL}$) e por último o aquoso ($> 1000 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 6). De facto, os maiores halos de inibição médios foram observados quando o extracto testado foi o extracto hexânico, ainda que existam diferenças significativas entre as diferentes espécies em estudo. Estudos anteriores realizados por Gonçalves *et al.* (2009b) tinham já demonstrado as notáveis propriedades antimicrobianas do extracto hexânico de *D. lusitanicum* em algumas estirpes de leveduras e bactérias. No referido estudo, por

exemplo, observaram-se halos de inibição médios de $42,33 \pm 1,33$ mm para *Cryptococcus neoformans* YP0186 e $43,00 \pm 0,58$ mm para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. No presente trabalho, as espécies mais sensíveis ($P < 0,05$) ao extracto hexânico foram as espécies *Z. bailii* PYCC 4806 ($52,67 \pm 1,20$ mm) e *D. hansenii* PYCC 2968 ($55,67 \pm 2,40$ mm) (Figura 7A) apesar de o valor médio dos halos de inibição do crescimento ser relativamente superior na última espécie referida (Tabela 5). No entanto, e apesar das menores concentrações mínimas inibitórias se verificarem para o extracto hexânico e corroborarem os resultados dos halos de inibição médios, *D. hansenii* PYCC 2968, que se mostrou das mais sensíveis ao extracto hexânico no método de difusão em agar, foi a que apresentou uma maior concentração mínima inibitória ao extracto hexânico ($15,63 \mu\text{g/mL}$, Tabela 6). Estas discrepâncias foram frequentemente encontradas ao longo do trabalho prático e algumas das causas apontadas para esta ocorrência prendem-se com o facto de que a eficácia antimicrobiana de um composto pode ser afectada por diversos factores como a solubilidade do extracto, a taxa difusiva no agar e a evaporação dos solventes de extracção que pode influenciar a concentração testada (Hernández *et al.*, 2005).

Para o extracto metanólico também *Z. bailii* PYCC 4806 ($41,67 \pm 2,85$ mm, Tabela 5) e *D. hansenii* PYCC 2968 ($42,00 \pm 2,52$ mm, Tabela 5) (Figura 7B) foram as espécies em que se observou a maior inibição do crescimento ($P < 0,05$), ainda que o halo de inibição médio tenha sido relativamente superior para *D. hansenii* PYCC 2968. A confirmar a forte sensibilidade de *D. hansenii* PYCC 2968 ao extracto metanólico está o resultado obtido na determinação da concentração mínima inibitória, a menor concentração a causar inibição de entre todas as espécies estudadas ($125,00 \mu\text{g/mL}$, Tabela 6).

Assim, tanto para o extracto hexânico como para o metanólico, verificou-se que *S. cerevisiae* PYCC 4072 e *P. membranaefaciens* PYCC 2489 (Figura 7D,E) foram as estirpes menos susceptíveis ao poder antifúngico dos referidos extractos ($P < 0,05$).

No caso do extracto aquoso, todas as espécies em estudo apresentaram valores de halos de inibição médios muito semelhantes entre si, apesar de *Z. bailii* PYCC 4806 ter apresentado o maior, $17,00 \pm 3,06$ mm, e *P. membranaefaciens* PYCC 2489 o menor, $11,00 \pm 1,53$ mm. Na determinação das concentrações mínimas inibitórias todas as espécies em estudo apresentaram valores fora do espectro de concentrações analisadas, ou seja uma concentração mínima inibitória superior a $1000 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 6). À semelhança do observado no ensaio anterior, os resultados voltam a focar as diferenças

de actividade antifúngica entre os diferentes extractos, verificando-se uma actividade decrescente quando o extracto aplicado foi o hexânico, o metanólico ou o aquoso. Uma das razões a apontar, que pode justificar as diferenças observadas entre os extractos hexânico e metanólico e o extracto aquoso relaciona-se com o tipo de material vegetal utilizado. De acordo com estudos anteriores (Grevenstuk *et al.*, 2008), verifica-se que a extracção do principal composto antimicrobiano, a plumbagina, é efectuada maioritariamente a partir de material vegetal fresco em detrimento do material vegetal seco, utilizado por exemplo na extracção aquosa.

Ainda que os extractos tenham demonstrado diferentes intensidades de actividade, todos evidenciaram um forte efeito inibidor no crescimento das leveduras, o que ilustra o seu grande potencial, isoladamente ou numa combinação dos vários extractos, enquanto fontes naturais de compostos antifúngicos (Lee *et al.*, 2007). Esta constatação é bastante importante, pois a inibição do crescimento desempenhada pelos extractos vegetais, pode estar a ocorrer por mecanismos diferentes dos apresentados pelos agentes antimicrobianos mais usados no controlo de leveduras e então, terem um valor significativo no controlo de espécies resistentes (Eloff *et al.*, 2008; McGaw *et al.*, 2008).

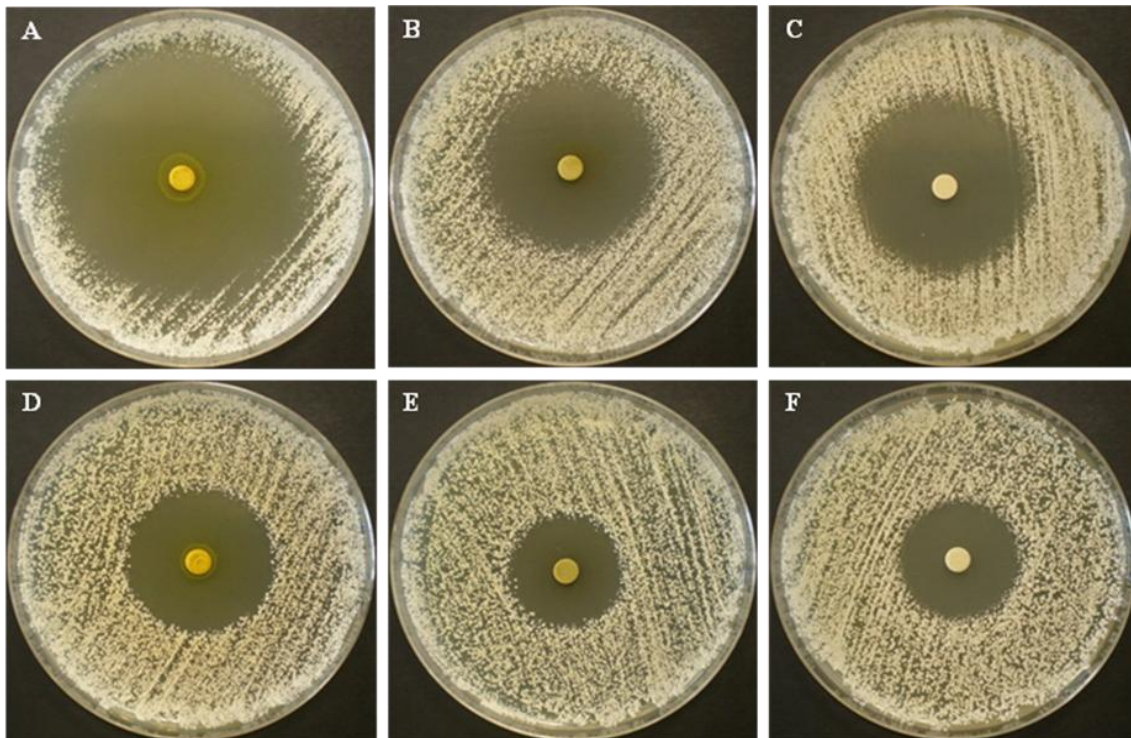


Figura 7. Halos de inibição do crescimento produzidos pelo extracto hexânico (A e D) e metanólico (B e E) de *D. lusitanicum* e pelo miconazole (C e F) em *D. hansenii* PYCC 2968 e *P. membranaefaciens* PYCC 2489, respectivamente.

