

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**MARINA PEREIRA DE CAMPOS**

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO**  
**DE EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURAS OBTIDAS DE**  
***Piper solmsianum* C.D.C. VAR. *solmsianum* (PIPERACEAE)**

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas!

Orientador: Dr. Alexandre (ella Cru)

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**MNOS a ri POa**

Dedico este trabalho às pessoas que sempre me incentivaram e deram apoio  
para enfrentar e superar as dificuldades encontradas na minha vida:

Aos meus pais, Jordão e Eurilda,  
pelo amor e dedicação;  
Ao meu esposo, Maurício,  
pelo amor e companheirismo.

## **ae P a MNSQ Nm p o**

A Deus, que me guiou e deu força ao longo desta jornada, e em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos pais, Jordão e Eurilda, pelo amor, compreensão e apoio em mais esta etapa.

Ao meu esposo, Maurício, pela presença constante, pelo carinho e amor que me dedica.

Aos meus irmãos Volnei e Jordana, pelo apoio e amizade.

À minha cunhada Márcia, pela ajuda com as estruturas químicas, e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz, pela orientação, dedicação, profissionalismo, e sobretudo, pela compreensão e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. MSc. Rosana Cé Bella Cruz, pelo auxílio com a parte dos fungos, e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho e Rosi Zanoni da Silva, por terem fornecido os componentes da planta para a realização dos ensaios biológicos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Regina Orofino Kreuger, pela orientação dos experimentos com animais. Aos pesquisadores do laboratório de odontologia pela ajuda na confecção das lâminas, e à Dona Maria, que me auxiliou com os animais.

Ao Prof. Henri Stucker, pela ajuda prestada na análise estatística.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maique Weber Biavatti, pelo auxílio no ensaio de toxicidade sobre

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Malheiros e ao Prof. Dr. Celso Vatura Nakamura, pela participação como membros da banca, e pelas considerações e sugestões que certamente acrescentaram na qualidade do trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE  
EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURAS OBTIDAS  
DE *Piper solmsianum* C.D.C. VAR. *solmsianum*  
(PIPERACEAE).**

**Marina Pereira de Campos**

&gosto=+ , , -

" orientador# Dr! &le' andre ( ella Cru)  
Orea de Concentração# Microbiologia!  
1>mero de \$?ginas# @A

& esp5cie *Piper solmsianum* pertence à família Piperaceae\* que é composta por cerca de 2000 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo! & química de *P. solmsianum* não foi completamente investigada\* e há poucos estudos referentes a atividades biológicas desta planta! " presente trabalho avaliou as propriedades antimicrobianas do extrato metanólico

# ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF EXTRACT, FRACTIONS AND PURE COMPOUNDS OBTAINED FROM *Piper solmsianum* C. DC. VAR. *solmsianum* (PIPERACEAE).

Dr. S. L. S. G. 111 S. G. 21 S. S. 3456  
August+, , -

Advisor# &le' andre (ella Cru)\* Dr!  
&rea o% Concentration# MicrobiologK!  
1 umber o% \$ages# @A

The species *Piper solmsianum* belong to the family Piperaceae. The genus is comprised of about 1000 species and is widely distributed in the tropical and subtropical zones of the world. The chemical composition of *P. solmsianum* has not been fully investigated and there are few studies relating to its biological activities. This work evaluated the antimicrobial properties of the crude methanol extract, fractions: ethyl acetate, dichloromethane and ethyl acetate and compounds: conocarpan, conocarpan methylether, eupomatenoide, eupomatenoide and orientin obtained from *P. solmsianum*. The minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined through the method of dilution in agar using a cell suspension against the Gram-positive bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Streptococcus agalactiae*. The components extracted from the *P. solmsianum* also showed activity against fungi: particularly the dermatophytes *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. The bioautographic test revealed the inhibition zones relating to the conocarpan, eupomatenoide and another compound as yet unidentified. The antimicrobial activity of *P. solmsianum* appears to be related to the presence of conocarpan, eupomatenoide, orientin and another compound not yet identified. The histopathologic evaluation of inflammation induced by *Staphylococcus aureus* demonstrated that the groups treated with CM of *P. solmsianum* showed the process of regeneration of the tissue in lesser time (less delay) in the process of lesion repair. When compared with the control group, the toxicity assay using *Artemia salina* demonstrated that the CM and the fraction: ethyl acetate of *P. solmsianum* presents moderate toxicity (LD<sub>50</sub> of 0.125 mg/kg and 0.125 mg/kg respectively). The fraction: ethyl acetate showed low toxicity (LD<sub>50</sub> of 0.125 mg/kg and 0.125 mg/kg) and the fraction: dichloromethane and the conocarpan substance showed toxicity (LD<sub>50</sub> of 0.125 mg/kg and 0.125 mg/kg respectively). Moreover, the compounds conocarpan, methylether, eupomatenoide, eupomatenoide and orientin did not present toxicity (LD<sub>50</sub> of 0.125 mg/kg, 0.125 mg/kg, 0.125 mg/kg, 0.125 mg/kg).

Keywords# Activity antimicrobial\* *Piper solmsianum*\* Conocarpan\* .upomatenoide\* " orientin!

## 700 ragM80e BP ao

8 ■ Is g	C. DC. (Piperaceae) .....	32
8 ■ Is g	Fluxograma da obtenção de extrato, frações e substâncias de .....	39
8 ■ Is gV	Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas de e conocarpano metilado .....	51
8 ■ Is ga	Avaliação da porcentagem da área de necrose dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento .....	60
8 ■ Is g\$	Avaliação da porcentagem de neutrófilos dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento .....	62
8 ■ Is g	Avaliação da porcentagem de macrófagos dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento .....	63
8 ■ Is g&	Avaliação da porcentagem de fibroblastos dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento .....	64
8 ■ Is g~	Avaliação da porcentagem de vasos sanguíneos dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento .....	66



## 700 ragMga JP N Oa rBP aogNgc 7 ao

AE: Acetato de Etila.

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

ATCC: American Type Culture Collection.

BHI: Brain Heart Infusion (Caldo de Infusão de Cérebro e Coração).

CBM: Concentração Bactericida Mínima.

C: CEREMIC.

CC: Cromatografia em Coluna.

CCD: Cromatografia em Camada Delgada.

CEREMIC: Centro de Referências Micológicas.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

CL: Control Lab. ®

DCM: Diclorometano.

DL<sub>50</sub>: Dose Letal de 50%.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EMB: Extrato Metanólico Bruto.

Fr.: Fração de Extrato Metanólico Bruto.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NIQFAR: Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas

ORSA: Oxacillin Resistant ( resistente à oxacilina).

RMN <sup>13</sup>C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13.

RMN <sup>1</sup>H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

TTC: 2,3,5-Triphenyl-2H-Tetrazolium Chloride (Cloroeto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio).

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVALI: Universidade do Vale do Itajaí.



4.4.4 Bioautografia .....	43
4.4.5 Avaliação do Efeito do Conocarpano Sobre a Parede Fúngica.....	44
4.5 <u>Avaliação Histopatológica da Inflamação Induzida por</u> .....	45
4.5.1 Animais .....	45
4.5.2 Indução da Lesão .....	46
4.5.3 Procedimentos para o Estudo Morfológico .....	47
4.5.4 Avaliação da Quantidade de Tecido Necrosado .....	47
4.5.5 Quantificação de Neutrófilos .....	47
4.5.6 Quantificação de Células Mononucleares .....	47
4.5.7 Quantificação de Fibroblastos .....	48
4.5.8 Estudo da Angiogênese .....	48
4.5.9 Análise Estatística .....	48
4.6 <u>Ensaio de Toxicidade com</u> .....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
5.1 <u>Análises Fitoquímicas</u> .....	50
5.2 <u>Atividade Antibacteriana</u> .....	50
5.3 <u>Bioautografia</u> .....	54
5.4 <u>Atividade Antifúngica</u> .....	55
5.5 <u>Avaliação do Efeito do Conocarpano Sobre a Parede Fúngica</u> .....	58
5.6 <u>Avaliação Histopatológica da Inflamação Induzida por</u> .....	59
5.4 <u>Teste de Toxicidade com</u> .....	67
6 CONCLUSÕES .....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
ANEXOS.....	83



Devido à necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana e estendendo estudos prévios desenvolvidos no NIQFAR, nos propomos a avaliar a atividade antimicrobiana da espécie \_\_\_\_\_ uma planta medicinal brasileira da família Piperaceae

**02 J5 N0 p o**

**0 0 p . : 10 F5 g 11 s j**

Avaliar a atividade antimicrobiana e potencial de toxicidade de extrato, frações e substâncias puras obtidas de

**0 0 p . : 10 F5 g 11 s j**

Avaliar a atividade antibacteriana de extrato, frações e substâncias puras obtidas de

- Avaliar a atividade antifúngica de extrato, frações e substâncias puras obtidas de
- Direcionar a pesquisa através de ensaios de bioautografia, para localizar os componentes com potencial antimicrobiano.
- Avaliar o efeito da substância conocarpano sobre a parede celular fúngica.
- Analisar a influência do extrato de no processo inflamatório induzido por , em camundongos.
- Avaliar a toxicidade de em presença do microcrustáceo

**VP N Oo- p gDJ7Q e Px 8OS a**

**VD S5U5156g. ( 6 55665 . Lig25 1U)s 6g EN55 56s 6**

A infecção é uma doença que envolve a presença de microrganismos (bactérias, fungos, vírus e protozoários) em um hospedeiro vivo. Uma infecção está presente quando microrganismos invasores estimulam uma evidente resposta do hospedeiro. Inicialmente ocorre a penetração do agente infeccioso (microrganismos) no corpo do hospedeiro e há proliferação (multiplicação dos microrganismos), com conseqüente apresentação de sinais e sintomas. Um microrganismo capaz de causar uma infecção é, com freqüência, referido como patogênico; o grau ou a extensão (patogenicidade) na qual um microrganismo pode causar dano a um hospedeiro infectado é conhecido como virulência (KONEMAN et al., 2001).

A ocorrência de uma doença infecciosa em presença de um microrganismo depende da relação entre a resistência do hospedeiro, a virulência do microrganismo e, algumas vezes, do efeito das terapias profiláticas. Para instalar uma doença infecciosa, um microrganismo deve: a) alcançar o hospedeiro e encontrar uma porta de entrada; b) superar as defesas do hospedeiro; c) invadir e proliferar nos tecidos do hospedeiro e produzir toxinas ou outros fatores de virulência; e d) ser capaz de resistir às defesas do hospedeiro (ibidem, 2001).

Os microrganismos podem alcançar o hospedeiro por vias exógenas (inalação, ingestão, contato direto ou inoculação) ou endógenas (após ruptura de barreiras naturais, modificações na virulência da “microbiota normal” ou modificações nos mecanismos de defesa do hospedeiro) (SCHAECHTER et al., 2002).

**VDg 5L5lbs U63 56**

**VD Dg.Js 50 L56**

As bactérias são seres procarióticos com organização relativamente simples, que se reproduzem por divisão assexuada. Esses microrganismos são formados por várias estruturas, que diferem de uma espécie para outra (MURRAY et al., 2000).

Como todas as células, as bactérias têm uma estrutura essencial, a membrana citoplasmática. A maioria das bactérias possui externamente à membrana, uma espessa e rígida camada; a parede celular. Envolvendo a parede, pode ocorrer uma terceira camada, a cápsula. No interior da célula, além do citoplasma, encontra-se uma região correspondente ao

núcleo, chamada nucleóide, e grânulos diversos. Frequentemente ocorrem prolongamentos filamentosos que partem da superfície bacteriana, são os flagelos e as fimbrias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

Dentre as principais funções da membrana pode-se citar o papel dela como barreira seletiva para a entrada de moléculas na célula, sendo responsável pela absorção e transporte de nutrientes. A membrana também contém várias enzimas, algumas envolvidas na produção de energia e síntese da parede celular (MIMS et al., 1999).

A parede celular de organismos procarióticos consiste em uma estrutura rígida, que mantém a forma característica de cada célula bacteriana (esférica ou cocos, bastonetes ou bacilos e espiraladas ou hélices). A parede previne a expansão e eventualmente o rompimento da célula devido à entrada de água. Além disso, é normalmente essencial para o crescimento e divisão da célula (BLACK, 1996).

Conforme as características da parede celular, as bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas. As diferenças entre esses grupos estão baseadas principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície (SCHAECHTER et al., 2002).

O principal componente estrutural da parede celular é o peptidoglicano, um polímero misto de açúcares e aminoácidos. Nas bactérias Gram-positivas o peptidoglicano forma uma camada espessa (20-80 nm), externa à membrana celular e pode conter outras macromoléculas. Nas bactérias Gram-negativas a camada de peptidoglicano é delgada (5-10 nm) e superposta por uma membrana externa, ancorada a moléculas lipoprotéicas no peptidoglicano. As principais moléculas da camada externa são lipopolissacarídeos (LPS) e lipoproteínas (TRABULSI et al., 1999).

Os aminoácidos carregados e os polissacarídeos tornam a camada de peptidoglicano altamente polar, proporcionando à bactéria uma superfície hidrofílica espessa. É esta propriedade que permite que os organismos Gram-positivos impeçam a passagem de substâncias hidrofóbicas (MIMS et al., 1999).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é hidrofílica, mas os componentes lipídicos das moléculas constituintes conferem propriedades hidrofóbicas também. Devido à membrana externa apresentar características lipoprotéicas, as bactérias necessitam dispor de mecanismos que permitem a entrada de substâncias hidrofílicas como: açúcares, aminoácidos e certos íons. Por isso, sua membrana externa possui canais especiais chamados de porinas, que permitem a difusão passiva de substâncias hidrofílicas (SCHAECHTER et al., 2002).

Entre as membranas externa e plasmática há um compartimento chamado de espaço periplasmático ou periplasma. Esse compartimento contém uma camada de peptidoglicano e

uma solução de componentes, semelhantes a um gel, que facilita a nutrição. Isso inclui enzimas hidrolíticas (proteases, nucleases, lipases, etc), responsáveis pela quebra de macromoléculas, às quais a membrana citoplasmática é impermeável. Além disso, o periplasma contém proteínas transportadoras de solutos que participam do transporte de substâncias para o interior das células. Também contém enzimas como as  $\beta$ -lactamases, capazes de inativar algumas drogas, tornando a célula resistente a elas. De modo geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a muitos antimicrobianos (SCHAECHTER et al., 2002; TRABULSI et al., 1999).

## **Os estreptococos do grupo A**

são cocos Gram-positivos, que fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves, e estão amplamente distribuídos na natureza, sendo os agentes mais comuns de infecções piogênicas (VOLK et al., 1996). Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas. Quando na pele, produz uma resposta inflamatória intensa podendo causar foliculite, furunculose, impetigo, carbúnculo ou abscessos subcutâneos (SCHAECHTER et al., 2002). Em indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão, esse microrganismo pode causar infecções de caráter mais grave. Entre as infecções profundas destacam-se a osteomielite, a bacteremia, a endocardite e a pneumonia (MIMS et al., 1999). Além de infecções piogênicas, o *S. pyogenes* pode causar intoxicação alimentar, provocada pela ingestão de enterotoxinas previamente formadas no alimento contaminado (TRABULSI et al., 1999).

*S. pyogenes* é considerado, depois de *S. pneumoniae* o agente mais freqüente de infecções urinárias, tais como cistite e pielonefrite agudas. Sua patogenicidade parece estar relacionada a sua capacidade de aderir às células do epitélio do trato urinário (TRABULSI et al., 1999).

Os estreptococos formam um grupo heterogêneo de bactérias que incluem espécies que colonizam e infectam seres humanos e animais. Nos seres humanos, os estreptococos causam várias doenças, incluindo faringite, meningite neonatal, abscesso cerebral, endocardite e gangrena. Os estreptococos do grupo B de Lancefield habitam, em sua maioria, o trato gastrointestinal e o trato genital feminino e pertencem à espécie *S. agalactiae*. Constituem a principal causa de sepse e meningite neonatais. Podem causar também celulite e

prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação. Podem desenvolver-se em alimentos e produzir enterotoxina ou toxina emética, causando intoxicação alimentar. Algumas vezes, estes microrganismos podem produzir patologias em seres humanos imunocomprometidos, entre as quais, meningite, endocardite, conjuntivite e gastroenterite aguda (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

### **VD 1 DgJs 50 Ls F6g Is 3q Ulbs s0S 6g r16s 2s 6**

é um bacilo Gram-negativo anaeróbico facultativo da família Enterobacteriaceae. É a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos e já foi associada a doenças infecciosas envolvendo virtualmente todos os tecidos e sistemas orgânicos humanos. É um dos microrganismos envolvidos em septicemias por Gram-negativos e em choque induzido por endotoxinas. As infecções do trato urinário e de feridas, a pneumonia em pacientes imunossuprimidos hospitalizados e as meningites em neonatos são outras formas comuns de infecções causadas por (KONEMAN et al., 2001).

Certas cepas de podem causar enterite ou gastroenterite através de mecanismos diferentes que causam síndromes distintas. Essas cepas, que produzem enterotoxinas, têm sido classificadas como: enterotoxigênica-ETEC, enteroinvasora-EIEC, enteropatogênica-EPEC, êntero-hemorrágica-EHEC e enteroagregativa-EaggEC, de acordo com o grau de invasibilidade celular (KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 1999).

O gênero é vasto, compreendendo mais de 2300 variedades sorológicas. A patogenicidade deste gênero varia de acordo com o tipo sorológico da bactéria, idade e estado imunológico do hospedeiro. De modo geral, os sorotipos de , causam, no adulto saudável, apenas enterocolite que evolui sem complicações. Entretanto, existem quatro síndromes clínicas associadas ao gênero : gastroenterite, infecção focal do endotélio vascular, infecções de determinado sistema de órgãos, e febre tifóide (SCHAECHTER et al., 2002).

é o mais importante patógeno humano no gênero. Considerando que a é uma bactéria ubiqüitária e faz parte da microbiota humana, ela raramente se torna a causa de infecções em indivíduos saudáveis. No entanto, em ambientes hospitalares, esta bactéria torna-se um agente infeccioso importante, principalmente em pacientes predispostos, que apresentam quebras de barreiras físicas e imunossupressão. Além disto, o número de fatores de virulência é significativamente maior



conhecidos como fungos dimórficos. Nas formas filamentosas, a massa das hifas forma um micélio. A reprodução assexuada resulta na formação de esporângios que liberam os esporos através dos quais os fungos são dispersos; os esporos são uma causa comum de infecção após inalação. Nas leveduras, a forma característica é unicelular com reprodução por divisão. Também pode ocorrer brotamento com o broto permanecendo ligado, formando as pseudo-hifas. As formas dimórficas formam hifas em temperatura ambiente, mas sob alterações de temperatura, podem crescer como leveduras no hospedeiro (MIMS et al., 1999).

Toda micose se inicia pela implantação no hospedeiro, de um fungo apto ao parasitismo. Os fungos, quer mecanicamente, quer por meio de suas “toxinas” ou outros metabólitos, determinam processos inflamatórios que variam em extensão e em tipo anatomopatológico conforme o agente responsável pelos mesmos (LACAZ et al., 2002).

Os fungos patogênicos que colonizam os humanos e causam doenças possuem características que permitem a sua classificação em grupos de acordo com os tecidos primários que colonizam: agentes fúngicos que causam infecções superficiais, infecções cutâneas, doença subcutânea e doença sistêmica. Os fungos que causam infecções superficiais tendem a crescer apenas nas camadas mais externas da pele ou na cutícula da diáfise dos pêlos, induzindo raramente uma reação imune. Estas infecções são de natureza estética e são facilmente diagnosticadas (MURRAY et al., 2000).

As micoses cutâneas, também denominadas dermatomicoses, são produzidas pelos fungos dermatófitos, que vivem à custa da queratina da pele, pêlo, unhas e mucosas (TRABULSI et al., 1999). Os principais gêneros de fungos dermatófitos são: (MIMS et al., 1999). Esses fungos são adquiridos por contato com solo contaminado ou com animais ou humanos infectados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Os fungos que causam doença subcutânea possuem baixo grau de infectividade, e as infecções causadas por estes microrganismos usualmente estão associadas a alguma forma de lesão traumática. Os fungos causadores de doença sistêmica afetam as vias respiratórias. Estes fungos possuem características morfológicas que contribuem para a sua capacidade de sobreviver no hospedeiro. Dependendo do sistema imunológico do paciente, estas doenças podem ser potencialmente fatais (MURRAY et al., 2000).

Micoses oportunistas são infecções cosmopolitas causadas por fungos de baixa virulência, que convivem pacificamente com o hospedeiro, mas ao encontrar condições favoráveis, como distúrbios do sistema imunológico, desenvolvem seu poder patogênico, invadindo os tecidos. Atingem indivíduos de ambos os sexos, de todas as faixas etárias e raças (MURRAY et al., 2000; STEVENS; LOWE, 1998).

Os fatores que predisõem às micoses oportunistas podem ser classificados em: fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro, como neoplasias, diabetes, hemopatias diversas, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e todas as doenças que alteram a imunidade celular (FUKAI et al., 2003).

Outros fatores que aumentam o risco de infecções por fungos oportunistas incluem indivíduos com transplantes de medula óssea ou de órgão, queimaduras, traumatismo ou doenças que necessitam de uso prolongado de catéteres intravenosos ou intra-arteriais. Os pacientes que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, também correm risco. Além disso, são observadas infecções fúngicas oportunistas em pacientes que receberam terapia antibacteriana de amplo espectro e cuja flora bacteriana intestinal normal foi acentuadamente reduzida. Nesses casos fungos como *Candida albicans* proliferam desenfreadamente, podendo substituir as bactérias da microbiota normal (SCHAECHTER et al., 2002).

Os fungos que provocam micoses sistêmicas oportunistas são quase ubíquos. Podem fazer parte de nossa flora, que são oportunistas endógenos (*Candida albicans* e leveduras relacionadas), ou podem ser inalados ou ingeridos a partir do ambiente (fungos exógenos) (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

A incidência de severas, invasivas e oportunistas infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos está aumentando em uma razão alarmante. A mortalidade entre pacientes infectados pode ser maior que 75 %, podendo chegar a 100 %, apresentando um enorme desafio para profissionais da saúde. A maioria dos fungos patogênicos comuns são espécies de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (RANDHAWA; SHARMA, 2004), *Candida albicans* (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

A candidíase, também denominada de candidose, é infecção causada por fungos do gênero *Candida*. Trata-se de membros da microbiota da pele, das mucosas e do trato gastrintestinal. As espécies de *Candida albicans* colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena. (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). O agente mais comum da candidíase é a *Candida albicans*, mas outras espécies têm sido também identificadas como:

(TRABULSI et al., 1999).

Casos de candidíase ocorrem em todas as partes do mundo, nas mais variadas formas clínicas. O espectro das manifestações clínicas varia desde infecções superficiais da pele até infecções sistêmicas potencialmente fatais (MURRAY et al., 2000).

A criptococose está habitualmente incluída entre as infecções fúngicas oportunistas, embora ocorra também em indivíduos imunocompetentes. Nos últimos anos, a infecção criptocócica, em particular a meningite, tem sido observada mais proeminentemente em pacientes com AIDS. O agente etiológico da criptococose é uma levedura encapsulada, que é encontrada nos excrementos de aves, particularmente de pombos. O microrganismo também é encontrado em frutas e vegetais em decomposição. O microrganismo é inalado nos pulmões, onde pode causar pneumonia. Entretanto, a manifestação clínica mais freqüente é a meningite (SCHAECHTER et al., 2002).

Os pertencem ao grupo dos fungos filamentosos e são ubíquos e podem facilmente crescer em culturas a partir do ar, do solo ou de vegetação com bolor. A principal espécie patogênica é porém outras espécies também podem causar doenças. Das espécies existentes, apenas oito são agentes de infecção, entre eles

(ZAITZ et al., 1998).

Os fungos do gênero não fazem parte da flora normal dos seres humanos e não crescem em tecidos saudáveis, só provocam doença invasiva em indivíduos profundamente imunocomprometidos, sobretudo aqueles com neutropenia. Os pulmões ou os seios paranasais constituem habitualmente o local inicial de invasão. As lesões observadas em radiografias incluem consolidação focal, pneumonia lobar e cavidades pulmonares que contêm “bolas de fungo”. Os pacientes com essas infecções invasivas também apresentam abscessos intracerebrais, úlceras necróticas da pele e lesões do osso, do fígado e das mamas, o também pode causar doença não infecciosa, como alergia ou asma após inalação e crescimento do fungo na árvore brônquica (aspergilose broncopulmonar alérgica). Além disso, elaboram produtos metabólicos tóxicos, as aflatoxinas, que são hepatotóxicas ou carcinogênicas, embora seu papel no câncer humano ainda não tenha sido estabelecido (SCHAECHTER et al., 2002).

A mucormicose é uma infecção geralmente aguda e grave, causada por fungos da ordem (classe ). São fungos isolados com freqüência do solo, de material orgânico em decomposição, frutas e pão de trigo e centeio. Existem no meio ambiente, sendo que as espécies de e estão entre os mais freqüentes fungos contaminantes do ar. Podem também fazer parte da biota normal do homem, sendo isolados

da pele, dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário. Os quadros agudos da doença podem ser rinocerebrais, pulmonares e gastrintestinais, apresentando ainda, trombose, invasão vascular e infartos. Pode haver comprometimento cutâneo e subcutâneo secundário a doença sistêmica ou acometimento primário da pele sobre lesões preexistentes em grandes queimados e pacientes imunodeprimidos (ZAITZ et al., 1998).

### VD 0 DgML3s 06 16

As micoses cutâneas são doenças da pele, pêlos e unhas. Em geral, são restritas às camadas queratinizadas do tegumento e seus apêndices. Ao contrário das infecções superficiais, podem ser produzidas várias respostas imunes celulares nas infecções cutâneas, causando alterações patológicas no hospedeiro, que podem manifestar-se nos tecidos mais profundos da pele. A intensidade da resposta parece estar diretamente relacionada com o estado imunológico do hospedeiro e com a cepa ou espécie de fungo envolvido na infecção (MURRAY et al., 2000).

Os dermatófitos transformam o material queratinofílico em material nutritivo, utilizando-o também para sua implantação no hospedeiro. Por outro lado, produzem elastases, que lhes permitem agir sobre a elastina, o que também auxiliaria na sua instalação. Os dermatófitos são fungos taxonomicamente relacionados, pertencentes aos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, com mais de 45 espécies (TRABULSI et al., 1999).

Na pele, os dermatófitos causam, geralmente, lesões descamativas, circulares, com bordos eritematosos, microvesiculosas, de propagação radial, com tendência à cura central. Na unha, a infecção inicia-se pela borda livre, podendo atingir a superfície e área subungueal. As unhas tornam-se branco-amareladas, porosas e quebradiças, os agentes mais comuns são *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. No pêlo, os dermatófitos atacam a camada superficial, avançando até o folículo piloso. O pêlo perde o brilho, torna-se quebradiço. Lesão geralmente única, com grande capacidade inflamatória, representada por microabscessos, tem como agentes mais comuns *Trichophyton tonsurans* e *Microsporum canis* (MARCHISIO; PREVE; TULLIO, 1996).

As dermatofitoses recebem também o nome de tineas seguidas do nome do sítio atingido como: *Tinea capitis* (do couro cabeludo), *Tinea barbae* (da barba), *Tinea corporis* (do corpo), *Tinea unguium* (da unha), *Tinea pedis* (dos pés) etc. (ZAITZ et al., 1998).

Os hábitos ambientais e culturais associados aos tipos de roupas e calçados contribuem para a incidência de dermatofitose. Estudos realizados em populações

institucionalizadas e famílias mostram que as condições de vida em aglomerações constituem fatores importantes na disseminação das infecções. Os fatores imunológicos também contribuem para a sua incidência, e as evidências sugerem que a resistência natural mediada por células a essas infecções é importante (SCHAECHTER et al., 2002).

De acordo com a adaptação ao parasitismo, os dermatófitos são classificados em antropofílicos, melhor adaptados ao homem, como *Trichophyton rubrum*; zoofílicos, parasitas primitivamente de animais, como *Trichophyton mentagrophytes*; geofílicos, encontrados mais freqüentemente no solo, ocasionalmente parasitas do homem e de animais, como, por exemplo, *Trichophyton terrestris* (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

O *Trichophyton mentagrophytes* é o agente da *Tricofitose* e *Tricofitose* (região genital), em crianças e adultos. É uma espécie geofílica, de distribuição mundial, encontra-se no solo de jardins provocando lesões inflamatórias e impetiginosas (LACAZ et al., 1998).

O *Trichophyton mentagrophytes* é altamente contagioso e facilmente transmitido de animal para animal, e de animais para humanos. A transmissão pessoa a pessoa é rara. As crianças são mais afetadas que os adultos, devido a ausência de ácidos graxos fungicidas, que nelas estão ausentes até a puberdade. Comumente *Trichophyton mentagrophytes* provoca *Tricofitose* e *Tricofitose* (FISHER; COOK, 2001).

O *Trichophyton mentagrophytes* é um dermatófito cosmopolita, sendo a espécie mais isolada do homem e dos animais. Devido às complexidades morfológicas, ecológicas e genéticas, possui pelo menos cinco diferentes variedades:

*Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton mentagrophytes*. A variedade *Trichophyton mentagrophytes* infecta grande número de animais, no homem provoca *Tricofitose* e algumas vezes invasão da lâmina ungueal, apresentando pontos brancos na unha, não invade o cabelo *Trichophyton mentagrophytes*, mas perfura o pêlo *Trichophyton mentagrophytes*. Produz, particularmente em trabalhadores rurais, lesões mais inflamatórias de pele e couro cabeludo (TRABULSI et al., 1999).

*Trichophyton mentagrophytes* é uma espécie antropofílica de distribuição mundial, atinge cerca de 40% dos casos de *Tricofitose* é o agente etiológico da *Tricofitose*, *Tricofitose* e onicomicose das mãos e dos pés. Este fungo pode infectar os pêlos e a pele. Processos inflamatórios causados por esses agentes são geralmente crônicos, algumas vezes com lesões profundas chamadas de granulomas tricofíticos (FISHER; COOK, 2001).

*Trichophyton mentagrophytes* é o único patógeno neste gênero, infecta a pele e as unhas, mas não os pêlos (BROOKS et al., 2000). Trata-se de um fungo antropofílico altamente contagioso, responsável por casos de *Tricofitose* e onicomicose (FISHER; COOK, 2001).

As dermatofitoses estão entre as infecções mais prevalentes no mundo. Embora possam ser persistentes e incômodas, não são debilitantes nem potencialmente fatais, embora anualmente sejam gastos milhões de dólares no seu tratamento (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Além disso, as drogas usadas contra dermatofitoses exibem vários efeitos adversos e tem eficácia limitada (SOUZA et al., 2003).

## **Vigab 1U16s UOB FL5. sFU56**

A terapêutica anti-infecciosa constitui-se num dos campos de maior impacto dos avanços da tecnologia e da obtenção de soluções para problemas da área médica. Novos medicamentos contra microrganismos foram descobertos e continuam a ser procurados visando maior potência antimicrobiana, menor toxicidade, melhor comportamento farmacocinético e ação decisiva contra agentes infecciosos resistentes a drogas anteriormente ativas (TAVARES, 1996).

Os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são agentes antibióticos, análogos ou quimioterápicos. Antibióticos são substâncias anti-infecciosas, de origem natural, produzidas metabolicamente por microrganismos, enquanto que os análogos são produzidos por vegetais ou animais, e os quimioterápicos são substâncias antimicrobianas sintéticas (FONSECA, 1999).

Os primeiros agentes antimicrobianos importantes, não eram verdadeiros antibióticos, mas sim antimetabólicos sintéticos. Como por exemplo, o prontosil que é metabolizado a sulfonamida. A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de utilidade clínica, por Alexander Fleming em 1928, deu início a era da antibioticoterapia. O resultado final desse progresso científico refletiu-se na mudança da expectativa de vida de várias doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e de alta mortalidade (SCHAECHTER et al., 2002).

Um agente antimicrobiano ideal deve exibir toxicidade seletiva, a qual pode ser uma função de um receptor específico necessário para a ligação do fármaco, ou pode depender da inibição de eventos bioquímicos essenciais para o microrganismo, mas não para o hospedeiro. Isto deve ocorrer, com maior probabilidade, nos organismos procariotos do que nos eucariotos, em função do maior grau de diferença com as células hospedeiras (MIMS et al., 1999). Sabe-se que muitos antifúngicos são nefro e hepatotóxicos, o que pode ser muitas vezes mais grave do que a própria patologia causada pelo agente microbiano. Algumas substâncias químicas com propriedades antimicrobianas são tão tóxicas que são utilizadas apenas topicamente. Para uso interno, a droga antimicrobiana deve possuir toxicidade

seletiva, por isso deve ser determinada a relação entre a toxicidade para o agente e para o organismo hospedeiro (índice terapêutico) (SCHAECHTER et al., 2002).

Muitas variáveis influenciam no curso de uma determinada infecção e conseqüentemente na terapia, que inclui a concentração do agente antimicrobiano, suas propriedades farmacológicas, a patologia da lesão e seu ambiente bioquímico, bem como o comportamento metabólico do microrganismo. Destes vários fatores, a susceptibilidade inerente dos microrganismos é o objeto para a medida direta, e fornece um ponto de referência para selecionar a terapia mais apropriada (DE SOUZA et al. 2003).

Devido ao fato das células bacterianas e fúngicas diferirem, o modo de ação também é particular para cada microrganismo. Os agentes antibacterianos podem ser classificados seguindo diversos critérios como estrutura química, mecanismo de ação, espectro de ação entre outros (MIMS et al., 1999). Segundo Brooks; Butel e Morse (2000) os antibacterianos podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com o sítio alvo:

- a) Inibidores da síntese da parede celular;
- b) Inibidores da função da membrana celular;
- c) Inibidores da síntese de proteínas (isto é, inibição da tradução e transcrição do material genético);
- d) Inibidores da síntese de ácidos nucléicos.

Os agentes antifúngicos podem ser divididos em três categorias:

- a) Fármacos que afetam a membrana celular (inibidores dos esteróides da membrana fúngica);
- b) Fármacos que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como síntese de DNA, RNA ou proteínas (SCHAECHTER et al., 2002);
- c) Fármacos que inibem a parede celular fúngica (ZACCHINO et al., 2003).

A atividade de substâncias antimicrobianas pode ser dividida em três etapas: as substâncias precisam associar-se aos microrganismos e penetrar nas suas células; precisam ser transportadas para um sítio alvo intracelular, e por último, ligam-se a seus sítios alvos bioquímicos específicos. A resistência a essas substâncias pode ocorrer em cada uma dessas etapas. Os mecanismos de resistência clinicamente relevantes, incluem a síntese de enzimas que inativam a droga, prevenção do acesso ao sítio alvo (inibição da absorção ou aumento da excreção) ou modificação do sítio alvo (SCHAECHTER et al., 2002).

O uso desenfreado de agentes antimicrobianos pode ter contribuído para a resistência dos microrganismos a estes agentes. Associado a esse uso irracional e a resistência, houve um aumento dramático de infecções, principalmente fúngicas, como resultado das imunodeficiências associadas à AIDS, quimioterapia anticancerígena, transplantes, idosos e

neonatos (ZACCHINO, et al., 2003).

O problema da resistência microbiana está crescendo, e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda incerta. Entretanto, podem ser tomadas ações para reduzir este problema, por exemplo, controlar o uso de antimicrobianos, desenvolver pesquisas para melhor entender os mecanismos genéticos de resistência, e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

~~Manj's U06g3 12 F E s 0B 5U0g2 1gU5^ 56s b 1U06s U0B 5L5 . sFU56~~

As plantas são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de medicamentos. Para obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos avanços tecnológicos atuais, ainda é restrita. Este fato possibilita que os compostos químicos presentes nas plantas possam vir a se tornar fármacos em potencial para as mais diferentes moléstias (NODARI; GUERRA, 2000).

Ao se estudar uma planta com relação às suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para o seu desenvolvimento: Os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, etc. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, gerados das vias acetato malonato, e acetato mevalonato, relacionados aos processos adaptativos. São biosintetizados a partir de metabólitos primários, com distribuição restrita a certas plantas e microrganismos (às vezes característico de um dado gênero ou espécie); e caracterizados por uma enorme diversidade química (NIERO et al., 2003).

Metabólitos secundários foram originalmente considerados como paralelos ao metabolismo essencial da célula, e frequentemente como meramente produtos residuais do metabolismo. Acredita-se agora que eles desempenham muitas funções importantes na planta, embora a total função da maioria não seja completamente entendida. O papel dos metabólitos secundários inclui: Proteção contra predadores, incluindo insetos, animais, microrganismos e parasitas; Proteção contra radiação ultravioleta; Participação de substâncias na alelopatia, ou seja, tais substâncias são liberadas da planta no meio ambiente afetando o crescimento, saúde, ação ou população de outra espécie; Participação no metabolismo (processos de

detoxificação, regulação do crescimento e conservação) (RON; WILLS; MORGAN, 2000; SIMÕES et al., 2000).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas constituem uma fonte de substâncias bioativas e o atual interesse científico tem aumentado devido à busca por novos medicamentos originados de plantas (PAIVA et al., 2003; BASILE et al., 2000).