Tabela 5. Actividade antifúngica de extractos de *D. lusitanicum* em leveduras, determinada pelo método de difusão em agar^a.

Espécie	Extracto (1 mg/disco)			Antifúngico de referência	
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	Nistatina (10 unidades/disco)	Miconazole (0,02 mg/disco)
<i>Z. bailii</i> PYCC 4806	52,67 ± 1,20 a	41,67 ± 2,85 b	17,00 ± 3,06 d	26,00 ± 1,00 c	36,33 ± 0,88 b
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	32,33 ± 2,19 a	26,33 ± 0,88 b	12,33 ± 2,73 c	26,00 ± 0,58 b	35,00 ± 0,58 a
<i>D. hansenii</i> PYCC 2968	55,67 ± 2,40 a	42,00 ± 2,52 b	15,67 ± 4,63 c	8,67 ± 0,33 c	36,67 ± 0,88 b
<i>P. membranaefaciens</i> PYCC 2489	35,00 ± 1,15 a	26,00 ± 1,00 b	11,00 ± 1,53 d	22,67 ± 0,33 c	27,33 ± 0,67 b

^a Diâmetro da zona de inibição (mm), incluindo o diâmetro do disco de 6 mm; extracto inactivo (-). Os valores representam a média ± erro padrão de três repetições. Para um mesmo microrganismo, ou seja, numa mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Tabela 6. Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g/mL}$) dos vários extractos de *D. lusitanicum* e do antifúngico de referência (miconazole) em leveduras.

Espécie	Extracto			Antifúngico de referência (Miconazole)
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	
<i>Z. bailii</i> PYCC 4806	7,81	250,00	> 1000	0,02
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	7,81	250,00	> 1000	0,04
<i>D. hansenii</i> PYCC 2968	15,63	125,00	> 1000	0,16
<i>P. membranaefaciens</i> PYCC 2489	7,81	250,00	> 1000	0,31

3.2. Actividade antifúngica de extractos de *Drosera intermedia*

3.2.1. Fungos filamentosos

No caso dos extractos de *D. intermedia*, o crescimento de todos os fungos filamentosos foi inibido pelo extracto hexânico. O extracto aquoso não provocou inibição no crescimento. No caso do extracto metanólico, apenas houve sensibilidade por parte de *A. fumigatus* MUM 98.02, *A. fumigatus*, *A. niger* MUM 03.43 e *P. expansum* MUM 02.03.

À semelhança do observado para a espécie *D. lusitanicum*, o extracto hexânico de *D. intermedia* demonstrou, significativamente, melhores inibições do crescimento dos fungos filamentosos que o extracto metanólico da mesma espécie (Tabela 7, $P < 0,05$). Este facto indica que diferentes compostos e possivelmente diferentes mecanismos de acção são responsáveis pela actividade antimicrobiana dos vários tipos de extracto (Grevenstuk *et al.*, 2009a). Porém, houve diferenças significativas em relação ao fungo filamentoso mais sensível ao extracto hexânico ($P < 0,05$). As espécies de *A. fumigatus* apresentaram as maiores zonas de inibição médias, tanto para o extracto hexânico ($47,67 \pm 0,67$ mm para *A. fumigatus* MUM 98.02 e $44,67 \pm 2,60$ mm para *A. fumigatus*, Tabela 7) (Figura 8A) como para o metanólico ($12,00 \pm 2,65$ mm para *A. fumigatus* MUM 98.02 e $13,67 \pm 1,45$ mm para *A. fumigatus*, Tabela 7) (Figura 8B). No entanto, as diferenças entre as zonas de inibição médias em relação às outras espécies sensíveis, no caso do extracto metanólico, não são significativas (Tabela 7) ($P \geq 0,05$). Ainda para o extracto hexânico de *D. intermedia*, pode verificar-se que *P. expansum* MUM 02.03

foi o fungo filamentososo com menor sensibilidade ($P < 0,05$) no método de difusão em agar, apresentando uma zona de inibição média de $12,67 \pm 0,88$ mm (Tabela 7) (Figura 8D).

Curiosamente, verificou-se que certas espécies não foram inibidas pelo extracto metanólico através do método de difusão em agar (*A. niger*, *A. parasiticus* MUM 92.02 e *A. flavus* MUM 92.01) mas apresentaram concentrações mínimas inibitórias semelhantes às das espécies sensíveis. Estes resultados contraditórios evidenciam um problema já abordado anteriormente e que é essencialmente devido ao tipo de meio utilizado (sólido ou líquido). Esta explicação pode justificar que *A. niger* tenha apresentado o maior valor de concentração mínima inibitória ($62,50 \mu\text{g/mL}$, Tabela 8) para o extracto hexânico mas não se tenha mostrado um dos fungos menos sensíveis no método de difusão em agar ($27,67 \pm 1,45$ mm, Tabela 7) ($P < 0,05$).

O extracto aquoso mostrou-se bastante ineficaz na inibição do crescimento fúngico não demonstrando efeitos inibitórios quando se utilizou o método de difusão em agar, em qualquer das espécies estudadas (Tabela 7). Do mesmo modo, e para todas as espécies de fungos filamentosos, o referido extracto apresentou elevadas concentrações mínimas inibitórias e na maioria dos casos, concentrações fora do espectro analisado (Tabela 8).

Segundo Shukla *et al.* (2008) os fungos biodeterioradores podem facilmente desenvolver características de resistência a um único componente activo. No entanto, apesar de muitos dos extractos vegetais possuírem um composto maioritário, eles contêm muitos outros elementos antimicrobianos que, apesar de minoritários, podem ser explorados quanto à sua potência fungitóxica, devido aos efeitos sinérgicos entre seus componentes (Shukla *et al.*, 2008). De facto, embora *D. intermedia* seja sobretudo produtora de plumbagina (Budzianowski, 1996) os vários autores que se têm dedicado ao estudo de plantas do género *Drosera* relacionam a sua actividade também a outras naftoquinonas, como a juglona, e a flavonóides, como a quercetina (Marczak *et al.*, 2005; Paper *et al.*, 2005; Melzig *et al.*, 2001), que apesar de se encontrarem em pequenas quantidades podem exercer funções sinérgicas com o composto maioritário.

Atendendo a que os fungos filamentosos estão também estreitamente associados ao fenómeno já anteriormente abordado e designado por “sick building syndrome”, os bons resultados obtidos neste ensaio tornam-se bastante interessantes. Este recente fenómeno encontrado por exemplo em edifícios de escritórios, parece estar muitas vezes relacionado com a qualidade do ar proveniente dos sistemas de ventilação e ares

condicionados, cujos filtros acumulam os esporos dos fungos. De facto, os filtros dos sistemas de ventilação são bastante problemáticos e por exemplo, nos hospitais, possibilitam o contacto dos esporos com os doentes imunodeprimidos facilitando o aparecimento de doenças nosocomiais (Haiduven, 2009). A má qualidade do ar afigura-se assim, como a principal responsável por estes efeitos prejudiciais. Deste modo, a boa actividade dos extractos vegetais de *D. intermedia* testados, permite sugerir aplicações para o contorno deste problema como por exemplo, a sua adição ou a adição dos compostos responsáveis pela actividade, após a sua identificação, a ambientes.

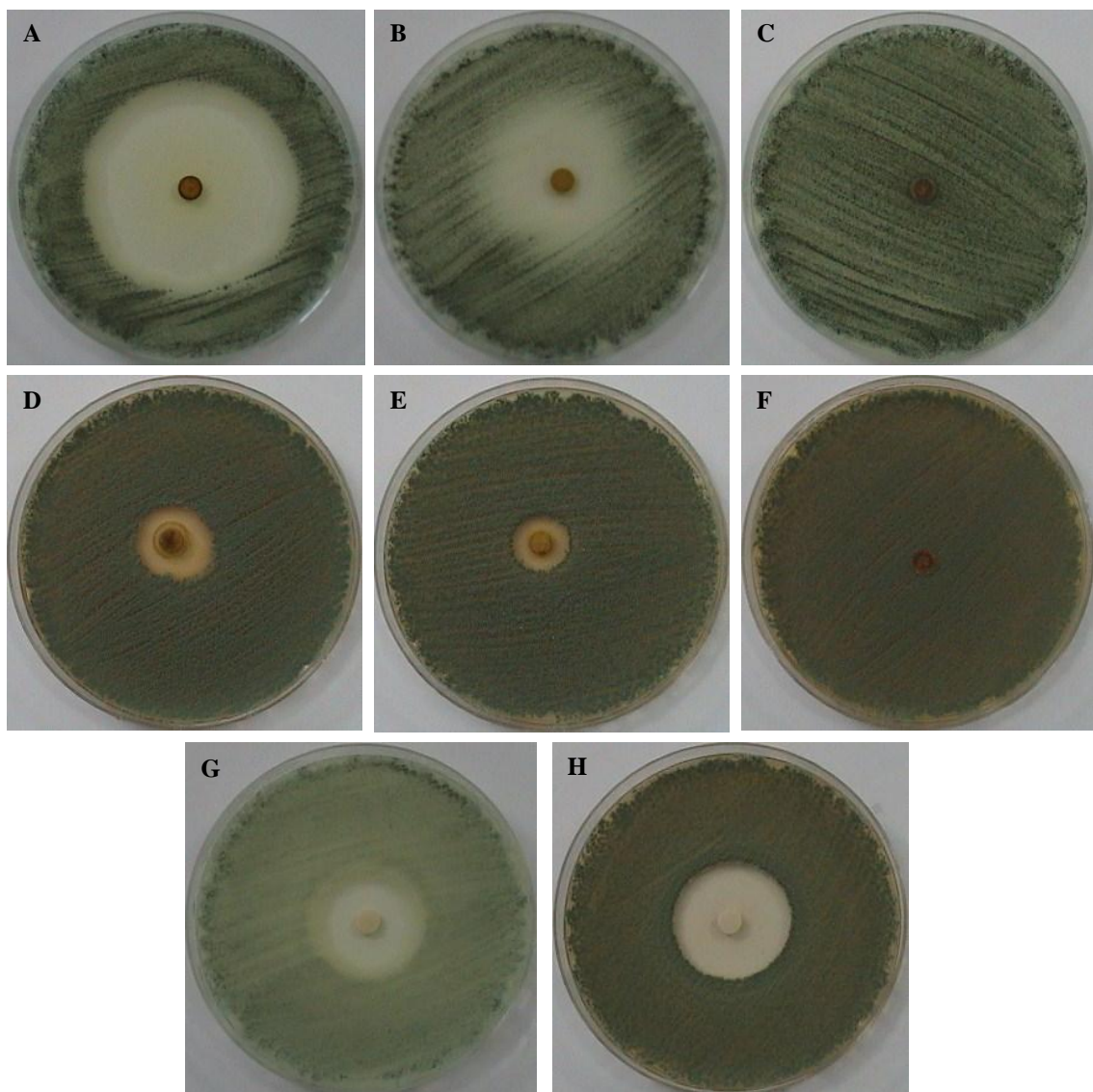


Figura 8. Halos de inibição do crescimento produzidos pelo extracto hexânico (A e D), metanólico (B e E) e aquoso (C e F) de *D. intermedia* e pelo miconazole (G e H) em *A. fumigatus* e *P. expansum* MUM 02.03, respectivamente.

Tabela 7. Actividade antifúngica de extractos de *D. intermedia* em fungos filamentosos, determinada pelo método de difusão em agar^a.

Espécie	Extracto (1mg/disco)			Antifúngico de referência	
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	Nistatina (10 unidades/disco)	Miconazole (0,02 mg/disco)
<i>A. fumigatus</i> MUM 98.02	47,67 ± 0,67 a	12,00 ± 2,65 c	-	16,33 ± 1,86 bc	20,00 ± 1,00 b
<i>A. fumigatus</i>	44,67 ± 2,60 a	13,67 ± 1,45 c	-	17,00 ± 1,53 bc	20,33 ± 0,33 b
<i>A. niger</i> MUM 03.43	30,67 ± 3,18 a	10,67 ± 0,88 c	-	18,33 ± 1,20 b	17,00 ± 1,00 b
<i>A. niger</i>	27,67 ± 1,45 a	-	-	15,00 ± 2,08 b	11,33 ± 0,33 c
<i>A. parasiticus</i> MUM 92.02	21,33 ± 5,24 a	-	-	20,00 ± 0,00 a	21,00 ± 1,15 a
<i>A. flavus</i> MUM 92.01	18,00 ± 2,65 a	-	-	23,00 ± 1,00 a	23,00 ± 2,00 a
<i>P. expansum</i> MUM 02.03	12,67 ± 0,88 bc	11,00 ± 1,15 c	-	15,67 ± 2,33 b	26,00 ± 1,53 a

^a Diâmetro da zona de inibição (mm), incluindo o diâmetro do disco de 6 mm; extracto inactivo (-). Os valores representam a média ± erro padrão de três repetições. Para um mesmo microrganismo, ou seja, numa mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Tabela 8. Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g/mL}$) dos vários extractos de *D. intermedia* e do antifúngico de referência (miconazole), em fungos filamentosos.