O uso de plantas para fins medicinais tem sido praticado por séculos em muitas partes do mundo, mas a validação de tais benefícios pelos economistas tem chamado atenção nas últimas duas décadas, possivelmente devido a alarmante razão de espécies em extinção. A avaliação pode também ajudar no planejamento de uma própria política pública para a conservação e uso sustentável dos recursos naturais (KUMAR, 2004).

Várias plantas da savana brasileira são usadas na medicina natural, no tratamento de doenças tropicais, incluindo infecções bacterianas. Por outro lado, devido ao desenvolvimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação adequada, as plantas medicinais são muitas vezes usadas de forma incorreta, não produzindo o efeito desejado (PEREIRA et al., 2004). Faltam trabalhos científicos que comprovem a eficácia no tratamento das enfermidades e recursos para o isolamento de substâncias ativas das plantas estudadas e transformá-las em medicamentos (SILVA et al., 2002).

Muitas espécies têm sido utilizadas por causa de suas propriedades antimicrobianas, as quais são atribuídas às substâncias sintetizadas no metabolismo secundário (NASCIMENTO et al., 2000).

Considerando a evolução de genes de resistência aos antimicrobianos (LEE et al., 2003; KÖLER; PECHÈRE; PLÉSIAT, 1999), componentes obtidos de plantas têm se tornado objeto de atenção e por essa razão a indústria farmacêutica está se movimentando para a descoberta ou triagem de substâncias isoladas de plantas medicinais.

O uso de extratos, compostos e substâncias de plantas, ambos com conhecidas propriedades antimicrobianas, podem ser de grande significância em tratamentos terapêuticos. Nos últimos anos, um grande número de estudos tem sido conduzido em diferentes países, para determinar a atividade antimicrobiana de derivados de plantas. Na Turquia Gülçin et al (2004) demonstraram a atividade antimicrobiana de L. Dulger e Gonuz (2004) avaliaram as propriedades antimicrobianas de algumas espécies endêmicas da Turquia. Na Nigéria Ajali e Chukwurah (2004) demonstraram a atividade de extratos e flavonóides isolados de contra muitos microrganismos. Flavonóides isolados de plantas medicinais da Coreia foram testados e indicaram alto potencial como agentes antimicrobianos (SOHN et al., 2004). Na Itália Lo Cantore et al. (2004) avaliaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos de plantas. Outros pesquisadores da

Itália observaram atividade do óleo essencial de *Curcuma longa* contra bactérias Gram-positivas, além da atividade do extrato butanólico contra *Staphylococcus aureus* (FICO et al., 2004). Além das pesquisas citadas, muitas outras têm sido conduzidas no mundo inteiro (DE BOER et al., 2005; TSHIKALANGE; MEYER; HUSSEIN, 2005; CVETNIC; VLADIMIR-KNEZEVIC, 2004; GHASEMI et al., 2004; LEE; EVERTS; BEYNEN, 2004; SOLÍS et al., 2004; VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2004).

No Brasil, Pereira et al. (2004) demonstraram a ação de óleos essenciais de algumas plantas medicinais contra cepas isoladas de infecção urinária. NASCIMENTO et al. (2000) avaliaram a atividade de extratos e substâncias de plantas contra bactérias resistentes. Estudo realizado no Mato Grosso demonstrou a atividade de *Curcuma longa* contra bactérias Gram-positivas (SCHMITT et al., 2003). No NIQFAR da UNIVALI vários pesquisadores comprovaram a atividade antimicrobiana de muitas espécies: Cunico et al. (2003) demonstraram a atividade antifúngica do extrato de *Curcuma longa*; Pretto et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de frações e substâncias de *Curcuma longa* e os resultados indicaram que a planta exibiu atividade contra bactérias Gram-positivas; e Machado et al. (2005) relataram a potente atividade contra bactérias Gram-positivas de *Curcuma longa*.

### **Madags 3s Fig 4 IIs 5k 1**

A família Piperaceae é composta por cerca de 10 gêneros e aproximadamente 2000 espécies. São plantas de distribuição tropical, a maioria é herbácea (existem trepadeiras, arbustos e até raramente árvores) (EVANS, 1991). Os dois maiores gêneros da família: *Piper* e *Peperomia*, encontram-se representados na flora brasileira (JOLY, 1998).

Com mais de 700 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, o gênero *Piper* é uma das mais diversas linhagens entre angiospermas (JARAMILLO; MANOS, 2001). Membros do gênero *Piper* são de comercial, econômica e medicinal importância. Economicamente, a Piperaceae é empregada para a produção de pimenta no mercado de condimentos do mundo todo. As plantas do gênero *Piper* têm sido usadas para muitas aplicações, incluindo remédios da medicina tradicional da China, Índia (sistema Ayurvédico) e América Latina (MA et al., 2004).

Apenas 12 % de espécies do gênero *Piper* foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico (PARMAR et al., 1997), as quais apresentaram uma grande variedade de metabólitos secundários, como neolignanas, alcalóides, lignanas, lactonas, chalconas,

fenilpropanóides, amidas, flavonóides e óleos essenciais (MA et al., 2004; AHMAD; TAWAN, 2002; BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999; SENGUPTA; RAY, 1987).

Espécies do gênero são amplamente utilizadas na medicina popular e, dentre as atividades biológicas descritas para este gênero, podem ser citadas as propriedades antitumorais de algumas amidas obtidas de Jacq., assim como suas propriedades hipotensoras. Outra propriedade é a defesa contra insetos, induzido pela piperona, isolada de Sieb. (SIMÕES et al., 2000), assim como amidas identificadas em frutos de (PARK

Em estudo realizado com plantas da Colômbia, López, Hudson e Towers (2001) observaram atividade de *Trichoderma reesei* contra *Aspergillus niger* (LÓPEZ; MING; TOWERS, 2002). *Trichoderma reesei* indicou um significativo efeito antifúngico para fungos filamentosos e leveduriformes (NGONO NGANE et al., 2003). Alquilfenóis isolados de *Trichoderma reesei* mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ORJALA et al., 1998; ABE; TAKIKAWA; MORI, 2001). Foi determinada a atividade antifúngica de flavanonas e hidroquinonas feniladas de *Trichoderma reesei* Kunth, através do ensaio bioautográfico contra *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* (DANELUTTE et al., 2003). Amidas presentes em várias espécies do gênero *Trichoderma*, foram estudadas e, também demonstraram atividade antifúngica (NAVICKIENE et al., 2003; VASQUES DA SILVA et al., 2002; NAVICKIENE et al., 2000; ALÉCIO et al., 1998). Em extratos de *Trichoderma reesei* observou-se atividade antimicrobiana (LENTZ et al., 1998; ORJALA et al., 1993) e molusquicida (ORJALA et al., 1993). Propriedades antimicrobianas também têm sido observadas em *Trichoderma reesei* Forst. (COSTA, 1994; BRUNETON, 1991).

### ***Madia peruviana* S. G. M. S. 1**

*Madia peruviana* é um arbusto, que mede de 1 a 3 metros, com distribuição tropical, freqüente na mata com luz difusa, em planícies alagadiças, semi-paludosas ou brejos, não raro ocorrendo em capoeiras ou matas de encostas e restingas. Essa espécie floresce nos meses de outubro, novembro e dezembro, sendo encontrada em frutificação nos meses de abril, junho e dezembro. Possui as sinonímias *Madia peruviana* C. DC. e *Madia peruviana* C. DC. (MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1995).

A química desta planta não foi completamente investigada. Estudos fitoquímicos indicaram a presença de hidrocarbonetos alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, neolignananas (MOREIRA et al., 2001; MARTINS et al., 2000; MOREIRA; KAPLAN; GUIMARÃES, 1995), fenilpropanóides e lignanas tetrahidrofurânicas (MARTINS et al., 2003; MARTINS et al., 2000).

O óleo essencial de *Madia peruviana* e seu constituinte majoritário sarisan, foram avaliados em ensaios no comportamento de camundongos, demonstrando terem efeitos estimulantes e depressores nos animais testados (MOREIRA et al., 2001). Martins et al. (2003) determinaram a atividade *in vitro* de lignanas tetrahidrofurânicas contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Há poucas pesquisas referentes a atividades biológicas

de \_\_\_\_\_, demonstrando uma evidente necessidade de mais estudos para avaliar resultados referentes às propriedades desta espécie.



8 11 15 29

C. DC. (Piperaceae)

Fonte: <http://www.geocities.com/davyson2000/fotos1.html>

## VlaD 0Q34512U5fg. 5j 0 15 21g 5U5 U5 6g1U15j 5U5 U5 6

Dentre as classes de substâncias presentes na família Piperaceae, encontram-se as lignanas e neolignanas. Genericamente designadas como lignóides, as lignanas e as neolignanas são bisarilpropanóides que apresentam grande diversidade estrutural e amplo espectro de atividades biológicas (OLIVEIRA; BRAGA, 2003; LEWIS et al., 1995). Estão presentes em muitas plantas e são muitas vezes consideradas responsáveis pelos efeitos biológicos de algumas espécies utilizadas para fins medicinais. Ocorrem em algas, fungos, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (monocotiledôneas e dicotiledôneas), observando-se uma maior complexidade estrutural em pteridófitas e angiospermas (OLIVEIRA; BRAGA, 2003; KATO, 1995).

A distribuição botânica de lignanas é ampla, tem se encontrado mais de 300 substâncias em aproximadamente 70 famílias. Entretanto, as neolignanas têm uma distribuição mais restrita, são encontradas principalmente nas famílias Myristicaceae, Lauraceae e Piperaceae (BRUNETON, 1991).

Dentre as várias atividades biológicas de lignanas e neolignanas, pode ser destacada a atividade leishmanicida de neolignanas isoladas de espécies de \_\_\_\_\_ (BARATA et al., 2000). Kraft et al. (2002) demonstraram a atividade antiplasmodial de sesquilignanas e

sesquinelignanas, isoladas de *Conium maculatum*, contra *Staphylococcus aureus*. Diversas pesquisas com substâncias lignóides isoladas de plantas têm comprovado propriedades antimicrobianas (RAHMAN; GRAY, 2002; BANG et al., 2000; ZACHINO et al., 1998; BARRERO; HAIDOUR; MUNOZ DORADO, 1994).

As neolignanas conocarpano, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 foram, pela primeira vez, isoladas de uma espécie da família Piperaceae em 1996 (MUNOZ DORADO et al., 1996), e apresentaram atividade inseticida (CHAURET et al., 1996). Posteriormente, outros pesquisadores demonstraram a atividade antifúngica (FREIXA et al., 2001) e antibacteriana dessas mesmas substâncias (PESSINI et al., 2003), porém isoladas de outras espécies do gênero *Piper* (respectivamente, *Piper nigrum* e *Piper longum*). De *Piper longum* L. extraiu-se a lignana cubelina, que é utilizada como antisséptico urinário (SIMÕES et al., 2000), e apresentou efeito anti-inflamatório (BASTOS; ALBUQUERQUE; SILVA, 1999). Neolignanas de *Conium maculatum* (MA; HAN; LIU, 1993; MA; HAN; WANG, 1993) e de *Piper longum* (MA et al., 1991) demonstraram significativa atividade antagonista do fator de ativação plaquetária (PAF), lignanas de *Conium maculatum* também exibiram atividade inibitória de PAF (CHEN; YU; XU, 1993).

**VIS 1602 191 6514 01 FFE 215 UOB FL5. 5Us**

Paralelamente ao desenvolvimento e a descoberta de novos fármacos antimicrobianos, foi observado um uso crescente destes agentes no tratamento de um número cada vez maior de infecções microbianas. Esta situação levou à necessidade de se utilizarem métodos para testar os agentes antimicrobianos *in vitro*, a fim de prever a sua atividade (MURRAY et al., 2000).

A atividade antimicrobiana é medida *in vitro* para determinar a potência do agente antimicrobiano em solução, e a concentração nos líquidos ou tecidos corporais conhecida do fármaco. A determinação dessas quantidades pode ser efetuada por dois métodos principais: diluição ou difusão. Ao utilizar um microrganismo padrão apropriado para teste e uma amostra conhecida do fármaco para comparação, esses métodos podem ser empregados para estimar a potência do antibiótico na amostra ou a sensibilidade do microrganismo (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Os testes de diluição permitem a obtenção de resultados quantitativos, indicando a concentração de determinado fármaco necessário para inibir (ou inviabilizar) os microrganismos testados. Os testes de difusão envolvem o cultivo de papel filtro contendo os antibióticos (DE SOUZA et al., 2003).

O método de diluição pode ser realizado em meios de cultura líquidos ou sólidos. Consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano, semeando frente a cada diluição o inóculo microbiano em número padronizado, e, após a incubação, verificar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu a multiplicação do microrganismo. Esta concentração é chamada inibitória mínima (CIM) (DE SOUZA et al., 2003).

As concentrações nas quais não existe multiplicação microbiana podem ser ressemeadas em meios isentos do antimicrobiano para determinar se houve nelas um efeito microbicida (falta de crescimento na subcultura) ou microbiostático (crescimento a partir das concentrações de antimicrobiano). (MORSE et al., 1999; BARON, FINEGOLD, 1990)

Entre os numerosos fatores que afetam a atividade antimicrobiana, é necessário considerar os seguintes aspectos: pH do meio, composição do meio, estabilidade do fármaco, tamanho do inóculo, tempo de incubação, e atividade metabólica dos microrganismos, uma vez que eles influenciam significativamente no resultado dos testes (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Os microrganismos diferem quanto ao grau de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Além do mais, a susceptibilidade de um organismo em particular para um

Resumo

Introdução

Objetivos

Métodos

Resultados

Conclusões

Palavras-chave

Antimicrobianos, susceptibilidade, diluição

Essa pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

leucócitos são eventos centrais na patogênese de muitas formas de inflamação (MAJNO; JORIS, 1996).

O processo inflamatório ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, inclusive no plasma, nas células circulantes, nos vasos sanguíneos e nos componentes extravasculares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo são: os mastócitos, que circundam intimamente os vasos sanguíneos; os fibroblastos do tecido conjuntivo; e macrófagos e linfócitos residentes ocasionais (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A resposta inflamatória é estreitamente entrelaçada com o processo de reparação, este por sua vez é um processo vital para o restabelecimento da integridade do tecido normal após um trauma tanto no tecido animal quanto vegetal. Nos animais, particularmente nos vertebrados superiores, o corpo é protegido das adversidades do meio ambiente pela pele. A pele é formada por duas camadas, a epiderme e a derme, com um complexo de nervos e suplementos sanguíneos, estas duas camadas protegem o corpo contra traumas mecânicos (GALLIN; SNYDERMAN, 1999).

Na pele, a resposta reparadora compreende uma série de eventos orquestrados envolvendo inflamação, reepitelização, formação de tecido de granulação e formação de cicatriz. Essa resposta inicia imediatamente após uma injúria com a deposição de coágulo de fibrina no local da lesão, prevenindo uma hemorragia pelos vasos lesados. Inúmeros mediadores químicos e células inflamatórias são ativados, indicando a iniciação da inflamação e orquestrando a resposta reparadora. Nas fases iniciais ocorre um influxo de neutrófilos, atingindo um pico nas primeiras 24 a 48 horas após o trauma, declinando em quantidade e promovendo o aparecimento de macrófagos que começam a migrar em grande quantidade sendo as células predominantes nas fases subseqüentes, são as células mais efetivas e eficientes na resposta reparadora. Durante esta fase, a reepitelização se inicia para restaurar a barreira funcional da pele, este processo ocorre rapidamente, em poucos dias após uma incisão, mas pode por semanas permanecer em áreas de grande trauma, em ferimentos crônicos como nas úlceras varicosas ou venosas, pode nunca ocorrer. As fases mais tardias da resposta inflamatória e a reepitelização compreendem um período de proliferação e diferenciação celular que é caracterizado pela migração de fibroblastos e células endoteliais formando neovasos e caracterizando a formação de tecido de granulação (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os macrófagos sintetizam metaloproteinases que participam no debridamento e remodelação da área lesada ou necrosada e na remoção do exsudato fibrinoso presente no local de injúria e providenciam uma contínua fonte de fatores de crescimento e citocinas que

estimulam a fibroplasia e a angiogênese (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Os fibroblastos passam a ser as células dominantes e a síntese e deposição de colágeno, predominam a formação de nova matriz extracelular (MEC), no início ocorre depósito de colágeno tipo III, que é substituído nas fases subseqüentes por colágeno tipo I. A medida que a deposição de colágeno definitivo do tipo I aumenta, diminui a neovascularização e o tecido de granulação dando lugar a um tecido cicatricial fibrosado definitivo. Durante esta fase, fibroblastos e macrófagos continuam a sintetizar metaloproteínases para a remodelação do processo que pode durar vários meses (RUBIN; FARBER, 2002). A resposta reparadora, de acordo com o tipo de ferimento, pode ser mais rápida ou mais longa.

Segundo Mackai e Miller (2003), o reparo da ferida deve ocorrer em um ambiente fisiológico conduzindo ao reparo do tecido e regeneração. Entretanto, vários fatores clinicamente significantes são conhecidos por impedir a cicatrização de feridas, incluindo hipóxia, infecção, tumores, distúrbios metabólicos tais como diabetes melito, a presença de debris e tecido necrótico, certos medicamentos, e uma dieta deficiente em proteínas, vitaminas e minerais.

A fase final da cicatrização da ferida é o remodelamento, incluindo uma reorganização de novas fibras colágenas, formando uma estrutura mais organizada que progressivamente continua a aumentar a resistência tênsil da ferida. O processo de remodelamento continua por mais de 2 anos, alcançando 40 a 70% da resistência do tecido não danificado em 4 semanas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

### Mag 160g 2 1g5 / F E 2 1g5 34g *temia salina*

A avaliação da bioatividade e toxicidade de substâncias orgânicas, sejam eles provenientes de plantas ou sintéticos, têm sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química, farmacologia ou microbiologia. Geralmente, a não ser que existam programas de colaboração, os laboratórios não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais ou tecidos e órgãos isolados. A necessidade de se realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos levou à busca de novos ensaios (CAVALCANTE et al. 2000).

O ensaio de toxicidade através do uso do microcrustáceo *temia salina* serve como biomonitoramento dos extratos de plantas (SIQUEIRA et al., 2001). É um método rápido, confiável e de baixo custo que pode ser empregado para a determinação de toxicidade (PAYROL et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2001).

O ensaio de letalidade de *Paramecium caudatum* foi proposto por Michael, Thompson e Abramovitz (1956), e mais tarde desenvolvido por Vanhaecke et al. (1981) e Sleet e Brendel (1983). Este teste é baseado na habilidade em matar os microcrustáceos de *Paramecium caudatum* cultivados em laboratórios. O ensaio é considerado uma ferramenta útil para a preliminar avaliação da toxicidade, e tem sido usado para detecção de toxinas fúngicas, toxicidade de extratos de plantas, metais pesados, toxinas de cianobacterias, pesticidas, e teste de citotoxicidade de materiais dentários (CARBALLO et al., 2002).

Muitos pesquisadores têm utilizado o ensaio de letalidade de *Paramecium caudatum* para avaliar a toxicidade de plantas e substâncias isoladas, já que é um bioensaio de fácil execução e pode ser realizado sem equipamentos especiais (ZUQUE et al., 2004; MOREIRA et al., 2003; MONTANHER; PIZZOLATTI; BRIGHENTE, 2002). É válido acrescentar que diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre esta espécie com outras atividades biológicas, como antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral e tripanocida (SAHPAZ et al., 1994).

**aj a rNPOaOogNj h p M o**

**aDp .s(U)μ5g25g3s(U)Lsjg.5gUF5**

A planta *C. D.C. var.* (Piperaceae), foi coletada em maio de 2001 no município de Ponta Grossa no estado do Paraná, e identificada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães, tendo uma exsicata depositada no Herbário do Museu Botânico do Rio de Janeiro (RB 368597).

**a0gaUj 016N5 %s3 F6**

As análises fitoquímicas foram realizadas no departamento de Química da UFSC (Florianópolis – SC), pela aluna de doutorado em química, Rosi Zanoni da Silva, sob orientação do professor Dr. Rosendo Augusto Yunes (DA SILVA, 2006).

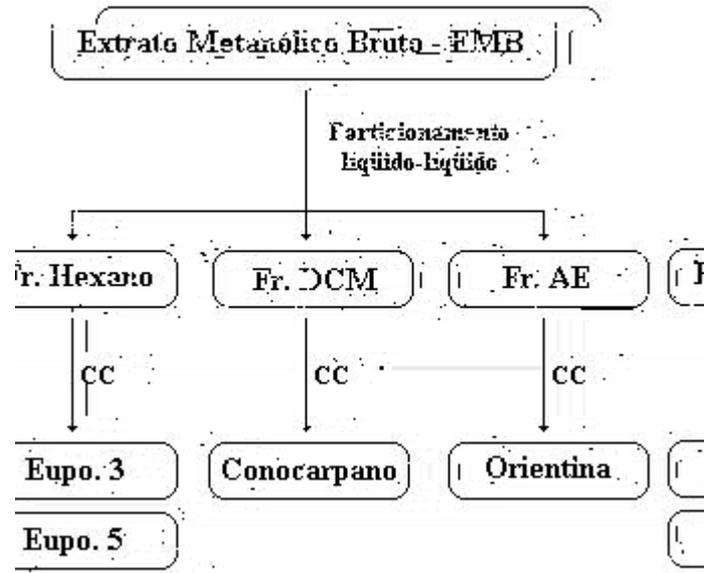
Após coleta, as folhas foram fragmentadas e maceradas em metanol à temperatura ambiente. Posteriormente o macerado foi filtrado e o solvente foi removido em evaporador rotativo, sob pressão reduzida e temperatura constante, para obtenção do extrato metanólico bruto (EMB). O EMB foi então suspenso em água e sucessivamente particionado com solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade: Hexano, Diclorometano e Acetato de Etila, obtendo-se as respectivas frações (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As substâncias purificadas foram obtidas a partir das frações, através de procedimentos cromatográficos usuais, como cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (Figura 2).

Para a identificação das substâncias isoladas foram feitas análises de pontos de fusão, espectroscopia de Infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e ressonância magnética nuclear de carbono (RMN <sup>13</sup>C), assim como comparação de dados obtidos, com os reportados na literatura.

Foram utilizados nos ensaios biológicos, o extrato metanólico bruto, as frações hexano, diclorometano e acetato de etila, e as substâncias conocarpano, conocarpano metilado, eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5. A substância conocarpano metilado foi obtida por modificação estrutural do conocarpano. A metodologia utilizada para obtenção dos componentes utilizados está descrita detalhadamente na tese de doutorado da aluna citada acima, com o título: Estudo fitoquímico e biológico da *C. DC. var.*

(Piperaceae) (DA SILVA, 2006).



### 8.1.5 Fluxograma da obtenção de extrato, frações e substâncias de

Fr. Hexano (Fração Hexano); Fr. DCM (Fração Diclorometano); Fr. AE (Fração Acetato de Etila); CC (Cromatografia em Coluna); Eupo. 3 (Eupomatenoide 3); Eupo. 5 (Eupomatenoide 5).

### 8.1.5.1 Fluxograma da obtenção de extrato, frações e substâncias de

Os microrganismos utilizados como cepas padrões para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana foram as bactérias Gram-positivas: (ATCC 14579), (ATCC 6538P), (ATCC 35552) e (ATCC 13813), e as bactérias Gram-negativas: (ATCC 35030), (ATCC 11775), (ATCC 27853) e sorovar Typhimurium (ATCC 14028). Os fungos leveduriformes utilizados foram: (ATCC 10231), (ATCC 7349) e (ATCC 32264), que foram fornecidos pela "Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello", Campinas, SP, e os fungos filamentosos: (ATCC 9170), (ATCC 26934), (ATCC 9092), sp. (CL 35), (C114), (C112), (C115), (ATCC9972) e (C137), que foram fornecidos pelo Centro de Referência Micológica (CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha, Rosario, Argentina.

alVdg s U s(U)μ5g256g3 FL5lbs U 3 56

As bactérias foram mantidas em ágar nutriente e conservadas sob refrigeração (4°C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, sendo repicadas em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis.

Os

Cada bactéria foi transferida do meio de manutenção para um tubo contendo caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI) (MERCK), sendo desta maneira mantida em estufa a 37 °C até que adquirisse uma turbidez satisfatória (período de aproximadamente 3 horas). Após este período, cada bactéria foi transferida do caldo BHI para o meio ágar Mueller-Hinton (MERCK) e incubada a 37°C por 18-24 horas, para a ativação da respectiva cultura.

Para o preparo do inóculo, foi selecionado de 4 a 5 colônias da bactéria ativada em ágar Mueller-Hinton e transferidas para tubo de ensaio com 5 mL de solução de NaCl 0,86% estéril, seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 520 nm, por comparação com a escala 0,5 de McFarland, obtendo-se o equivalente à concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células/mL (NCCLS 1993).

Para o método de diluição em ágar, foi inoculado em cada frasco (meio de cultivo), uma alça calibrada de 1  $\mu$ L ( $1-5 \times 10^5$  células/mL) (NCCLS 1993).

### **alaD 0g81 Ub56g r 12l LBL3 16**

As leveduras utilizadas para o preparo dos inóculos foram

e

Cada levedura foi cultivada em ágar Sabouraud dextrosado, pelo menos duas vezes, para assegurar viabilidade das culturas jovens de 24 e 48 horas a 37 °C.

Para o preparo do inóculo foram selecionadas 5 colônias da levedura, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, as quais foram suspensas em 5 mL de NaCl 0,85 % estéril e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada, por espectrofotometria a 520 nm para a obtenção de transmitância equivalente a 95%, obtendo-se uma concentração final entre  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Foi inoculado em cada frasco (meio de cultivo) uma alça calibrada de 1  $\mu$ L ( $1-5 \times 10^3$  células/mL), como descrito por Espinel-Ingroff e Pfaller (1995).

Para o preparo dos inóculos dos fungos filamentosos, foram utilizados os dermatófitos

e os fungos oportunistas  
e sp.

Os fungos foram mantidos em ágar Sabouraud à temperatura ambiente por 7 a 10 dias para obtenção de culturas jovens. Os respectivos inóculos foram preparados removendo-se os esporos de cada fungo a partir de cultura jovem, com auxílio de uma alça, transferidos para tubo com água estéril (10 mL), e homogeneizado em agitador de tubos. A suspensão conidial foi filtrada, com auxílio de uma gaze, para remoção das hifas. A resultante suspensão foi novamente homogeneizada e ajustada para  $1,4 \times 10^6$  células/mL pela adição de água, e utilizando um hemocitômetro para a determinação do número de células. Foi inoculado em cada frasco (meio), uma alçada calibrada de 10  $\mu$ L correspondendo a  $1-5 \times 10^4$  células, para cada microrganismo (LLOP et al., 2000).

alaD 1V81 Ub56gJF 3 1U8656

O método consistiu em se preparar diluições sucessivas da amostra a ser testada (extrato, fração ou substância), em meio de cultura sólido, semear a bactéria ou fungo em estudo, e após incubação, verificar a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo utilizado no ensaio.

Os valores da CIM foram determinados através da diluição dos componentes obtidos de

Após o período de incubação, foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima através da verificação visual do crescimento microbiano. Para interpretação dos resultados foi considerado CIM a inibição total do crescimento microbiano.

Durante os testes foram utilizados controles, com os meios de culturas e solvente utilizado na solubilização do extrato, frações e substâncias, a fim de verificar seu efeito sobre os microrganismos. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2%. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nos controles. Foram também utilizados como controle os antibacterianos Amoxiciclina (Sigma A-8523) e Vancomicina (Sigma V-2002), e o antifúngico Cetoconazol (Sigma K-1003). Os ensaios foram repetidos por quatro vezes.

**alaVg M(L3 B ) μ5g2s gS5U5IU(s) μ5g Js 5(LF B g sUBs g S JI "g1g81 Ub F B g  
3sUBs g S8d "**

Para determinar a concentração bactericida mínima ou fungicida mínima, foram selecionadas as culturas que apresentaram inibição do desenvolvimento bacteriano ou fúngico, no ensaio de CIM (item 4.4.2) e realizadas suas respectivas subculturas em meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e ágar Sabouraud dextrosado para os fungos leveduriformes, isento de extrato, fração ou substância, e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas para as bactérias e 24 a 48 horas para os fungos leveduriformes. Após a incubação as culturas foram inspecionadas para a verificação visual do crescimento microbiano.

Para a interpretação dos resultados foram considerados que a inibição no ensaio de CIM e crescimento do microrganismo na subcultura (CBM ou CFM) significa ação bacteriostática ou fugistática e a ausência de crescimento na subcultura significa ação bactericida ou fungicida (BARON; FINEGOLD, 1990).

**alalagJ B l s(bIs NF**

Para o direcionamento da pesquisa na localização dos componentes com potencial antimicrobiano da planta em estudo, foi realizado o ensaio da bioautografia (RAHALISON et al., 1994; HAMBURGER; CORDEL, 1987).

As amostras testes (extrato e frações) foram dissolvidas em acetona e aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) (Sílica Gel 60) e em seguida, as placas foram submetidas à eluição nos sistemas de solventes hexano e acetato de etila (85:15),

hexano e acetato de etila (9:1), clorofórmio, metanol e água (65:35:5) e, clorofórmio e metanol (9: 1). Após a eluição e eliminação dos resíduos de solventes, foi distribuída uma fina camada de meio de cultura contendo inóculo de (10<sup>6</sup>células/mL) sobre as placas de CCD e em seguida, estas foram incubadas a 37 °C por 18-24 horas.

Para facilitar a leitura dos resultados, após o período de incubação, foi borrifado nas placas, uma solução aquosa de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) (2,5 mg/mL) e estas novamente incubadas a 37 °C por mais 4 horas.

O critério empregado para a interpretação dos resultados da bioautografia, foi o aparecimento de zonas claras em torno da(s) substância(s) isolada(s) na CCD, indicando a respectiva atividade antimicrobiana (RAHALISON et al., 1994; HAMBURGER; CORDEL, 1987).

### 1.2.3. Avaliação da atividade antifúngica da substância conocarpano

A substância conocarpano isolada de foi avaliada para verificação da atividade em inibir a parede celular fúngica, através da observação de malformações das hifas no ensaio da .

No ensaio qualitativo da foi utilizado meio de cultura com a seguinte composição: 30 mL de meio contendo 0,5 % de protease peptona B (Britania B 02-0700), extrato de levedura (Britania B 01-006-05), 4,0 % sacarose (grau reagente) e 1,5 % ágar (Merck 1613). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min, e distribuído em placas de Petri (90 mm de diâmetro). Após resfriamento parcial (40 °C) do meio, foi semeado 30 µL do inóculo de esporos de e incubado a temperatura ambiente sob luz direta. Após a solidificação do meio, aplicou-se sobre este, discos de papel de 6,5 mm (Baxter F-2882-1). A substância conocarpano foi dissolvida em DMSO e , com auxílio de micropipeta (25µL/disco), colocada sobre os discos obtendo-se a concentração final de 30 µg/mL (concentração na qual é ativo contra a levedura ).

Para preparar o inóculo dos esporos de , o cultivo foi feito em meio contendo 0,25 % de protease peptona (p/p), 0,25 % de extrato de levedura (p/p) 1 % de sacarose (p/p) e 1,5% ágar (p/p) por 4-5 dias de incubação à temperatura ambiente e luz, produzindo uma coloração laranja no crescimento das hifas com esporos. O inoculo (1,4 x 10<sup>6</sup> células/mL) foi feito em tampão contendo 0,075 g/100mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (grau reagente) em solução de glicerol e água 15:85.

Os discos contendo somente DMSO como controle negativo também foram incluídos no ensaio, e 25 µL de cetoconazol (Sigma M-3512) também foi adicionado ao disco como

controle positivo de inibição, o qual deve produzir um halo claro (mas não inibe a parede celular fúngica).

é um fungo filamentosos que quando em presença de inibidores da parede celular fúngica e sob certas condições (37 °C e meio osmótico), cresce como protoplasma (sem parede celular) e que microscopicamente mostra malformações (hifas curtas e ramificadas) (SELITRENNIKOFF, 1992). Os halos de inibição foram examinados para verificar se havia má formação das hifas e se a aparência era de aspecto enevado ou manchado, seguindo-se a incubação das placas a temperatura ambiente por 24 horas sob luz direta.

algos) μ5gN 4s) μ5gN 3s) μ5gN 2s) μ5gN 1s) *Staphylococcus aureus*

Os ensaios foram realizados no biotério de pesquisa do curso de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, UNIVALI.

**algos) μ5gN 4s) μ5gN 3s) μ5gN 2s) μ5gN 1s)**

Foram utilizados 24 camundongos Swiss do sexo masculino com 2 meses de idade, que durante o experimento receberam água e ração à vontade e foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno forradas com serragem.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios para Pesquisas Biomédicas envolvendo animais (normas internacionais), que tem como objetivo evitar o uso excessivo ou inapropriado de animais de experimento, e incentivar os cuidados adequados antes, durante e após a experimentação. Todos os animais devem ser tratados adequadamente, evitando seu sofrimento ao máximo (GOLDIN, 1997). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI em 19/08/2004, com o seguinte n° de cadastro: 203/2004.

Os animais foram sacrificados com o auxílio de anestésico injetável (ketamina / xilazina) por perfusão sob anestesia, dentro das normas éticas, tentando minimizar seu sofrimento.



### análise L512 B 1U364s Is g5g160 25g3 5L5 1 15

A análise morfológica avaliou os seguintes parâmetros: a quantidade de tecido necrosado, a quantidade de fibroblastos, células mononucleares e vasos sanguíneos neoformados. Os períodos de avaliação foram de 3 e 7 dias após o início do experimento, e as lesões experimentais foram avaliadas em cada período. Os animais foram perfundidos com formol 10% e os locais das lesões foram retirados com uma tesoura cirúrgica, devidamente debridados e aparados foram fixados em solução de formol a 10% durante 24 horas, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Em micrótomo foram obtidos cortes seriados de 12  $\mu\text{m}$  de espessura que foram colocados em lâminas de vidro para microscopia submetidos a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), e cobertos com lamínula fixada com resina.

### análise s j f) $\mu\text{5g2s g\%s U3E 2 1g2 1g15 E5gU15L56s 25$

Pela coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) a quantidade de tecido necrosado foi avaliada com o auxílio de um retículo de 100 quadrantes acoplado ao microscópio óptico com aumento de 10 vezes. Foram escolhidos de forma aleatória 3 campos da lesão a serem examinados. A quantidade de área necrosada foi medida em porcentagem.

### análise y l s U3E ) $\mu\text{5g2 1gU1 1 1j56$

Pela coloração com Hematoxilina Eosina a quantidade de neutrófilos foi avaliada com o auxílio de um retículo de 100 quadrantes acoplado ao microscópio óptico no aumento de 40 vezes. Foram escolhidos 3 campos da lesão a serem examinados e o número total de células foi considerado o valor em estudo.

### análise y l s U3E ) $\mu\text{5g2 1g5j1 js 6g3 5U5U 5 1 L16$

Pela coloração com Hematoxilina Eosina a quantidade de células mononucleares foi avaliada com o auxílio de um retículo de 100 quadrantes acoplado ao microscópio óptico no aumento de 40 vezes. Foram escolhidos 3 campos da lesão a serem examinados e o número total de células mononucleares foi considerado o valor em estudo.

## Figura 15: UFNs (µg) / FL5 .js 606

Pela coloração de HE a quantidade de fibroblastos foi avaliada com auxílio de um retículo de 100 quadrantes acoplado ao microscópio ótico no aumento de 40 vezes. Foram escolhidos de forma aleatória 3 campos da lesão a serem examinados. A quantidade de células foi contada e o número total de fibroblastos foi considerado o valor em estudo.

## Figura 16: 25g2s g Ub fb U161

As lesões experimentais e controle foram submetidas a técnica para análise morfológica e coradas com HE. O número de vasos foi contado com o auxílio de um retículo de 100 quadrantes acoplado ao microscópio ótico no aumento de 40 vezes. Foram escolhidos de forma aleatória 3 campos da lesão a serem examinados e o número total de vasos foi considerado o valor em estudo.

## Figura 17: Uj Flg 60606

A média dos resultados obtidos nos animais de cada grupo nos tempos analisados foi representada graficamente.

Os resultados obtidos foram analisados usando-se variante (ANOVA) seguido por teste de múltipla comparação de Tukey – Kramer. Valores correspondendo a  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## Figura 18: U6 / F Es 2155 34g temia salina

O ensaio de toxicidade do extrato, das frações e das substâncias isoladas de foi realizado conforme o método descrito por Meyer et al. (1982) utilizando o microcrustáceo Leach.

Os componentes de foram dissolvidos em solução de DMSO e água marinha sintética (solução de cloreto de sódio 3,8%).

Ovos de , adquiridos comercialmente, foram colocados em um beaker contendo água marinha sintética com pH entre 8 e 9, e incubados em banho-maria entre 20°C a 25°C, por 48 horas para eclodirem. Após este período, em microplacas (2000 µL), foram preparadas diferentes concentrações do extrato, frações e substâncias, que variaram de 2 a

1000 µg/mL e a cada uma delas foram adicionados entre 6 e 12 larvas do microcrustáceo e novamente incubado em banho-maria (20 °C a 25 °C) por 24 horas.