Espécie	Extracto			Antifúngico de referência (Miconazole)
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	
<i>A. fumigatus</i> MUM 98.02	15,63	250,00	2000	1,25
<i>A. fumigatus</i>	15,63	125,00	4000	2,50
<i>A. niger</i> MUM 03.43	31,25	250,00	> 4000	1,25
<i>A. niger</i>	62,50	500,00	> 4000	5,00
<i>A. parasiticus</i> MUM 92.02	31,25	250,00	> 4000	0,63
<i>A. flavus</i> MUM 92.01	15,63	250,00	> 4000	0,63
<i>P. expansum</i> MUM 02.03	31,25	250,00	> 4000	0,31

3.2.2. Leveduras

Verificou-se que o crescimento de todas as leveduras em estudo foi inibido de alguma forma pelos extractos hexânicos (bruto e purificado) e metanólico de *D. intermedia*. Apenas duas espécies evidenciaram alguma sensibilidade, ainda que pouco pronunciada, ao extracto aquoso, *Z. bailii* PYCC 4806 ($5,67 \pm 2,85$ mm, Tabela 9) e *D. hansenii* PYCC 2968 ($5,00 \pm 2,52$ mm, Tabela 9).

Neste ensaio foi incluído no grupo de inibidores testados, um extracto purificado obtido a partir do extracto hexânico bruto. Tal como esperado, este extracto desempenhou um forte efeito inibidor, revelando-se mais eficaz que o extracto metanólico, que o extracto aquoso e até mesmo que o extracto hexânico bruto. Deste modo, a aplicação do extracto hexânico purificado originou halos de inibição médios superiores quando comparado aos demais (Tabela 9, $P < 0,05$) e também permitiu a obtenção de concentrações mínimas inibitórias inferiores às obtidas pelos restantes extractos e compreendidas no intervalo entre 1,95 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 10).

Para todos os extractos testados duas espécies microbianas sobressaíram como sendo as mais sensíveis, *Z. bailii* PYCC 4806 e *D. hansenii* PYCC 2968 ($P < 0,05$). Estas espécies apresentaram valores de zonas de inibição médias superiores aos obtidos para as restantes espécies, resultados corroborados pelas concentrações mínimas inibitórias visto que estas mesmas espécies também evidenciaram algumas das

concentrações mínimas inibitórias mais baixas. Contudo, para o extracto hexânico purificado a inibição provocada em *D. hansenii* PYCC 2968 (Figura 9A) foi significativamente superior à provocada em *Z. bailii* PYCC 4806, com halos de inibição médios de $58,33 \pm 1,45$ mm e $49,33 \pm 1,86$ mm, respectivamente (Tabela 9).

Analogamente ao observado nos ensaios anteriores, todas as espécies microbianas evidenciaram uma maior sensibilidade ao extracto hexânico quando comparado ao extracto metanólico (Tabela 9, $P < 0,05$). Por sua vez, também a susceptibilidade ao extracto metanólico foi superior à observada quando o inibidor foi o extracto aquoso (Tabela 9, $P < 0,05$).

As espécies mais tolerantes, tanto ao extracto hexânico bruto como ao extracto metanólico, foram *S. cerevisiae* PYCC 4072 e *P. membranaefaciens* PYCC 2489 (Figura 9E,F). Estas espécies apresentaram os menores halos de inibição médios, que no caso do extracto hexânico bruto foram de $29,33 \pm 1,86$ mm para *S. cerevisiae* PYCC 4072 e de $30,67 \pm 0,67$ mm para *P. membranaefaciens* PYCC 2489 e no caso do extracto metanólico foram de $19,00 \pm 0,00$ mm para *S. cerevisiae* PYCC 4072 e de $20,00 \pm 0,58$ mm para *P. membranaefaciens* PYCC 2489 (Tabela 9, $P < 0,05$). Nestas mesmas espécies também se verificaram as maiores concentrações mínimas inibitórias ($15,63$ µg/mL para *S. cerevisiae* PYCC 4072 e $7,81$ µg/mL para *P. membranaefaciens* PYCC 2489, no caso do extracto hexânico e, $250,00$ µg/mL respectivamente para *S. cerevisiae* PYCC 4072 e *P. membranaefaciens* PYCC 2489, no caso do extracto metanólico) (Tabela 10).

As propriedades antimicrobianas de *D. intermedia* tinham sido já demonstradas quando Grevenstuk *et al.* (2009a) estudaram os efeitos inibitórios do extracto hexânico bruto, metanólico e aquoso em várias estirpes de leveduras e bactérias, obtendo então inibições notáveis. Por exemplo, para a levedura *Cryptococcus neoformans* YP0186 verificaram-se zonas de inibição médias de $59,0 \pm 0,6$ mm, no caso do extracto hexânico bruto, $28,7 \pm 0,7$ mm, no caso do extracto metanólico e $24,0 \pm 0,6$ mm, no caso do extracto aquoso. Estes resultados tinham já permitido evidenciar que o extracto hexânico exercia uma maior actividade inibitória e que o extracto aquoso exercia a menor actividade inibitória entre os extractos estudados.

Neste estudo, o facto de *Z. bailii* PYCC 4806 ter sido das espécies mais sensíveis aos extractos, e no caso do extracto aquoso ter sido uma das únicas sensíveis, reveste-se de um enorme interesse. *Z. bailii* é um agente contaminante altamente tolerante a alguns dos métodos mais comuns de conservação alimentar (Rodrigues *et al.*, 2001). Esta

levedura, que contamina entre outros produtos alimentares, vinhos secos e doces (Fleet, 1992 citado por Rodrigues *et al.*, 2001), produz uma fermentação alcoólica muito vigorosa que pode levar ao rebentamento de produtos enlatados e bebidas engarrafadas (Rodrigues *et al.*, 2001). Deste modo, os resultados obtidos podem ser utilizados no desenvolvimento de conservantes alimentares eficazes em fungos de contaminação alimentar (Lee *et al.*, 2007) de modo a melhorar a qualidade e prolongar o tempo de vida útil dos alimentos (Shukla *et al.*, 2008). É importante também mencionar que os extractos de *D. intermedia* já tinham demonstrado, em estudos anteriores (Grevestuk *et al.*, 2009a), propriedades antioxidantes. Esta evidência representa um interesse adicional em relação à sua adição a alimentos, pois os antioxidantes desempenham um papel protector contra os danos provocados pelos radicais livres, que podem ser a causa de doenças como o cancro ou a diabetes (Boussaada *et al.*, 2008). Todavia, é imprescindível avaliar a toxicidade dos extractos vegetais em animais e células humanas, conhecer os seus mecanismos de acção e os seus efeitos *in vivo* (Ríos & Recio, 2005), antes da sua inserção na cadeia alimentar de modo a garantir a qualidade e segurança do alimento.

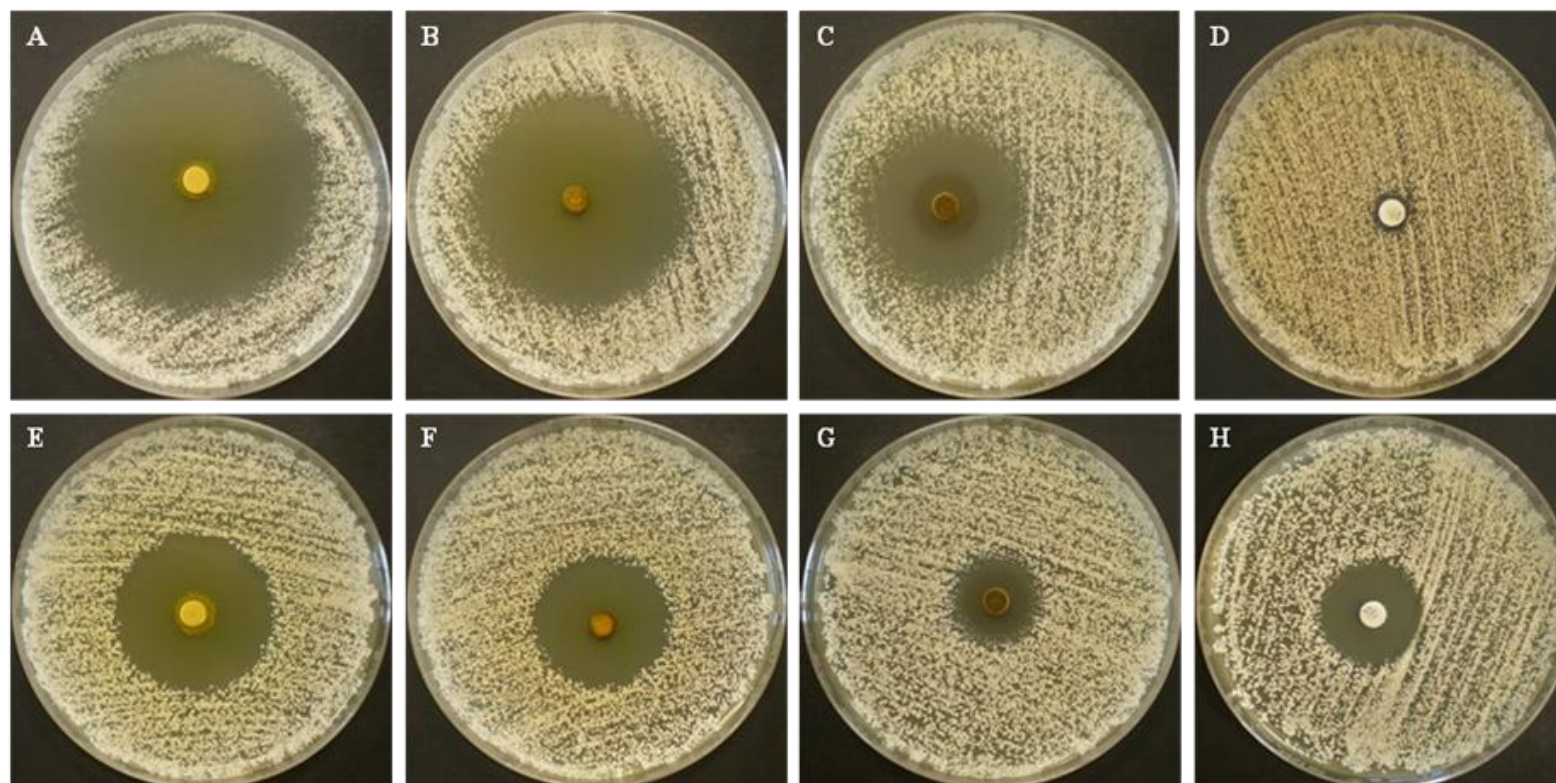


Figura 9. Halos de inibição do crescimento produzidos pelo extracto hexânico purificado (A e E), hexânico bruto (B e F) e metanólico (C e G) de *D. intermedia* e pela nistatina (D e H) em *D. hansenii* PYCC 2968 e *P. membranaefaciens* PYCC 2489, respectivamente.

Tabela 9. Actividade antifúngica de extractos de *D. intermedia* em leveduras, determinada pelo método de difusão em agar^a.

Espécie	Extracto (1mg/disco)				Antifúngico de referência	
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	Hexânico purificado	Nistatina (10 unidades/disco)	Miconazole (0,02 mg/disco)
<i>Z. bailii</i> PYCC 4806	46,67 ± 0,88 a	33,67 ± 2,33 b	5,67 ± 2,85 d	49,33 ± 1,86 a	26,00 ± 1,00 c	36,33 ± 0,88 b
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	29,33 ± 1,86 b	19,00 ± 0,00 c	-	37,67 ± 2,73 a	26,00 ± 0,58 b	35,00 ± 0,58 a
<i>D. hansenii</i> PYCC 2968	47,33 ± 0,67 b	33,33 ± 1,20 c	5,00 ± 2,52 d	58,33 ± 1,45 a	8,67 ± 0,33 c	36,67 ± 0,88 b
<i>P. membranaefaciens</i> PYCC 2489	30,67 ± 0,67 b	20,00 ± 0,58 e	-	36,00 ± 0,58 a	22,67 ± 0,33 c	27,33 ± 0,67 b

^a Diâmetro da zona de inibição (mm), incluindo o diâmetro do disco de 6 mm; extracto inactivo (-). Os valores representam a média ± erro padrão de três repetições. Para um mesmo microrganismo, ou seja, numa mesma linha, letras diferentes representam médias significativamente diferentes, de acordo com o teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Tabela 10. Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g/mL}$) dos vários extractos de *D. intermedia* e do antifúngico de referência (miconazole) em leveduras.

Espécie	Extracto				Antifúngico de referência (Miconazole)
	Hexânico	Metanólico	Aquoso	Hexânico purificado	
<i>Z. bailii</i> PYCC 4806	7,81	125,00	> 1000	1,95	0,02
<i>S. cerevisiae</i> PYCC 4072	15,63	250,00	> 1000	7,81	0,04
<i>D. hansenii</i> PYCC 2968	3,91	62,50	1000	3,91	0,16
<i>P. membranaefaciens</i> PYCC 2489	7,81	250,00	> 1000	3,91	0,31

O extracto purificado de *D. intermedia*, que demonstrou bastante eficiência na inibição do crescimento de leveduras, tinha sido já analisado composicionalmente por Grevenstuk *et al.* (2009c). Estes autores analisaram o referido extracto por Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS), por gradiente de percentagem de acetonitrilo em água, de modo a determinar os compostos maioritariamente responsáveis pela actividade. O cromatograma obtido (Figura 10) revelou que a composição do extracto supracitado se restringia a um composto quase puro, cuja comparação com a literatura (Lee & Lee, 2008) e análise por Espectroscopia de Massa e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear provou ser a naftoquinona plumbagina (Figura 11).