Após este período, o número de microcrustáceos vivos e mortos em cada diluição (concentração) foi contado, com auxílio de um microscópio binocular E Lentz Wetzlar (10 vezes), obtendo-se os resultados. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle positivo, foi utilizado uma solução de dicromato de potássio nas concentrações de 400, 600 e 800 µg/mL e como controle negativo 2000 µL de água marinha. Foram acrescentados controles com o solvente utilizado para a dissolução das amostras (a concentração final de DMSO não ultrapassou 10 %).

A leitura do resultado foi validada somente quando nos controles positivos foi observado a morte de todos os indivíduos ( ) e no controle negativo a sobrevivência de todos os indivíduos.

Para o cálculo final da  $DL_{50}$  e seu respectivo intervalo de confiança de 95 % utilizou-se o método de Próbitos de análise. Os componentes foram considerados altamente tóxicos quando a  $DL_{50}$  foi menor que 80 µg/mL; entre 80 µg/mL e 250 µg/mL foram considerados moderadamente tóxicos; e com  $DL_{50}$  maior que 250 µg/mL, com baixa toxicidade ou não tóxicos (PARRA et al., 2001; DOLABELA, 1997).

## **SP NoB7 ra M og N do SB oo- p**

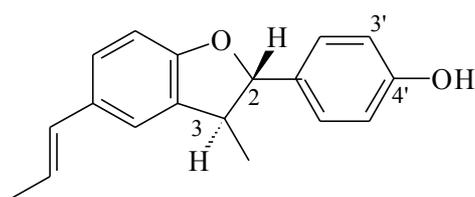
### **SP ga Uj 616 N 3 3 6**

A investigação fitoquímica de *Conocarpus* foi realizada pela aluna de doutorado Rosi Zanoni da Silva sob orientação do professor Dr. Rosendo Augusto Yunes, no departamento de química da UFSC (DA SILVA, 2006), e conduziu ao isolamento e identificação de 4 substâncias puras: eupomatenóide-3, eupomatenóide-5, conocarpano e orientina, além de uma substância derivada do conocarpano, o conocarpano metilado (Figura 3). A elucidação estrutural foi baseada em comparação com dados físicos e espectroscópicos reportados na literatura. As substâncias eupomatenóide-3 (MAXWELL et al., 1999), eupomatenóide-5 (FREIXA et al., 2001; MAXWELL et al., 1999; CHAURET et al., 1996) e conocarpano (FREIXA et al., 2001; BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999; MAXWELL et al., 1999; CHAURET et al., 1996) também têm sido encontrados em outras espécies de *Conocarpus*. Entretanto esse estudo é o primeiro a demonstrar a presença desses constituintes nesta espécie, além de ser o primeiro a demonstrar a presença do flavonóide orientina neste gênero.

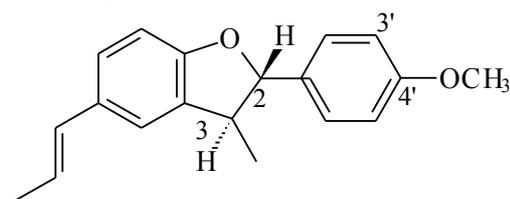
### **SP ga Uj 616 N 3 3 6**

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de diluição em ágar. Neste método, uma quantidade fixa de amostra a ser testada é dissolvida homogeneamente num meio. Utiliza-se diluições da amostra original, a cada uma das quais se inocula o microrganismo que se deseja testar. Através deste método, é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo. A leitura é feita após 18-24 horas de incubação, que toma em consideração o primeiro tubo em que não há mais crescimento observado a olho nu. Este teste também pode fornecer informações sobre a concentração microbicida mínima, a qual pode ser obtida através de subculturas dos meios que apresentaram inibição na determinação da CIM (DE SOUZA et al., 2003).

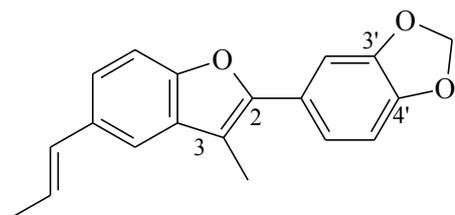
Conocarpano



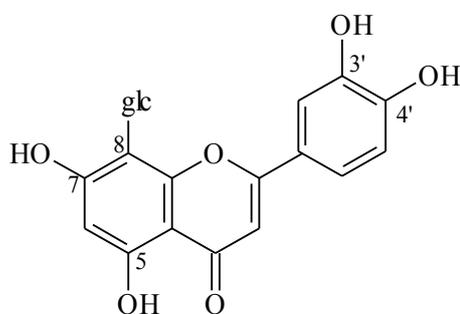
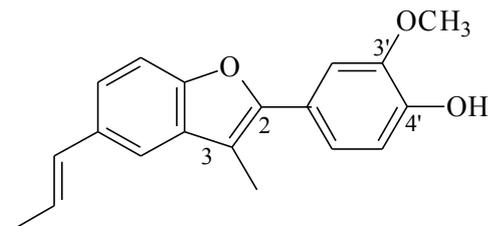
Conocarpano Metilado



Eupomatenóide-3



Eupomatenóide-5



## 8 ■ Is g VR

Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas de e o derivado conocarpano metilado.

Quando o EMB e as frações apresentaram CIM  $\leq 1000$   $\mu\text{g/mL}$ , e as substâncias puras apresentaram CIM  $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$ , foram considerados ativos. As tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos pelo método da diluição em ágar . O material inicial (EMB) inibiu o crescimento das cepas de , e com valores de CIM de 10, 10, 30 e 6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A atividade antimicrobiana também foi verificada para as frações hexano e diclorometano, entretanto a fração acetato de etila foi praticamente inativa contra os microrganismos testados, exceto para e com CIM de 800 e 300  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

A tabela 1 mostra os resultados da atividade bactericida dos componentes de

O extrato, frações e substâncias utilizadas neste teste foram aqueles que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de CIM. O critério empregado para interpretação dos resultados, foi o crescimento do microrganismo no meio de cultura que

significou ação bacteriostática, e ausência de crescimento que significou ação bactericida. O perfil de atividade antimicrobiana, em relação a CBM, foi em geral similar aos valores de CIM.

As substâncias conocarpano e eupomatenóide-5 foram os que apresentaram melhor atividade. As bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao conocarpano, o qual apresentou valores de CIM de 5 µg/mL contra *S. aureus*, 4 µg/mL contra *S. pneumoniae* e 7 µg/mL contra *S. enteritidis* e 4 µg/mL contra *S. typhimurium*. A substância eupomatenóide-5 mostrou valores de CIM de 2 µg/mL, 3 µg/mL e 6 µg/mL contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *S. enteritidis* respectivamente. As substâncias conocarpano e eupomatenóide-5 apresentaram excelente atividade contra bactérias Gram-positivas, como pode ser observado na tabela 1. O flavonóide orientina, obtido da fração acetato de etila, obteve os seguintes valores de CIM: 200 µg/mL contra *S. aureus*, 600 µg/mL contra *S. pneumoniae* e 1000 µg/mL contra *S. enteritidis*, entretanto, os valores de CBM foram elevados (>1000 µg/mL).

A atividade antimicrobiana em espécies da família Piperaceae tem sido associada à presença de amidas, óleos essenciais, lignanas, alcalóides, fenilpropanóides, neolignanas e cromeno (COSTANTIN et al., 2001; DORMAN; DEANS, 2000; BENEVIDES; SARTORELLI; KATO, 1999; MASUDA et al., 1991). As neolignanas presentes em *Piper nigrum* podem ser as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana desta planta, entretanto, as substâncias eupomatenóide-3 e conocarpano metilado não foram ativas contra os microrganismos testados.

Em outra pesquisa, a substância eupomatenóide-3 e três derivados metilados mostraram não ser ativos contra várias bactérias testadas. Essas substâncias não possuem uma hidroxila fenólica (PESSINI et al., 2003), sugerindo que a hidroxila fenólica presente nas estruturas ativas esteja relacionada a atividade antibacteriana. Nossos resultados também sugerem que a presença do grupo hidroxila na posição 4 da estrutura fenil-propenil-benzofurano é importante para a atividade antimicrobiana, pois quando este grupo está ausente, não foi observada atividade (eupomatenóide-3 e conocarpano metilado) (figura 3 e tabela 1).

As bactérias mais sensíveis aos componentes de *S. aureus* foram *S. aureus* e *S. pneumoniae*.

Não foi observada atividade contra bactérias Gram-negativas (tabela 2). Isso pode ser explicado porque a membrana externa da bactéria Gram-negativa é conhecida por se apresentar como uma barreira na penetração de numerosas moléculas, e o espaço periplasmático contém enzimas, as quais são capazes de inativar algumas substâncias com ação antimicrobiana (SCHAECHTER et al., 2002; DUFFY; POWER, 2001; POOLE, 1994). Além disso, muitos organismos Gram-negativos exibem alto nível de resistência intrínseca a

uma série de antimicrobianos, pois sustentam na membrana externa um mecanismo de efluxo ativo, o qual age como uma barreira para estes agentes (VAN BAMBEKE et al., 2003; KÖHLER; PECHÈRE; PLÉSIAT, 1999; HANCOCK; BELL, 1998; NIKAIDO, 1994, 1989).

Os componentes ativos de *S. aureus* podem ter propriedades que lhes possibilitem penetrar nas células e afetar alguma rota metabólica essencial dos microrganismos. Mais estudos com esta planta podem conduzir ao isolamento de outras substâncias ativas, assim como a síntese de outras mais ativas, através de modificações estruturais.

**Figura 10** Atividade antibacteriana (CIM e CBM) de extrato, frações e substâncias de *S. aureus*, frente a bactérias Gram-positivas

Substância	Atividade antibacteriana (CIM e CBM) frente a <i>S. aureus</i>							
	25		50		100		37	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
EMB	10	20	10	20	30	50	6	50
Fr. Hexano	20	30	20	30	100	>1000	10	80
Fr. DCM	20	20	9	10	30	60	6	20
Fr. AE	800	900	>1000	>1000	>1000	>1000	300	>1000
Eupo. 3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Eupo. 5	6	6	3	5	>1000	>1000	2	6
Conocarpano	5	6	4	6	7	10	4	8
Conocarpano M.	NR	NR	>1000	>1000	NR	NR	NR	NR
Orientina	>1000	>1000	200	>1000	600	>1000	1000	>1000
Vancomicina	0.7	NR	2	NR	2	NR	0.8	NR

Extrato metanólico bruto (EMB); Fração Hexano (Fr. Hexano); Fração diclorometano (Fr. DCM); Fração acetato de etila (Fr. AE); Eupomatenóide 3 (Eupo. 3); Eupomatenóide 5 (Eupo. 5); Conocarpano metilado (Conocarpano M.); Conocarpano (Conocarpano); Orientina (Orientina); Vancomicina (Vancomicina); Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Bactericida Mínima (CBM); Ensaio não realizado (NR).

Atividade antibacteriana (CIM) de extrato, frações e substâncias de , frente a bactérias Gram-negativas

Extrato / Fração / Substância	Fr. Hexano (Fr. Hexano)	Fr. DCM (Fr. DCM)	Fr. AE (Fr. AE)	Amoxicilina
EMB	>1000	>1000	>1000	>1000
Fr. Hexano	>1000	>1000	>1000	>1000
Fr. DCM	>1000	>1000	>1000	>1000
Fr. AE	>1000	>1000	>1000	>1000
Eupo. 3	>1000	>1000	>1000	>1000
Eupo. 5	>1000	>1000	>1000	>1000
Conocarpano	>1000	>1000	>1000	>1000
Orientina	>1000	>1000	>1000	>1000
Amoxicilina	6	1	>1000	>1000

Extrato metanólico bruto (EMB); Fração Hexano (Fr. Hexano); Fração diclorometano (Fr. DCM); Fração acetato de etila (Fr. AE); Eupomatenóide 3 (Eupo. 3); Eupomatenóide 5 (Eupo. 5); Typhimurium ( ); Concentração Inibitória Mínima (CIM).

### Bioautografia

A bioautografia é um método útil para a localização de substâncias com ação antimicrobiana em um cromatograma de um extrato ou fração complexa de produtos naturais. Isto permite o isolamento biodirecionado de substâncias ativas. Na técnica bioautográfica, um meio de cultura sólido fundido inoculado é aplicado sobre a placa cromatográfica, na qual foi eluído o extrato ou fração. Durante a incubação da placa, as substâncias deverão ultrapassar o meio por difusão, formando zonas de inibição do crescimento microbiano (DE SOUZA et al., 2003).

O ensaio bioautográfico foi realizado com a bactéria , a qual mostrou boa sensibilidade aos componentes de . O critério empregado para interpretação dos resultados da bioautografia, foi o aparecimento de zonas claras em torno das substâncias isoladas na CCD, indicando a respectiva atividade antimicrobiana (RAHALISON et al., 1994).

No ensaio bioautográfico, foram testados diversos sistemas de solventes para a obtenção de cromatogramas com resolução suficiente para a realização do ensaio. Os sistemas

de solventes que apresentaram as melhores resoluções nos cromatogramas foram utilizados no ensaio, sendo: Hexano: Acetato de Etila (85:15) e Clorofórmio: Metanol (9:1).

Este trabalho revelou que o EMB de *U. officinalis* exibe significativa atividade antimicrobiana. Em análise preliminar, foi verificado que o extrato da planta foi ativo contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* através da observação de zonas de inibição, especialmente nas zonas do cromatograma correspondentes a constituintes químicos apolares, e as quais deram reações positivas para as neolignananas (dados não mostrados).

Foram encontradas três diferentes zonas de inibição no ensaio bioautográfico. Uma delas corresponde ao conocarpano, a outra é devido ao eupomatenóide-5, e a terceira zona de inibição é de uma substância ainda não identificada. Além disso, foi possível observar que as substâncias ativas estão presentes no extrato bruto e nas frações diclorometano e hexano.

## **Slagash 21g U. officinalis**

O extrato bruto, frações e substâncias isoladas de *U. officinalis* foram avaliados contra vários fungos oportunistas patogênicos, através do método da diluição em ágar, e os resultados estão reportados nas tabelas 3, 4 e 5. Valores de CIM  $\leq 1000$   $\mu\text{g/mL}$  para extrato e frações, e  $\leq 250$   $\mu\text{g/mL}$  para substâncias puras foram os critérios utilizados para considerar a atividade antifúngica.

Os resultados mostraram que o EMB exibiu pronunciada atividade antifúngica contra todos os dermatófitos testados, com valores de CIM de 20  $\mu\text{g/mL}$  para *T. tonsurans* e 60  $\mu\text{g/mL}$  para *M. canis*. Embora todas as frações apresentarem interessante atividade contra dermatófitos, a fração diclorometano mostrou a melhor atividade com CIMs entre 5 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , similar ao cetoconazol, que é um antifúngico muito empregado na clínica. Entretanto, o material de partida (EMB) e todas as frações não exerceram efeito inibitório contra os hialohifomicetos do gênero *A. nidulans* e foram pouco ativos contra o zigomiceto *Z. ramibii* e as leveduras *C. guilliermondii* e *S. cerevisiae*.

As substâncias eupomatenóide-5, conocarpano e orientina exibiram pronunciada atividade contra todos os dermatófitos testados (CIM  $\leq 9$   $\mu\text{g/mL}$ ), com atividade superior ao fármaco antifúngico padrão (cetoconazol), como pode ser observado na tabela 5. Além disso, essas substâncias também mostraram atividade contra *A. nidulans*, e o conocarpano ainda exibiu atividade contra *C. guilliermondii* e *S. cerevisiae*. Em contraste, a substância eupomatenóide-5 mostrou a menor atividade antifúngica contra todos os microrganismos testados. Este estudo é o primeiro a demonstrar atividade antifúngica para o flavonóide orientina.

Em um prévio trabalho Freixa et al. (2001) mostraram que eupomatenóide-6 e conocarpano exerceram considerável atividade contra alguns dermatófitos e leveduras. Eles sugerem que a ausência do grupo metóxi na posição 3 da estrutura fenil-propenil-benzofurano mostra um importante papel na atividade antimicrobiana, e a saturação de 2-3 influencia na seletividade da atividade.

Recentemente, Pessini et al. (2005), demonstraram que conocarpano apresentou atividade contra diferentes espécies de *Aspergillus* sugerindo também que a ausência da dupla ligação no carbono 2 do conocarpano, possa estar relacionada à atividade antifúngica.

Entretanto, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a presença do grupo hidroxila na posição 4' da estrutura fenil-propenil-benzofurano mostra ser importante na atividade antimicrobiana, pois quando este grupo está ausente não foi observada atividade, como na substância eupomatenóide-3 (tabelas 3, 4 e 5).

Os efeitos inibitórios mais potentes foram observados com conocarpano, o qual mostrou CIMs  $\leq 6 \mu\text{g/mL}$  contra dermatófitos, sendo o única substância hábil a inibir membros dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*.

Infecções micóticas são provavelmente as mais comuns e freqüentes infecções superficiais no Brasil. Sabe-se que medicamentos usados contra dermatofitoses exibem vários efeitos adversos e apresentam eficácia limitada (CARAZO; LOSADA; SANJUAN, 1999; GUPTA et al., 1998), e há uma real necessidade para a descoberta de novas moléculas com propriedades antifúngicas para tratar micoses superficiais.

A particular atividade antifúngica de eupomatenóide-5, das neolignan *eupomatenóide-5* e conocarpano e do flavonóide orientina, contra dermatófitos abre espaço para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, os quais auxiliem no tratamento de obstinadas infecções fúngicas superficiais.

**Fig. 25** Atividade antifúngica (CIM e CFM) de extrato, frações e substâncias de frente a fungos leveduriformes

d s s L s f j s g g 25	a s f s 2 s U s U s b s g b 37 "				
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM
EMB	800	>1000	>1000	>1000	700
Fr. Hexano	900	>1000	>1000	>1000	600
Fr. DCM	800	>1000	>1000	>1000	400
Fr. AE	>1000	>1000	>1000	>1000	700
Eupo. 3	>1000	>1000	>1000	>1000	1000
Eupo. 5	>1000	>1000	>1000	>1000	70
Conocarpano	30	30	30	30	60
Orientina	>1000	>1000	>1000	>1000	90
Cetoconazol	0,3	NR	3	NR	5

Extrato metanólico bruto (EMB); Fração Hexano (Fr. Hexano); Fração diclorometano (Fr. DCM); Fração acetato de etila (Fr. AE); Eupomatenóide 3 (Eupo. 3); Eupomatenóide 5 (Eupo. 5); ( ); ( ); ( ); Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); Ensaio não realizado (NR).