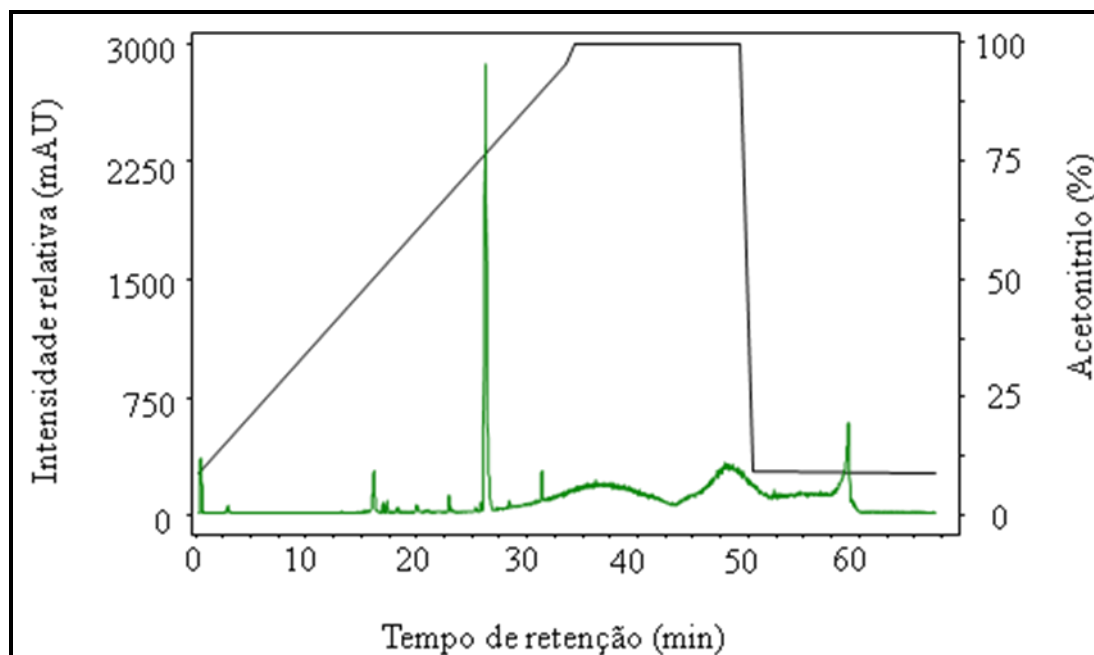


Figura 10. Cromatograma HPLC-MS do extracto hexânico purificado de *D. intermedia* – Grevenstuk et al. (2009c).

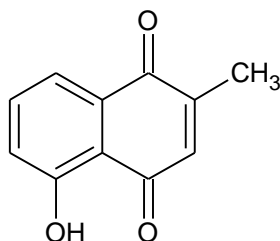


Figura 11. Composto maioritário do extracto hexânico purificado de *D. intermedia* - plumbagina.

Como já foi referido anteriormente, *D. intermedia* é uma planta cujo significado terapêutico tem sido abordado devido ao seu reconhecimento na medicina popular (Grevenstuk *et al.*, 2009a). Os estudos de Budzianowski (1996) sobre esta espécie relacionam a sua importância medicinal com as naftoquinonas presentes nas suas folhas, particularmente a plumbagina.

A análise do extracto hexânico de *D. intermedia* purificado revelou uma composição quase exclusiva de plumbagina. A plumbagina, é uma naftoquinona com afinidade para solventes não polares (Marczak *et al.*, 2005). O hexano, utilizado como solvente de extracção, é pouco polar, e esse facto pode explicar a elevada concentração de plumbagina obtida no extracto hexânico e ainda superior no extracto hexânico purificado de *D. intermedia*.

A relação entre a análise composicional do extracto hexânico purificado e as abordagens dos vários autores em relação a esta espécie reveste-se de extrema importância, na medida em que pode justificar o potencial antifúngico do extracto hexânico de *D. intermedia*. Assim, o forte poder antifúngico desempenhado pelo extracto hexânico purificado, quando comparado aos restantes extractos, no decorrer dos dois ensaios anteriores em leveduras (medição dos halos de inibição do crescimento e determinação das concentrações mínimas inibitórias), pode ter o seu fundamento nas grandes quantidades de plumbagina presentes no extracto.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos utilizando o método de difusão em agar e a determinação das concentrações mínimas inibitórias evidenciaram a actividade antifúngica dos extractos de *D. lusitanicum* e *D. intermedia*, tendo-se atingido o objectivo deste estudo.

D. lusitanicum demonstrou possuir uma forte acção inibitória. O crescimento dos fungos filamentosos utilizados no presente estudo foi inibido pelos extractos hexânico e metanólico, observando-se zonas de inibição médias entre $14,00 \pm 0,58$ e $49,00 \pm 3,51$ mm e $10,67 \pm 0,67$ e $40,67 \pm 1,33$ mm, respectivamente. Contudo, apenas as estirpes de *A. fumigatus* testadas foram susceptíveis ao extracto aquoso. Todas as leveduras estudadas se mostraram sensíveis aos vários extractos da referida planta. Dos extractos aplicados, o extracto hexânico foi o mais activo apresentando concentrações mínimas inibitórias entre 15,63 e 62,50 $\mu\text{g/mL}$ e 7,81 e 15,63 $\mu\text{g/mL}$ para fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. O extracto aquoso mostrou possuir a menor actividade, dando origem a concentrações mínimas inibitórias que variaram entre 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, no caso dos fungos filamentosos e foram superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$, no caso das leveduras.

D. intermedia também apresentou propriedades antifúngicas relevantes. O crescimento de todos os microrganismos estudados foi inibido pelo extracto hexânico bruto e este último, foi o mais activo quando testado em fungos filamentosos, originando zonas inibitórias de $12,67 \pm 0,88$ a $47,67 \pm 0,67$ mm. O extracto metanólico de *D. intermedia* induziu inibição do crescimento de todas as leveduras originando zonas inibitórias médias entre $19,00 \pm 0,00$ e $33,67 \pm 2,33$ mm. No caso dos fungos filamentosos, a inibição do crescimento provocada pelo extracto metanólico de *D. intermedia* verificou-se para *A. niger* MUM 03.43, *P. expansum* MUM 02.03 e para as duas estirpes de *A. fumigatus*. O facto do crescimento de *A. niger* MUM 03.43 ter sido inibido e o mesmo não ter acontecido em *A. niger*, permite concluir que estirpes diferentes da mesma espécie manifestam comportamentos diferentes em relação aos mesmos extractos.

Nenhum fungo filamentoso foi sensível ao extracto aquoso de *D. intermedia* no entanto, observou-se sensibilidade por parte de duas leveduras (*Z. bailii* PYCC 4806 e *D. hansenii* PYCC 2968). Os resultados obtidos provaram que no caso de *D. intermedia* o extracto aquoso foi o menos eficiente para todos os microrganismos testados.

O estudo da composição do extracto hexânico de *D. intermedia* permitiu concluir que este era composto maioritariamente pela naftoquinona plumbagina. Este mesmo extracto provocou uma inibição superior no crescimento de todas as leveduras quando comparado ao extracto hexânico bruto. De facto, o extracto hexânico bruto deu origem a zonas inibitórias de $29,33 \pm 1,86$ a $47,33 \pm 0,67$ mm e o extracto hexânico purificado provocou halos de inibição de $36,00 \pm 0,58$ a $58,33 \pm 1,45$ mm. As diferenças de actividade foram também observadas nos resultados das concentrações mínimas inibitórias, com valores entre 3,91 e 15,63 µg/mL e 1,95 e 7,81 µg/mL para o extracto hexânico bruto e purificado, respectivamente.

Apesar de os extractos de ambas as espécies vegetais terem evidenciado propriedades antifúngicas, verificou-se que os extractos de *D. lusitanicum* se mostraram mais eficazes. A aplicação dos extractos de *D. lusitanicum* originou zonas de inibição médias muitas vezes superiores, quando comparadas às induzidas pela outra espécie e os microrganismos testados evidenciaram um maior número de inibições do crescimento quando expostos aos extractos de *D. lusitanicum*.

A comparação entre o tipo de microrganismos testado também permite concluir que os vários extractos de *D. lusitanicum* e *D. intermedia* provocaram uma inibição no crescimento maioritariamente superior nas leveduras. Estas últimas apresentaram, geralmente, zonas de inibição médias superiores bem como concentrações mínimas inibitórias inferiores (mais saliente no caso dos extractos hexânicos), quando comparado com os fungos filamentosos testados.

No geral, verificou-se que os extractos vegetais de *D. lusitanicum* e de *D. intermedia* evidenciaram um notável potencial antifúngico, o que vai de encontro aos bons resultados antimicrobianos reportados anteriormente para estas plantas e às várias referências no campo da etnofarmacologia relativas à sua utilização. Os resultados revelam-se bastante promissores e sugerem que estas plantas podem ser uma fonte de produtos naturais para o controlo de fungos. No entanto, futuramente, a actividade dos extractos vegetais tem que ser avaliada de modo a determinar o seu verdadeiro efeito ou seja, se os extractos são fungistáticos ou fungicidas. Apesar de existirem estudos que relacionam a actividade dos extractos hexânicos destas plantas à plumbagina, é importante clarificar todos os compostos, destes e dos restantes extractos, responsáveis pela actividade antifúngica bem como os seus mecanismos de acção. A necessidade de averiguar a toxicidade destes extractos em células e organismos animais e os seus

efeitos *in vivo* revela-se também bastante pertinente, de modo a garantir a segurança da sua aplicação ou dos seus componentes activos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abnet CC (2007) Carcinogenic food contaminants. *Cancer Investigation* 25: 189-196.
- Adlassing W, Peroutka M, Eder G, Pois W, Lichtscheidel IK (2006) Ecophysiological observations on *Drosophyllum lusitanicum*. *Ecological Research* 21: 255-262.
- Ahmad I, Beg AZ (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 113-123.
- Aljicevic M, Beslagic E, Zvizdic S, Hamzic S, Rebic S (2008) Mycotoxins. *HealthMED* 2: 176-182.
- Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC (2000) Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology* 56: 191-197.
- Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad JC (2004) *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2421-2428.
- Bajpai VK, Lee TJ, Kang SC (2009) Chemical composition and *in vitro* control of agricultural plant pathogens by the essential oil and various extracts of *Nandina domestica* Thunb. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 109-116.
- Balunas M, Kinghorn A (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431-441.
- Barbour EK, Sharif MA, Sagherian VK, Habre AN, Talhouk RS, Talhouk SN (2004) Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 1-7.
- Bennett JW (2009) *Aspergillus*: a primer for the novice. *Medical Mycology* 47 (suppl. 1): S5-12.
- Boussaada O, Chriaa J, Nabli R, Ammar S, Saidana D, Mahjoub MA, Chraeif I, Helal AN, Mighri Z (2008) Antimicrobial and antioxidant activities of the methanol extracts of *Evax pygmaea* (Asteraceae) growing wild in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1289-1296.

- Bowman SM, Free, SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28: 799-808.
- Brul S, Coote P (1999) Preservatives agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms – Review. *International Journal of Food Microbiology* 50: 1-17.
- Budzianowski J (1996) Naphthohydroquinone glucosides of *Drosera rotundifolia* and *D. intermedia* from *in vitro* cultures. *Phytochemistry* 42: 1145-1147.
- Budzianowski J, Budzianowska A, Kromer K (2002) Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and *callus* cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry* 61: 421-425.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Correia E, Freitas H (2002) *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediterranean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Botanical Journal of Linnean Society* 140: 383-390.
- Cunha AP, Silva AP, Roque OR (2003) *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Portugal.
- Davidson PM, Harrison MA (2002) Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technology* 56: 69-78.
- Davis J (1994) Inactivation of antibiotic and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382.
- Deacon J (2006) *Fungal Biology* (4th edition). Blackwell Publishing, Inglaterra.
- Didry N, Dubreuil L, Pinkas M (1994) Activity of anthraquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria. *Pharmazie* 49: 681-683.
- Eloff JN, Katerere DR, McGaw LJ (2008) The biological activit and chemistry of the southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 686-699.
- Fedorova ND, Harris S, Chen D, Denning DW, Yu J, Cotty PJ, Nierman WC (2009) Using aCGH to study intraspecific genetic variability in two pathogenic molds, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology* 47 (suppl. 1): S34-S41.

- Feher M, Schmidt JM (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43: 218-227.
- Fitzgerald DJ, Stratford M, Narbad A (2003) Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology* 86: 113-122.
- Fleet G (1992) Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12: 1-44.
- Garrido B, Hampe A, Marañon T, Arroyo J (2003) Regional differences in land use affect population performance of the threatened insectivorous plant *Drosophyllum lusitanicum* (Droseraceae). *Diversity and Distributions* 9: 335-350.
- Geweely NS (2009) Anticandidal cytotoxicity, antitumor activities, and purified cell wall modulation by novel Schiff base ligand and its metal (II) complexes against some pathogenic yeasts. *Arch Microbiol* 191: 687-695.
- Gonçalves S, Ferraz M, Romano A (2009a) Phytotoxic properties of *Drosophyllum lusitanicum* leaf extracts and its main compound plumbagin. *Scientia Horticulturae* 122: 96-101.
- Gonçalves S, Quintas C, Gaspar MN, Nogueira JMF, Romano A (2009b) Antimicrobial activity of *Drosophyllum lusitanicum*, na endemic Mediterranean insectivorous plant. *Natural Product Research* 23: 219-229.
- Gould GW (1995) Biodeterioration of Foods and an Overview of Preservation in the Food and Dairy Industries. *International Biodeterioration and Biodegradation*: 267-277.
- Grevenstuk T, Gonçalves S, Nogueira JMF, Romano A (2008) Plumbagin Recovery from Field Specimens of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. *Phytochemical Analysis* 19: 229-235.
- Grevenstuk T, Gonçalves S, Almeida S, Coelho N, Quintas C, Gaspar MN, Romano A (2009a) Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Properties of *in vitro* Cultured *Drosera intermedia* Extracts. *Natural Product Communications* 4: 1063-1068.
- Grevenstuk T, Coelho N, Gonçalves S, Romano A (2009b) *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* in a single step. *Biologia Plantarum* (em impressão).