**Fig. 26** Atividade antifúngica (CIM) de extrato, frações e substâncias de frente a fungos filamentosos

d s s L s f j s g g 25	a s f s 2 s U s U s b s g b 37 "			
	CIM	CIM	CIM	CIM
EMB	>1000	>1000	>1000	900
Fr. Hexano	>1000	>1000	>1000	1000
Fr. DCM	>1000	>1000	>1000	900
Fr. AE	>1000	>1000	>1000	1000
Eupo. 3	>1000	>1000	>1000	900
Eupo. 5	>1000	>1000	>1000	900
Conocarpano	500	800	900	900
Orientina	>1000	>1000	>1000	>1000
Cetoconazol	7	8	4	50

Extrato metanólico bruto (EMB); Fração Hexano (Fr. Hexano); Fração diclorometano (Fr. DCM); Fração acetato de etila (Fr. AE); Eupomatenóide 3 (Eupo. 3); Eupomatenóide 5 (Eupo. 5); ( ); ( ); ( ); Concentração Inibitória Mínima (CIM).

**Atividade antifúngica (CIM) de extrato, frações e substâncias de frente a fungos filamentosos dermatófitos**

	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM
EMB	20	20	20	60	20
Fr. Hexano	40	100	60	80	20
Fr. DCM	5	20	7	30	7
Fr. AE	40	500	500	500	300
Eupo. 3	800	>1000	800	200	500
Eupo. 5	6	8	7	5	5
Conocarpano	3	6	5	4	0,9
Orientina	7	9	8	8	9
Cetoconazol	8	36	8	3	NR

Extrato metanólico bruto (EMB); Fração Hexano (Fr. Hexano); Fração diclorometano (Fr. DCM); Fração acetato de etila (Fr. AE); Eupomatenóide 3 (Eupo. 3); Eupomatenóide 5 (Eupo. 5);  
 ( );  
 ( );  
 ( );  
 ( ); Concentração Inibitória Mínima (CIM); Ensaio não realizado (NR).

**Atividade antifúngica (CIM) de extrato, frações e substâncias de frente a fungos filamentosos dermatófitos**

É de suma importância para um agente antimicrobiano que seja potente na sua atividade, mas que não seja tóxico para o hospedeiro. Devido a composição da célula fúngica ser muito semelhante a célula do hospedeiro, a maioria dos agentes antifúngicos utilizados atualmente são tóxicos também para o homem. Para a utilização terapêutica dos agentes antifúngicos é necessário o estudo do seu mecanismo de ação, a fim de encontrar fármacos que sejam seletivamente tóxicos para os microrganismos (ZACCHINO et al., 1998).

O ensaio da *halo* permite avaliar macroscopicamente inibidores da parede celular fúngica. A parede é uma estrutura que somente está presente na célula fúngica. Um agente antifúngico ideal é aquele que atua somente na célula fúngica, ou que seja seletivo e menos tóxico para a célula hospedeira.

Foi avaliado o mecanismo de ação antifúngico da substância conocarpano através do ensaio de *halo*.

Tanto a substância conocarpano como o cetoconazol inibiram o fungo demonstrado pelo halo claro. Embora tenham inibido o fungo, não foram observadas malformações das hifas, indicando que esta substância provavelmente não atua inibindo a

parede celular.

### Staphylococcus aureus

Os resultados de atividade antimicrobiana dos componentes de (EMB, frações e substâncias) induziram a realização de ensaio .

O estudo morfológico da influência do extrato metanólico bruto de , na resposta reparadora e antimicrobiana cutânea em camundongos, avaliou a quantidade de tecido necrosado, células polimorfonucleares (neutrófilos), células mononucleares (macrófagos), fibroblastos e vasos sanguíneos neoformados. Os dados obtidos foram determinados com o auxílio de um retículo de 100 quadrantes, e os resultados foram representados graficamente e através de fotomicrografias (em anexo). O período estabelecido para a avaliação foi de 3 e 7 dias, pois durante este período concentram-se grande parte dos eventos do processo de reparação estudados neste trabalho (BRASILEIRO FILHO, 2004). A distribuição dos animais em quatro grupos permitiu analisar comparativamente cada grupo, os quais foram estabelecidos como grupo 1 controle não infectado (G1), grupo 2 controle infectado (G2), grupo 3 infectado e tratado a partir do primeiro dia de experimento (G3), e grupo 4 infectado e tratado a partir do segundo dia (G4). As amostras retiradas dos quatro grupos foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), tendo em vista ser este tipo de coloração uma das mais comumente utilizadas para visualizar cortes histológicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A área de necrose está expressa em porcentagem na figura 4, e a análise estatística mostrada na tabela 6. Considerou-se como área de necrose as áreas de exsudato, crosta ou coágulos existentes. O grupo controle não infectado (G1) apresentou porcentagem de área de necrose de 71 % no terceiro dia, e 55 % no sétimo dia. Já o grupo que recebeu a inoculação de (G2) apresentou valores de necrose superiores ao grupo não infectado. Estes dados mostram que a presença de bactéria induziu aumento significativo na área de necrose, tanto no período inicial (3° dia), como no tardio (7° dia).

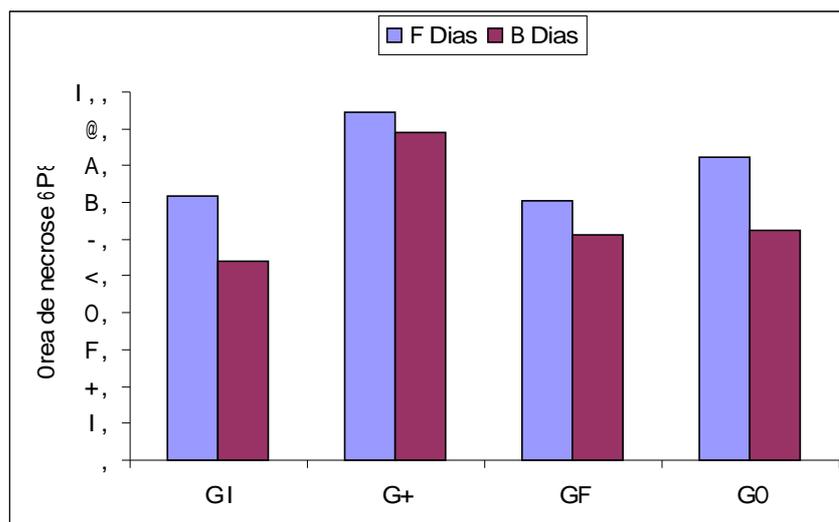
Quando o tratamento foi iniciado no primeiro dia de inoculação (G3), a área necrosada foi significativamente reduzida, tanto no terceiro como no sétimo dia. Porém, quando o tratamento foi iniciado no segundo dia após a inoculação da bactéria (G4), observou-se diferença significativa apenas no sétimo dia da reação, sendo que no terceiro dia a área necrosada foi semelhante ao grupo não tratado (G2). Estes resultados mostram a eficiência do tratamento com o extrato de em reduzir a área necrosada, e que quanto mais cedo o tratamento for iniciado mais eficiente é este. Cabe salientar que quando o tratamento

foi iniciado no primeiro dia, os valores de necrose no terceiro dia foram semelhantes aos valores do grupo que não recebeu bactéria (G1). O mesmo aconteceu no sétimo dia quando o tratamento foi iniciado no segundo dia após a inoculação da bactéria.

A ação do extrato de *Propolis*, provavelmente, foi direta destruindo a bactéria (bactéria formadora de pus - piogênica), visto que este extrato apresenta CIM de 10 µg/mL (tabela 1). De qualquer forma, não se pode descartar a ação do extrato sobre o hospedeiro, no processo de cicatrização, pois ainda não existem estudos a respeito de sua possível atividade cicatrizante e / ou antiinflamatória.

A área de necrose é resultante da degradação tecidual por enzimas neutrofílicas, esta área pode aumentar de tamanho na medida em que as bactérias conseguem sobreviver e proliferar (STEVENS; LOWE, 1998).

Os tecidos desvitalizados ou necróticos fornecem nutrientes para multiplicação bacteriana, favorecendo a instalação da infecção e retardo da cicatrização. O edema é outro fator que dificulta a cicatrização, pelo excesso de líquido intersticial interferindo na proliferação celular e na síntese protéica, bem como, na manutenção de baixo pH, na alta tensão de CO<sub>2</sub> e na baixa concentração de O<sub>2</sub>, favorecendo a necrose e a multiplicação microbiana. A hipóxia dificulta a destruição dos microrganismos pelos leucócitos que são dependentes do oxigênio para exercer esta função, particularmente nas feridas infectadas por sorovar *Thyphimurium* bem como, as contaminadas por anaeróbios (MORISON et al., 1997).



**8** **Figura 8** Avaliação da porcentagem da área de necrose dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento. G1 indica grupo controle não infectado; G2 indica grupo controle infectado com *S. aureus*; G3 indica grupo infectado e tratado a partir do 1° dia de experimento; G4 indica grupo infectado e tratado a partir do 2° dia de experimento.

Fig. 5 – Análise estatística da área de necrose pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

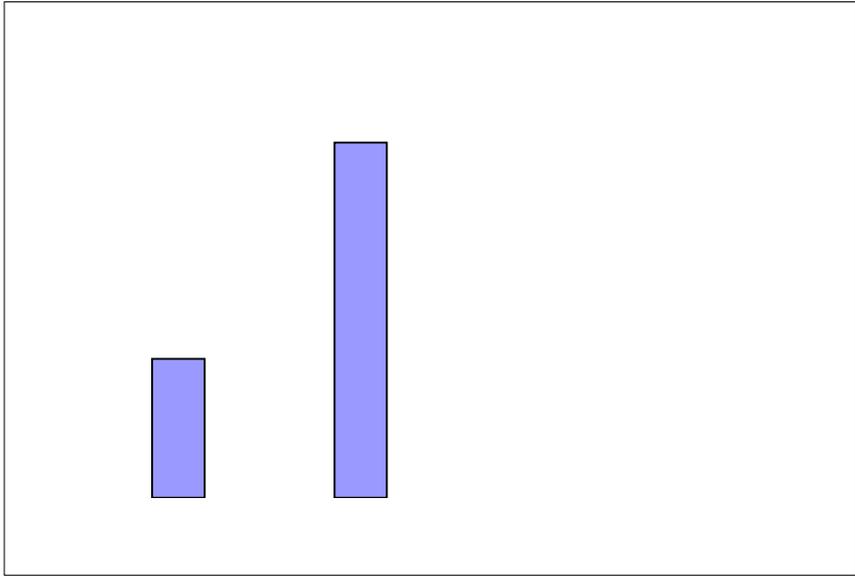
e II 45g	x Ls g2 lgU15L56 lg ..	
	3 dias	7 dias
G1	71,1 A b	53,8 B b
G2	94,7 A a	89,2 A a
G3	70,3 A b	61,1 A b
G4	82,2 A a	62,4 B b

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na seqüência foi avaliado o infiltrado de neutrófilos na área lesada. A figura 5 e a tabela 7 demonstram que o número de neutrófilos do grupo controle não infectado (G1), tanto no 3º dia quanto no 7º dia, foi significativamente menor que o dos grupos infectados (G2, G3 e G4). O grupo controle infectado (G2) teve a quantidade de neutrófilos significativamente maior que a de todos os grupos (G1, G3 e G4). Não houve diferença significativa entre os grupos infectados e tratados (G3 e G4), embora o grupo infectado e tratado a partir do 2º dia de experimento (G4) tenha maior número de neutrófilos que o grupo infectado e tratado logo após inoculação (G3). Nos grupos G1, G3 e G4 houve diminuição significativa do número de neutrófilos do início para o final do experimento, em contrapartida, para o grupo controle infectado (G2), no 7º dia permaneceu elevado o número de neutrófilos.

Os neutrófilos polimorfonucleares contém uma grande quantidade de grânulos citoplasmáticos lisossomais ricos em enzimas proteolíticas, capazes de degradar células e produtos da matriz extracelular. Os neutrófilos também são dotados de um grande potencial fagocítico e podem ingerir ativamente os patógenos (RUBIN; FARBER, 2002).

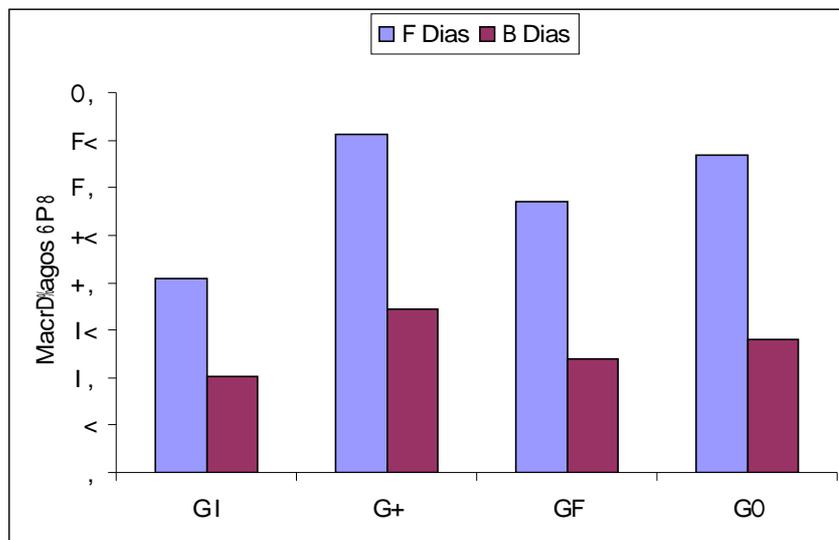
Um número extremamente grande de neutrófilos é atraído para as áreas de dano tecidual provocado por invasão bacteriana porque muitos produtos bacterianos são quimiotrópicos potentes para estas células. Esta emigração em larga escala é particularmente benéfica porque os neutrófilos não apenas degradam e erradicam o tecido danificado, mas também fagocitam e destróem as bactérias invasoras (RUBIN; FARBER, 2002; STEVENS; LOWE, 1998). Porém, os mecanismos utilizados pelos leucócitos para destruir as bactérias podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual através da liberação de enzimas lisossomais, mediadores químicos e radicais tóxicos do oxigênio (KUMAR; COTRAN; ROBBINS, 1994).



A figura 6 e a tabela 8 mostram os resultados do número de macrófagos. O grupo controle não infectado (G1), após 3 dias da indução das lesões demonstrou menores índices na porcentagem de macrófagos quando comparados com os outros grupos (G2, G3 e G4). Os grupos infectados (G2, G3 e G4) não tiveram diferenças significativas entre si no primeiro dia de análise, entretanto, o grupo controle infectado (G2), que não foi tratado, teve o número de macrófagos maior que os grupos infectados e tratados (G3 e G4).

No estágio final do experimento (7º dia), o grupo controle não infectado (G1) permaneceu com a menor quantidade de células em relação aos outros grupos, porém não houve diferença significativa entre os grupos. A quantidade de macrófagos de todos os grupos decresceu significativamente do 3º para o 7º dia de análise.

Os grupos infectados que receberam tratamento (G3 e G4) tiveram um maior índice de células na fase inicial do experimento (3º dia), tanto polimorfonucleares (neutrófilos) quanto mononucleares (macrófagos), quando comparados com o grupo controle não infectado (G1), sugerindo uma atividade pró inflamatória do extrato de *...*, caracterizada pelo aumento da quimiotaxia de leucócitos.



**Fig. 8** Avaliação da porcentagem de macrófagos dos quatro grupos experimentais no 3º e 7º dias de experimento. G1 indica grupo controle não infectado; G2 indica grupo controle infectado com *...*; G3 indica grupo infectado e tratado a partir do 1º dia de experimento; G4 indica grupo infectado e tratado a partir do 2º dia de experimento.

Fig. 8 - Análise estatística do número de macrófagos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

e II 45g	d s 5L 56g "	
	3 dias	7 dias
G1	20,4 A b	10,1 B a
G2	35,6 A a	17,3 B a
G3	28,5 A a	11,9 B a
G4	33,4 A a	13,9 B a

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A figura 7 e a tabela 9 expressam o resultado da quantificação de fibroblastos. Na fase inicial do experimento (3º dia), o número de fibroblastos do grupo controle infectado (G2) foi significativamente menor, quando comparado com os outros grupos (G1, G3 e G4). Após 7 dias, o grupo 2 continuou com o número de fibroblastos menor que o dos outros grupos, demonstrando um acentuado atraso para o recrutamento dessas células. Os grupos infectados e tratados (G3 e G4) não diferiram significativamente nesta etapa, e obtiveram maior número de fibroblastos que os grupos controles, tanto o controle não infectado (G1), quanto o infectado (G2). A persistência do acúmulo de fibroblastos na fase final pode indicar retardo no processo de cicatrização. O menor recrutamento dessas células, pelo grupo controle não infectado (G1), pode ser devido ao processo traumático menos intenso em relação aos grupos infectados e tratados (G3 e G4).

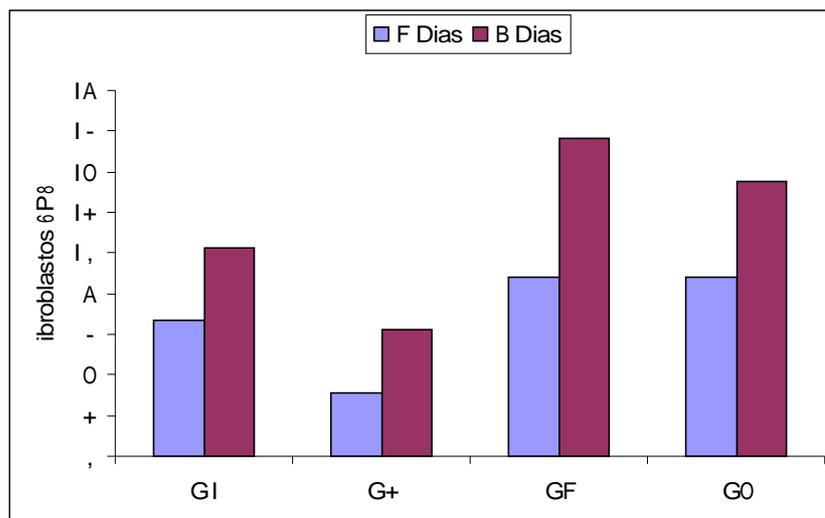


Fig. 8 - Avaliação da porcentagem de fibroblastos dos quatro grupos experimentais no 3º e 7º dias de experimento. G1 indica grupo controle não infectado; G2 indica grupo controle infectado com ; G3 indica grupo infectado e tratado a partir do 1º dia de experimento; G4 indica grupo infectado e tratado a partir do 2º dia de experimento.