- Grevenstuk T, van der Hoof JJJ, Gonçalves S, Romano A (2009c) Identification of antimicrobial agents from *Drosera intermedia* using HPLC-MS/HPLC-SPE-NMR. *Planta Medica* 75: 912.
- Haiduven D (2009) Nosocomial aspergillosis and building construction. *Medical Mycology* 47 (suppl. 1): S210-S216.
- Hakura A, Mochida H, Tsutsui Y, Yamatsu K (1994) Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames Salmonella tester strains. *Chemical Research in Toxicology* 7: 559-567.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
- Hernández T, Canales M, Avila JG, García AM, Martínez A, Caballero J, Romo de Vilar A, Lira R (2005) Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 96: 551-554.
- Itoigawa M, Takeya K, Furukawa H (1991) Cardiotonic action of plumbagin on guinea-pig papillary muscle. *Planta Medica* 57: 317-319.
- Jasso de Rodríguez D, Hernández-Castillo D, Rodríguez-García R, Angulo-Sánchez JL (2005) Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 21:81-87.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM (1989) *The Carnivorous Plants*. Academic Press, Inglaterra.
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56: 211-224.
- Kawiak A, Królicka A, Lojkowska E (2003) Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 175-178.
- Koehn FE, Carter GT (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 206-220.
- Larone DH (2004) *Medically important fungi – A guide to identification*. 4th edition, ASM Press, Washington.

- Larsen TO, Frisvad JC, Ravn G; Skaaning T (1998) Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Additives and Contaminants* 15: 671-675.
- Lee C-H, Lee H-S (2008) Acaricidal Activity and Function of Mite Indicator Using Plumbagin and Its Derivates Isolated from *Diospyros kaki* Thunb. Roots (Ebenaceae). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 314-321.
- Lee ML, Schneider G (2001) Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry* 3: 284-289.
- Lee S-H, Chang K-S, Su M-S, Huang Y-S, Jang H-D (2007) Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control* 18: 1547-1554.
- Leyva JS, Manrique M, Prats L, Loureiro-Dias MC, Peinado JM (1999) Regulation of fermentative CO₂ production by the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 270-275.
- Likhitwitayawuid K, Kaeamatawong R, Ruangrunsi N, Krungkrai J (1998) Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelli*. *Planta Medica* 64: 237-241.
- Loureiro V, Querol A (1999) The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. *Trends in Food Science & Technology* 10: 356-365.
- Loureiro V (2000) Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International* 33: 247-256.
- Loureiro V, Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86: 23-50.
- Magan N, Aldred D (2007) Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119: 131-139.
- Malani AN, Kauffman CA (2007) Changing Epidemiology of Rare Mould Infections: Implications for Therapy. *Drugs* 67: 1803-1812.
- Marczak L, Kawiak A, Lojkowska E, Stobiecki M (2005) Secondary Metabolites in *in vitro* Cultured Plants of the Genus *Drosera*. *Phytochemical Analysis* 16: 143-149.
- McGaw LJ, Lall N, Meyer JJM, Eloff JN (2008) The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 482-500.

- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40: 443-465.
- Melzig MF, Pertz HH, Krenn L (2001) Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae Herba*. *Phytomedicine* 8: 225-229.
- Min B, Miyashiro H, Hattori M (2002) Inhibitory effects of quinines on RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *Phytotherapy Research* 16: S57-S67.
- Mollapour M, Piper PW (2001) The *ZbYME2* gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YMe2 functions in *Saccharomyces cerevisiae*, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives. *Molecular Microbiology* 42: 919-930.
- Müller J, Deil U (2001) Ecology and structure of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link populations in the south-western of the Iberian peninsula. *Acta Botanica Malacitana* 26: 47-68.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test (6th edition.); Approved Standard: M2-A6, Wayne, Pensilvânia.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 9th International Supplement: M100-S9, Wayne, Pensilvânia.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard: M38-A, Wayne, Pensilvânia.
- Nahálka J, Blanárik P, Gemeiner P, Matúšová E, Partlová I (1996a) The chemical/osmotic conditions for growth and plumbagin accumulation of *Drosophyllum lusitanicum* Link. suspension cultures. *Biotechnology Letters* 18: 1453-1458.
- Nahálka J, Blanárik P, Gemeiner P, Matúšová E, Partlová I (1996b) Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. *Journal of Biotechnology* 49: 153-161.

- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports* 17: 215-234.
- Novais MR (1998) *Microbiologia dos alimentos*; em Ferreira WFC, Sousa JCF (1998) *Microbiologia*. Volume 1, Lidel, Portugal.
- Oshero N, Romano J (2007) Molecular techniques for application with *Aspergillus fumigatus*; em Kavanagh K (2007) *Medical Mycology – Cellular and Molecular Techniques*. John Wiley & Sons Ltd, Irlanda.
- Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L (2005) Comparison of the Antiinflammatory Effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM Assay. *Phytotherapy Research* 19: 323-326.
- Parimala R, Sachadanandam P (1993) Effect of plumbagin on some glucose metabolizing enzymes studied in rats in experimental hepatoma. *Molecular and Cellular Biochemistry* 125: 59-63.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147: 2635-2642.
- Pitt JI (2000) Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology* 38 (suppl. 1): 17-22.
- Quintas C, Lima-Costa E, Loureiro-Dias MC (2000) The Effect of Ethanol on the Plasma Membrane Permeability of Spoilage Yeasts. *Food Technology and Biotechnology* 38: 47-51.
- Quintas C, Leyva JS, Sotoca R, Loureiro-Dias MC, Peinado JM (2005) A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *International Journal of Food Microbiology* 100: 125-130.
- Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009) Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8: 157-180.
- Ríos JL, Recio MC (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 80-84

- Rishton GM (2008) Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *The American Journal of Cardiology* 101: 43-49.
- Robinson RK, Batt CA, Patel PD (2000) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Volume 1,2 e 3, Academic Press, Grã-Bretanha.
- Rodrigues F, Côte-Real M, Leão C, Van Dijken, JP, Pronk JT (2001) Oxygen Requirements of Food Spoilage Yeast *Zygosaccharomyces bailii* in Synthetic and Complex Media. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2123-2128.
- Samuelsson G (2004) *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*. 5th Swedish Pharmaceutical Press, Suécia.
- Sangamwar AT, Deshpande UD, Pekamwar SS (2008) Antifungals: Need to Search for a New Molecular Target. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 70: 423-430.
- Schmidt B, Ribnicky DM, Poulev A, Logendra S, Cefalu WT, Raskin I (2008) A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental* 57 (suppl. 1): S3-S9.
- Sharma I, Gusain D, Dixit V (1991) Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effects of plumbagin in rabbits. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 35: 10-14.
- Shukla R, Kumar A, Prasad CS, Srivastava B, Dubey NK (2008) Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62: 348-351.
- Smits GJ, Brul S (2005) Stress tolerance in fungi – to kill a spoilage yeast. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 225-230.
- Sullivan D, Moran G, Coleman D (2005) *Fungal Diseases of Humans*; em Kavanagh K (2005) *Fungi – Biology and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, Irlanda.
- Tegegne G, Pretorius JC (2007) *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from Ethiopian wild plants against economically important plant pathogens. *BioControl* 52: 877-888.
- Terr AI (2009) Sick Building Syndrome: is mould the cause? *Medical Mycology* 47 (suppl. 1): S217-S222.

Thum M (1986) Segregation of habitat and prey in two sympatric carnivorous plant species, *Drosera rotundifolia* and *Drosera intermedia*. *Oecologia* 70: 601-605.

Yang VW, Clausen CA (2007) Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 302-306.