Fig. 10 - Análise estatística do número de fibroblastos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

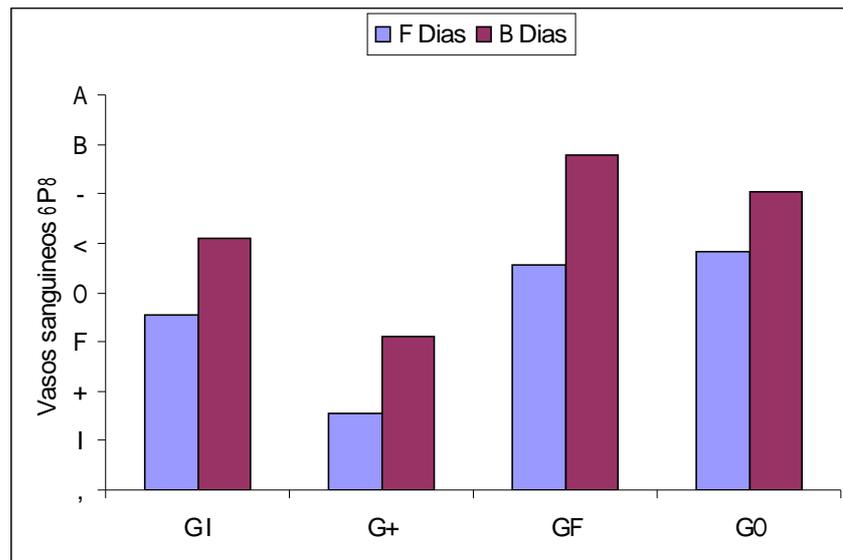
e II 45g	8 FL5.js 606g ..	
	3 dias	7 dias
G1	6,7 B a	10,3 A b
G2	3,1 A b	6,2 A c
G3	8,8 B a	15,6 A a
G4	8,8 B a	13,6 A a

5 dias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O número de novos vasos sanguíneos está expresso na figura 8 e tabela 10. A quantidade de vasos sanguíneos neoformados nos grupos G1, G3 e G4 não diferiu significativamente, tanto no 3º dia como no 7º dia da análise. Nos 2 períodos analisados, a síntese de vasos sanguíneos do grupo controle infectado (G2) foi significativamente menor que os outros grupos, demonstrando retardo na produção do tecido de granulação na fase de reparo. A máxima angiogênese foi observada após 7 dias do início do experimento, entretanto os grupos G1, G2 e G4 não apresentaram diferença significativa do 3º para o 7º dia, somente o grupo G3 teve o número de vasos significativamente maior em 7 dias do que em 3 dias.

Os fibroblastos e os vasos sanguíneos formados são componentes essenciais do tecido de granulação no espaço do ferimento. O tecido de granulação é um leito denso de macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, suportados por uma matriz de fibronectina, colágeno, além de ácido hialurônico (GUIDUGLI-NETO, 1992).

Na lesão em processo de cura, fibroblastos são recrutados das margens da lesão e induzidos a sintetizar colágeno, num processo seletivo conhecido como fibroplasia. Ocorre neovascularização concorrentemente com fibroplasia, de modo que novos capilares brotam dos tecidos viáveis na borda da ferida, migrando até o espaço da ferida. A contração da ferida faz com que suas margens se aproximem mais e, se o tecido original estava revestido por uma superfície epitelial, a reepitelização começa a cobri-la (MACKAY; MILLER, 2003).



**Fig. 8** – Avaliação da porcentagem de vasos sanguíneos dos quatro grupos experimentais no 3° e 7° dias de experimento. G1 indica grupo controle não infectado; G2 indica grupo controle infectado com *S. aureus*; G3 indica grupo infectado e tratado a partir do 1° dia de experimento; G4 indica grupo infectado e tratado a partir do 2° dia de experimento.

**Fig. 9** – Análise estatística do número de vasos sanguíneos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

e 1145g	c s 656g s Ub sU156g ..	
	3 dias	7 dias
G1	3,6 A a	5,1 A a
G2	1,6 A b	3,1 A b
G3	4,6 B a	6,8 A a
G4	4,8 A a	6,1 A a

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os fibroblastos e os vasos neoformados também são essenciais para o processo de reparo da lesão. Os fibroblastos dão início à formação do colágeno, que é o principal componente estrutural da cicatriz. A neovascularização é essencial porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (KANZAKI et al., 1998).

Kumar; Cotran e Robbins (1994) ressaltaram que a infecção representa a causa mais importante de retardo na cicatrização, uma vez que estimula os leucócitos a liberar lisozimas. Vale explicar que estas enzimas destroem o colágeno existente. Ainda, acresce-se o fato de que os microrganismos invasores captam o oxigênio e nutrientes necessários à cicatrização, podendo estender a infecção aos tecidos adjacentes, à corrente sanguínea podendo desencadear a septicemia e até a morte caso não tratada.

Os resultados morfológicos deste estudo indicam que a infecção dos tecidos causa aumento do dano, promovendo uma resposta inflamatória exacerbada, e que a cicatrização pode ser facilitada pela remoção dos tecidos mortos com aposição de tecidos saudáveis, e a administração de antimicrobianos adequados para cessar a infecção (STEVENS; LOWE, 1998). O extrato bruto de *Styrodia* demonstrou ser um agente com potencial antimicrobiano, caracterizado por menor área de necrose, e maior velocidade de formação de tecido de granulação, quando comparado com o grupo controle infectado (G2).

Deve ser ressaltado que a compreensão do mecanismo da atividade dos agentes antimicrobianos é muito mais complexo do que a atividade de fármacos, envolvendo não apenas o fármaco e o parasita, mas também um terceiro fator, o hospedeiro (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

### Styrodia 161g 21g / F Es 2155 34gemia salina

O potencial de toxicidade do extrato metanólico bruto, frações e substâncias isoladas de *Styrodia* foi determinado através do ensaio com *Styrodia*. Este ensaio é considerado uma ferramenta muito útil para avaliação preliminar da toxicidade (CARBALLO et al., 2002).

Há uma real necessidade para confiáveis bioensaios gerais, os quais possam detectar um amplo espectro de atividades farmacológicas em plantas e, ainda, possam ser empregados para produtos químicos naturais, que sejam rápidos, fáceis e de baixo custo, para guiar o fracionamento e triagem fitoquímica. O ensaio de *Styrodia* preenche todos esses requisitos (MEYER et al., 1982).

Para avaliar a toxicidade foi utilizado o parâmetro de DL<sub>50</sub>, o qual foi determinado pela análise de Próbios, e definido como a concentração necessária para causar a morte de metade das larvas de *Styrodia*, no período de 24 horas.

Levando-se em consideração os critérios utilizados para a classificação de toxicidade dos componentes de *Styrodia*, os resultados (tabela 11) demonstram que o EMB e a fração hexano apresentaram moderada toxicidade (DL<sub>50</sub> 89,9 e 87,8 µg/mL, respectivamente), e a fração acetato de etila apresentou atividade citotóxica fraca (DL<sub>50</sub> 877,6 µg/mL). A fração diclorometano e a substância isolada desta fração (conocarpano), demonstraram ser os componentes testados mais tóxicos (DL<sub>50</sub> 2,9 µg/mL).

A substância conocarpano, da mesma forma que apresentou grande potencial antimicrobiano, também apresentou elevado grau de toxicidade. A toxicidade para *Styrodia* tem sido associada com atividades antibacteriana, antifúngica, parasiticida, tripanocida,

viruscida, entre outras (ALTOMARE et al., 2004; HASSAN et al., 2004; MOREIRA et al., 2003; KANEGUSUKU et al., 2002; TASKOVA et al., 2002; PAYROL et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2001; ALVES et al., 2000; SIQUEIRA et al., 1998; ZANI et al., 1995; SOLIS et al., 1993).

A toxicidade para o crustáceo ( ) também apresenta boa correlação com atividade antitumoral (McLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998). Este ensaio tem sido relatado como um ensaio preliminar para a identificação de substâncias citotóxicas (ALTOMARE et al., 2004). De acordo com McLaughlin (1991), substâncias com  $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  são consideradas potencialmente tóxicas contra células tumorais, e devem ser avaliados em testes antitumorais mais específicos. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, a substância conocarpano poderia ser avaliada para este uso, pois a sua toxicidade sobre é semelhante a podofilotoxina ( $2,4 \mu\text{g/mL}$ ), um potente agente citotóxico (ABOURRICHE et al., 2003).

As substâncias eupomatenóide-5, eupomatenóide-3, conocarpano metilado e orientina não apresentaram toxicidade até a concentração de  $1000 \mu\text{g/mL}$ . Os antimicrobianos amoxicilina e cetoconazol também não apresentaram toxicidade frente à (Tabela 11).

A toxicidade da substância conocarpano sobre o microcrustáceo parece estar relacionada com a presença do grupo hidroxila na posição 4' da estrutura fenil-propenil-benzofurano, pois quando este grupo é substituído por um grupo metóxi (conocarpano metilado), não apresenta toxicidade ( $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ). O grupo hidroxila na substância conocarpano também é importante para a atividade antimicrobiana, pois as substâncias nas quais este grupo não está presente (conocarpano metilado e eupomatenóide-3) não são ativos contra microrganismos.

Os resultados do ensaio de toxicidade mostram que há componentes em que matam as larvas de em baixas concentrações. Entretanto, a toxicidade em não pode ser diretamente extrapolada para a toxicidade no homem, visto que o homem e outros mamíferos têm meios fisiológicos para eliminar substâncias tóxicas (OKOLI; IROEGBU, 2004).

estudo de toxicidade frente à  
isoladas de

do extrato, frações e substâncias

Substância	M <sub>g</sub> b 37 "	OU (L s j 5 g 2 1 g S 5 U N F U) s g t \$ "
Extrato Metanólico Bruto	89,98	68 - 119,07
Fração Hexano	87,85	61,76 - 124,95
Fração Diclorometano	2,91	1,86 - 4,56
Fração Acetato de Etila	877,65	328,15 - 2347,33
Conocarpano	2,92	2,24 - 3,81
Conocarpano Metilado	>1000	-
Eupomatenóide-3	>1000	-
Eupomatenóide-5	>1000	-
Orientina	>1000	-
Amoxicilina	>1000	-
Cetoconazol	>1000	-

Outras pesquisas ainda são necessárias visando elucidar o mecanismo de ação das substâncias ativas encontradas em , bem como sua aplicação como agente antimicrobiano viável. Entretanto este estudo é um progresso para auxiliar no isolamento e identificação das substâncias ativas desta planta, assim como pode auxiliar para a síntese de substâncias através de modificações estruturais das substâncias estudadas.

## , gSp mS7 B o No

- O extrato metanólico bruto, as frações hexano e diclorometano, e as substâncias conocarpano e eupomatenóide-5 isoladas de , exibiram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, entretanto não foram ativos contra as bactérias Gram-negativas testadas.
- No ensaio bioautográfico foram encontradas três diferentes zonas de inibição da bactéria Gram-positiva , uma delas corresponde ao conocarpano, a outra é devido ao Eupomatenóide-5, e a terceira corresponde a uma substância ainda não identificada. As substâncias ativas estão presentes no extrato bruto e nas frações hexano e diclorometano.
- Os componentes de exibiram pronunciada atividade antifúngica contra os fungos dermatófitos (entre 5 e 500µg/mL), sendo a fração diclorometano a mais ativa.
- As substâncias eupomatenóide-5, conocarpano e orientina apresentaram atividade contra todos os dermatófitos testados ( , , , , , ), apresentando melhor atividade que o cetoconazol.
- Somente a substância conocarpano foi capaz de inibir fungos dos gêneros e .
- Através do ensaio da foi verificado que o conocarpano não atua inibindo a parede celular fúngica.
- Os grupos infectados e tratados com extrato bruto de (G3 e G4) apresentaram o processo de regeneração do tecido mais rápido (menor retardo no processo de reparo da lesão) quando comparado ao grupo controle infectado (G2).
- O extrato metanólico bruto de e a fração hexano apresentaram moderada toxicidade ( $DL_{50}$  89,98 e 87,85µg/mL, respectivamente) frente a , a fração acetato de etila apresenta atividade tóxica fraca ( $DL_{50}$  877,66 µg/mL). A fração diclorometano e a substância conocarpano apresentaram elevada toxicidade ( $DL_{50}$  2,91 e 2,92 µg/mL, respectivamente).
- As substâncias conocarpano metilado, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e orientina não apresentaram toxicidade frente a ( $DL_{50} >1000$  µg/mL).

## P N N mSOaogDJ7Q e Px 8OS ao

- ABE, Y.; TAKIKAWA, H.; MORI, K. Synthesis of gibbilibols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols isolated from *Gibbilibum*. *J Nat Prod* 65, n. 3, p. 732-735, 2001.
- ABOURRICHE, A.; ABOUD, Y.; MAOUFOUD, S.; MOHOU, H.; SEFFAJ, T.; CHARROUF, M.; CHAIB, N.; BENNAMARA, A.; BONTEMPS, N.; FRANCISCO, C. Cynthichlorine: a bioactive alkaloid from the tunicate *Cynthochloris*. *J Nat Prod* 58, p. 1351-1354, 2003.
- AHMAD, F. B.; TAWAN, C. Phytochemical studies on *Longipedunculata*. *J Nat Prod* 55, n. 7, p. 1153-1156, 2002.
- AJALI, U.; CHUKWURAH, B. K. Antimicrobial activity of *Longipedunculata*. *J Nat Prod* 11, n. 7-8, p. 701-703, 2004.
- ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; NOGUEIRA, C. M. D.; MAGALHÃES, C. E. C.; MORAIS, N. M. T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. *Soc Bras Fisiol* 22, n. 1, p. 94-97, 2002.
- ALTOMARE, C.; PENGUE, R.; FAVILLA, M.; EVIDENTE, A.; VISCONTI, A. Structure-Activity relationships of fusapyrone, an antifungal metabolite of *Fusarium semitectum*. *J Nat Prod* 52, p. 2997-3001, 2004.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *J Nat Prod* 3, p. 367-373, 2000.
- BANG, K. H.; KIM, Y. K.; MIN, B. S.; NA, M. K.; RHEE, Y. H.; LEE, J. P.; BAE, K. H. Antifungal activity of magnolol and honokiol. *J Nat Prod* 23, n. 1, p. 46-49, 2000.
- BARATA, L. E.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Longipedunculata* species and synthetic analogues. *J Nat Prod* 55, n. 6, p. 589-595, 2000.
- BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. *Medicinal Plants*. 5th ed. St. Louis: Bailey & Scott's, 1990.
- BARRERO, A. F.; HAIDOUR, A.; MUNOZ DORADO, M. Lignanas from the wood of *Longipedunculata*. *J Nat Prod* 57, n. 6, p. 713-719, 1994.
- BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; COBIANCHI, C. R.; VUOTTO, M. L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Longipedunculata* leaves. *J Nat Prod* 71, p. 110-116, 2000.
- BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Longipedunculata*. *J Nat Prod* 65, n. 6, p. 541-544, 1999.
- BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Longipedunculata*. *J Nat Prod* 52, p. 339-343, 1999.
- BLACK, J. G. *Medicinal Plants*. 3rd ed. New Jersey: Simon & Scuster, 1996.
- BRASILEIRO FILHO, G. *Medicinal Plants*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

- BROOKS, G.R.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. ed. *ILS. 5b Fg 12 Fg*. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BRUNETON, J. *N 13 U56g 2 18 % B F g 2 18s L3s 55b U56 F* Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.
- CALIXTO, J. B. Biopirataria: a diversidade biológica na vida da indústria farmacêutica. *S FU5 Fg N 1. 28, n. 167, p. 36-43, 2000.*
- CARAZO, J. L. S.; LOSADA, L. Q.; SANJUAN, V. P. Tratamiento actual de las micose superficiales. *P r 69. ILS 3 IL F U 2 1g 55 5b F1. 16, p. 26-30, 1999.*
- CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect cytotoxicity in marine natural products. *J F3 12g S1 U5s jg J F15 U5 5b g 2, p. 17, 2002.*
- CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a Leach. *y l s 3 F gn 5 s g 23, n. 1, p. 20-22, 2000.*
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *y l s 3 F gn 5 s v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.*
- CHAURET, D. C.; BERNARD, C. B.; ARNASON, J. T.; DURST, T. Insecticidal neolignans from *55l ILs jg 5 N s 4 Is jg L52l 50g 59, n. 2, p. 152-155, 1996.*
- CHEN, Z. N.; YU, P. Z.; XU, P. J. Anti-platelet activating factor constituents, 2,5-diaryltetrahydrofuran type lignans, from *Sied. et Zucc. 5Ubl 5g 5Ubg s 5g s g g 18, n. 5, p. 292-294, 1993.*
- COSTA, A. F. *8s L3s 55b U56 Fg* ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
- COSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *and antimicrobial activities and analysis by GC/ MS and 13C-NMR. ujs U5g d 12 F g 67, n. 8, p. 771-773, 2001.*
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *P 5. . Ebus 55 5b Fg N 1 5 Is jg N U5 FU j g* ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Estudo da atividade antifúngica de *Miq., Piperaceae: um teste . c 6u5ga5 2 3 F g 4, n. 2, p. 77-82, 2003.*
- CVETNIC, Z.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *a50g s L3s 51l 50s g 54, n. 3, p. 243-250, 2004.*
- DANELUTTE, A. P.; LAGO, J. H.; YOUNG, M. C.; KATO, M. J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Kunth. u 55 13 6L g 64, n. 2, p. 555-559, 2003.*
- DA SILVA, R. Z. *N 25g N 3 55g 1g. F 5 5g 2s gu F1Lg65 36 FU 3 g S1MS 1g s L12s 2 1g solmsianum gu F1ls 5k 1 Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.*

- DE BOER, H. J.; KOOL, A.; BROBERG, A.; MZIRAY, W. R.; HEDBERG, I.; LEVENFORS, J. J. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *551 U5j g5 N* *U5 NL3s 55j 5b* *g* 96, n. 3, p. 461-469, 2005.
- DE SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. *S FU5 F6s L3s 5 1 05 64* Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003.
- DOLABELA, M. F. *rLsb 13jg vitro 4s Is g gas F Es 2 lga U5 3 5 Isj g la U5 61* *N5s 56 gc lb k F gu L52l 56 gms 5 Is 6 g 1 g ol .66 U5 F6 go B 05 61* *Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte, 1997.*
- DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *551 U5j g5 Na44j 12g 5L5. 5j 5b g* 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *OU U5s 56 U5j g5 51 U5j g5 Na U5 B 5L5. 5j gab U5 g* 17, n. 6, p. 527-529, 2001.
- DULGER, B.; GONUZ, A. Antimicrobial activity of some endemic species. *u s L3s 51 56 jg J 5j 5b g* 42, n. 4-5, p. 301-304, 2004.
- ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. *d s U5j g5 N Sj F 5j g 5L5. 5j 5b*, 6 ed. Washington: ASM, 1995.
- EVANS, W. C. *8s L3s 55b U56 F13*. ed. México: Interamericana, 1991.
- FICO, G.; PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; BRACA, A.; MORELLI, I.; TOMÈ, F. CIONI, P. L. Biological screening of for antimicrobial and molluscicidal activities. *u 56 5s 4 g 16 k L5 g* 18, n. 6, p. 468-470, 2004.
- FISHER, F.; COOK, N. B. *d 5j 5b F11* Fundamentos e Diagnóstico. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- FONSECA, A. L. *a U5 F 56 U5 g Sjs U5 g MFL Fg* ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999.
- FREIXA, B.; VILA, R.; FERRO, E. A.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antifungal principles from . *ujs U5 g 12 5 g* 67, n. 9, p. 873-875, 2001.
- FUKAI, T.; YONEKAWA, M.; HOU, A.; NOMURA, T.; SUN, H.; UNO, J. Antifungal agents from the roots of against and species. *551 U5j g5 N5s 56 Isj g L52l 56 g* 66, n. 8, p. 1118-1120, 2003.
- GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. *OUN 3 3s 56 U3*.ed. Estados Unidos da América: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- GHASEMI, Y.; YASDI, M. T.; SHAFIEE, A.; AMINI, M.; SHOKRAVI, S.; ZARRINI, G. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from . *u s L3s 51 56 jg J 5j 5b g* 42, n. 4-5, p. 318-322, 2004.
- GOLDIN, J. R. *u 16 % 6 gl 3 g5 n2*.leis, normas e diretrizes. 3.ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.
- GHOSHAL, S.; PRASAD, B. N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of fruits against and . *551 U5j g5 N5 U54 s L3s 55j 5b g* 50, n. 3, p. 167-170, 1996.

- GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. *P r 60 g2 1g 25U5 5b Fg2s gBUFI16 E 2 1g2 1gou5g us 1j5g* 6, p. 66-71, 1992.
- GÜLÇİN, I.; UGUZ, M. T.; OKTAY, M.; BEYDEMİR, S.; KÜFREVIÖGLU, O. I. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of Clary Sage ( *L.*). *d L 6 g51 U5j g5 g abLFI j5 L1s U2g 5L16 2 28*, n. 1, p. 25-33, 2004.
- GUPTA, A. K.; LYNDE, C. W.; LAUZON, G. J.; MEHLMAUER, M. A.; BRADDOCK, S. W.; MILLER, C. A.; DEL ROSSO, J. Q.; SHEAR, N. H. Cutaneous adverse effects associated with terbinafine therapy: 10 case reports and a review of the literature. *JL 6 g51 U5j g NML3s 5b. v. 138*, n. 3, p. 529-532, 1998.
- HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. A direct bioautographic assay for compounds possessing antibacterial activity. *551 U5j g 5ns 5 Isjg 1521 50v. 50*, n. 1, p. 19-22, 1987.
- HANCOCK, R. E. W.; BELL, A. Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. *N 154 k Ug51 U5j g 5 NSJ E 5jg 5L5. 5j5b g U2g UNS 5FU6 MF 616v. 7*, n. 6, p. 713-720, 1998.
- HASSAN, W.; EDRADA, R.; EBEL, R.; WRAY, V.; BERG, A.; SOEST, R.; WIRYWIDAGDO, S.; PROKSCH, P. New imidazole alkaloids from the indonesian sponge *. 551 U5j g 5 ns 5 Isjg 1521 50v. 67*, p. 817-822, 2004.
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *u 500 11s 4 g 16 k 15, 1. 14*, n. 7, p. 510-516, 2000.
- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus (Piperaceae). *a 3 1L5 Ug 51 U5j g 5 50 U. v. 88*, p. 706-716, 2001.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *d 515. 5j5b Fg 12 E 2. ed.* São Paulo: Premier, 1998.
- JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; GUPTA, M. P.; EICH, E. In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *r154 E jg 12 F E1s U2g U5j g 5 NSJ 50v. 4*, n. 9, p. 611-615, 1999.
- JOLY, A.B. *J50 U5 E H* Introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 1998.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *N 45 5b Fg J(6 E 10. ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *J 5j5b Fg 5 1j s 1gl3 5 15 j s 16. ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- KANEGUSUKU, M.; BENASSI, J. C.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; MAIA, A. A.; SOUZA, M. M.; DELLE MONACHE, F.; NIERO, R. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *(Rosaceae)*. *g 155 L E 5 N1gms 5 L5L65 1 Ub 57c*, n. 3-4, p. 272-276, 2002.
- KANZAKI, T.; MORISAKI, N.; SHIINA, R.; SAITO, Y. Role of transforming growth factor- $\alpha$  pathway in the mechanism of wound healing by saponin from Ginseng Radix rubra. *JL 6 g51 U5j g 5 N s L3s 55j 5b 2 125*, n. 2, p. 255-262, 1998.

- KATO, M. J. The chemistry of Amazonian Myristicaceae: developmental, ecological and pharmacological aspects. In: Seidl, P. R.; Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.. editors. *S 13 62 g 30 lg a 3s 5UH. F2 F116 g 15 15 41521 50g U2g1U E5U3 1U0jg 61 161ACS Symposium Series 588*, Washington, DC: American Chemical Society, p. 168-179, 1995.
- KÖLER, T.; PECHÈRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *S 11j1s Ig U2g 5 151js Ig 1505 RU516g* 56, n. 9-10, p. 771-778, 1999.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN JÚNIOR, W. C. *MFBUR25g 5L5. 5j 55 15* Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; KOHLER, I.; TOFERN-REBLIN, B.; SIEMS, K.; BIENZLE, U.; EICH, E. Antiplasmodial activity of sesquilignans and sesquieolignans from *u 55 13 62 g* 60, n. 2, p. 167-173, 2002.
- KUMAR, P. Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *SI 11U05 RU51v. 86, n. 7*, 2004.
- KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. *us 55 5b FgJ(6 5 1g* ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. *ris 25g2 lg 55 5b Fg 1 2 5 1g* São Paulo: Sarvier, 2002.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *e 1 Fg4s Is g 02 1U05 15g g 81 Ub56 ga50E5 3 F106 gajbs 62 1gU1L66 lg 1 2 55g* São Paulo: Sarvier, 1998.
- LEE, K. W.; EVERTS, H.; BEYNEN, A. C. Essential oils in broiler nutrition. *OU 11L5 55 15jg 51 15jg 5 15 51j5 505 RU51g* 3, n. 12, p. 738-752, 2004.
- LEE, E. W.; CHEN, J.; HUDA, M. N.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Functional cloning and expression of *A*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *. J 55 5b 5jg s L3s 51 55 5jg 1j 15* Ev. 26, p. 266-270, 2003.
- LENTZ, D. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C. M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A. L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *551 115jg 5N5 U54 s L3s 55 5b g* 63, n. 3, p. 253-63, 1998.
- LEWIS, N. G.; KATO, M. J.; LOPES, N.; DAVIN, L. B.; Lignans: diversity, biosynthesis and function. In: Seidl, P. R.; Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.. editors. *S 13 62 g 30 lg a 3s 5UH . F2 F116 g 15 15 41521 50g U2g 1U E5U3 1U0jg 61 161ACS Symposium Series 588*, Washington, DC: American Chemical Society, p. 135-1167, 1995.
- LO CANTORE, P.; IACOBELLIS, N. S.; DE MARCO, A.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *L* and *Miller Var.* (Miller) essential oils. *551 115jg 5abL 5j5 15jg 552gS 13 62 g* 52, n. 26, p. 7862-7866, 2004.
- LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BAKHTIAR, A.; BÉZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. *8 55 11s 4 Fg* 73, n. 5, p. 400-405, 2002.
- LLOP, C.; PUJOL, I.; AGUILAR, C.; SALA, J.; RIBA, D.; GUARRO, J. Comparison of tree methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. *aU5B 5L5. 5jgab 1U05 U2gS 13 50 11s 4*, v. 44, n. 2, p. 239-242, 2000.
- LÓPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *551 115jg 5N5 U54 s L3s 55 5b g* 77, n. 2, p. 189-196, 2001.

- LÓPEZ, A.; MING, D. S.; TOWERS, G. H. N. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 65, n. 1, p. 62-64, 2002.
- MA, J.; JONES, S. H.; MARSHALL, R.; JOHNSON, R. K.; HECHT, S. M. A DNA-damaging oxoaporphine alkaloid from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 67, p. 1162-1164, 2004.
- MA, Y.; HAN, G. Q.; WANG, Y. Y. PAF antagonistic benzofuran neolignans from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 28, n. 5, p. 370-373, 1993.
- MA, Y.; HAN, G. Q.; LIU, Z. J. Studies on PAF antagonistic bicyclo(3,2,1) octanoid neolignans from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 28, n. 3, p. 207-211, 1993.
- MA, Y.; HAN, G. Q.; LI, C. L.; CHENG, J. R.; ARISON, B. H.; HWANG, S. B. Neolignans from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 26, n. 5, p. 345-350, 1991.
- MACKAY, D.; MILLER, A. L. Nutritional support for wound healing. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 8, n. 4, p. 359-377, 2003.
- MAJNO, G.; JORIS, I. *Principles of general Pathology*, Inglaterra: Blackwell Science, 1996.
- MARCHISIO, F. V.; PREVE, L.; TULLIO, V. Fungi responsible for skin mycoses in Turin (Italy). *Journal of Mycology* 39, n. 3-4, p. 141-150, 1996.
- MARTINS, R. C.; LAGO, J. H.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Sida acuta*. *Phytochemistry* 64, n. 2, p. 667-670, 2003.
- MARTINS, R. C.; LATORRE, L. R.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 55, n. 7, p. 843-846, 2000.
- MASUDA, T.; INAZUMI, A.; YAMADA, Y.; PADOLINA, W. G.; KIKASAKI, H.; NAKATAMI, N. Antimicrobial phenylpropanoids from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 30, n. 10, p. 3227-3228, 1991.
- MAXWELL, A.; DABIDEEN, D.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Neolignans from *Sida acuta*. *Phytochemistry* 50, n. 3, p. 499-504, 1999.
- McLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 32, n. 2, p. 513-524, 1998.
- McLAUGHLIN, J. L. Crow gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: HOSTETTSMANN, K. *Phytochemistry* 52, p. 1-32, 1991.
- MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 45, n. 30, p. 31-34, 1982.
- MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Sida acuta* as a test organism for a bioassay. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 123, p. 464, 1956.
- MILIÁN, A. J. G.; TORRES, M. D. C. M.; RODRÍGUEZ, F. M.; PINEDO, Z. Efecto espasmolítico del aceite de *Sida acuta* en el músculo liso intestinal. *Phytochemistry* 12, p. 12-15, 2001.
- MILIÁN, A. J. G.; TORRES, M. D. C. M.; RODRÍGUEZ, F. M. Actividad antiespasmódica de extractos de *Sida acuta* en intestino. *Phytochemistry* 12, p. 19-22, 2001.



- NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barrier and active efflux. *Journal of Antibiotics*, 264, n. 5157, p. 382-388, 1994.
- NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Journal of Antibiotics*, 33, n. 11, p. 1831-1836, 1989.
- NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: *Da planta ao medicamento*. eds SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. p. 11-24. 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000.
- OKOLI, A. S.; IROEGBU, C. U. Evaluation of extracts of *Andropogon distachyoides* and *Andropogon distachyoides* for activity against bacterial isolates from cases of non-gonococcal urethritis. *Journal of Antibiotics*, 59, n. 2, p. 135-144, 2004.
- OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. *Journal of Natural Products*, 1, p. 49-58, 2003.
- ORJALA, J.; MIAN, P.; RALI, T.; STICHER, O. Gibbilibols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Andropogon distachyoides*. *Journal of Natural Products*, 61, n. 7, p. 939-941, 1998.
- ORJALA, J.; ERDEUMEIER, C. A.; WRIGHT, A.D.; RALI, T.; STICHER, O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from leaves of *Andropogon distachyoides*. *Journal of Natural Products*, 59, n. 6, p. 546-551, 1993.
- PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; ARAGÃO, T. V.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of plumbagin isolated from *Plumbago zeyheri* species. *Journal of Natural Products*, 98, 959-961, 2003.
- PARK, I. K.; LEE, S. G.; SHIN, S. C.; PARK, J. D.; AHN, Y. J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Andropogon distachyoides* fruits against three mosquito species. *Journal of Natural Products*, 50, n. 7, p. 1866-1870, 2002.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Andropogon*. *Journal of Natural Products*, 46, p. 597-673, 1997.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, G. I.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Andropogon distachyoides* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Journal of Natural Products*, 8, n. 5, 395-400, 2001.
- PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade de *Andropogon distachyoides*. *Journal of Natural Products*, 15, n. 11-12, p. 66-69, 2003.
- PAYROL, J. A.; MARTINEZ, M. M.; CARRABEO, G. T.; GARCIA, O. C. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Andropogon distachyoides* (piña de ratón). *Journal of Natural Products*, 35, n. 1, p. 56-60, 2001.
- PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Andropogon distachyoides*: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.
- PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UFENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Journal of Natural Products*, 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

- PESSINI, G. L.; PRADO DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from (Miq.) C. DC. var. (C. DC.) Yunck. *d 13 11 25 2003*. y. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.
- PESSINI, G.L.; PRADO DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of the extracts and neolignans from (Miq.) C. DC. var. (C. DC.) Yunck. *551 11 25 2003*. v. 16, n. 6A, p. 1130-1133, 2005.
- POOLE, K. Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and . *551 11 25 2003*. v. 34, p. 453-456, 1994.
- PRADHAN, K. J.; VARIYAR, P. S.; BANDEKAR, J. R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper ( L.). *7 1. 10 63 2003*. v. 32, n. 2, p. 121-123, 1999.
- PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from (Clusiaceae/Guttiferae). *10 5 11 2003*. v. 59, 1-6, 2004.
- RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; HOSTETTMAN, K. Antifungal tests in phytochemical investigations. Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi *11 25 2003*. v. 60, n. 1, p. 41-44, 1994.
- RAHMAN, M. M.; GRAY, A. I. Antimicrobial constituents from the stem bark of *u 10 5 13 2002*. v. 59, n. 1, p. 73-77, 2002.
- RAMJI, N.; RAMJI, N.; IYER, R.; CHANDRASEKARAN, S. Phenolic antibacterials from in the prevention of halitosis. *551 11 25 2003*. v. 83, n. 1-2, p. 149-152, 2002.
- RANDHAWA, G. K.; SHARMA, G. Echinocandins: A promising new antifungal group. *OU 2 2003*. v. 36, n. 2, p. 65-71, 2004.
- RON, B. H.; WILLS, K. B.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *11 25 2003*. v. 13, n. 1, p. 47-77, 2000.
- RUBIN, E.; FARBER, J. L. *us 10 5 2003*. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- SAHPAZ, S.; BORIS, C.; LOIEAU, P. M.; CORTES, D. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *11 25 2003*. v. 60, n. 6, p. 538-540, 1994.
- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *d 515. 11 25 2003*. Mecanismos das Doenças Infecciosas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- SCHMITT, A. C.; DE ALMEIDA, A. B. P. F.; DA SILVEIRA, T. A.; IWAKURA, C. T.; MENDES, K. F.; DA SILVA, M. C. Avaliação da atividade antimicrobiana da planta Kurz ("Folha-da-fortuna") colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/ Brazil. *a 50 2003*. v. 31, n. 1, p. 55-58, 2003.
- SELITRENNIKOFF, C.P. Screening for antifungal drugs. *11 25 2003*. Boston: Butterum Henemann, 189 – 217, 1992.
- SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of species: a review. *8 2003*. v. 58, n. 3, 147-166, 1987.
- SHITUT, S.; PANDIT, V.; MEHTA, B. K. The antimicrobial efficiency of Linn leaf (stalk) against human pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi. *S 10 5 2003*. v. 7, n. 3, p. 137-139, 1999.

- SILVA, R. L.; DE MELO, G. B.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S. O.; DE MELO, V. A.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; DE CASTRO E SILVA JÚNIOR, O.; Effect of the aqueous extract of *Passiflora ligularis* on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Arb. Inst. Ci. Univ. São Carlos* v. 17, n. 3, p. 101-105, 2002.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Da planta ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Química de plantas medicinais*. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998.
- SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo Fitoquímico das cascas do caule de *Passiflora ligularis* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Leishmania amazonensis*. *Rev. Bras. Farmacoter.* 24, n. 2, p. 185-187, 2001.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Passiflora ligularis* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Leishmania amazonensis*. *Rev. Bras. Farmacoter.* 21, n. 5, p. 557-559, 1998.
- SLEET, R. B.; BRENDEL, K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Daphnia magna* nauplii for use in developmental toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, p. 435-446, 1983.
- SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KWON, C. S.; KWON, G. S.; KANG, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Quercetin* L., Schneider, (L.) Vent., *Quercus agrifolia* Ait and Nakai. *J. Nat. Prod.* 11, n. 7-8, p. 666-672, 2004.
- SOLÍS, C.; BECERRA, J.; FLORES, C.; ROBLEDO, J.; SILVA, M. Antibacterial and antifungal terpenes from *Passiflora ligularis* (D. Don) Florin. *J. Nat. Prod.* 49, n. 2, p. 157-161, 2004.
- SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *J. Nat. Prod.* 59, n. 3, p. 250-252, 1993.
- SOUZA, L. K. H.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; DE SOUZA JÚNIOR, A. H.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Antimicrobial activity of *Passiflora ligularis* towards dermatophytes. *J. Nat. Prod.* 98, n. 7, p. 963-965, 2003.
- STEVENS, A.; LOWE, J. *Plantas medicinais*. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.
- SUNG-EUN LEE, S. E. Mosquito larvicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum*. *J. Nat. Prod.* 16, n. 3, p. 245-247, 2000.
- TASKOVA, R.; MITOVA, M.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; DUDDECK, H. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Passiflora ligularis*. *J. Nat. Prod.* 73, p. 540-543, 2002.
- TAVARES, W. *Plantas medicinais*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- TIRILLINI, B.; VELASQUEZ, E. R.; PELLEGRINO, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Passiflora ligularis*. *J. Nat. Prod.* 62, n. 4, p. 372-373, 1996.

- TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2', 6'- dihydroxy - 4' - methoxychalcone isolated from *on* *aUB 5L5. fjablU0g U2gS 1350 lls 4 g* 43, n. 5, p. 1234-1241, 1999 a.
- TORRES-SANTOS, E. C.; RODRIGUES, J. M. Jr; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A.; ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *and* antileishmanial activities of 2', 6' - dihydroxy - 4' - methoxychalcone by entrapment in poly (D, L - lactide) nanoparticles. *aUB 5L5. fjablU0g U2g S 1350 lls 4 g* 43, n. 7, 1776-1778, 1999 b.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *d 5L5. f5b f1.* ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- TRIPATHI, D. M.; GUPTA, N.; LAKSHMI, V.; SAXENA, K. C.; AGRAWAL, A. K. Antigiardial and immunostimulatory effect of *on* giardiasis due to *. u 500 lls 4 g P 16s 15 d.* 13, n. 7, p. 561-565, 1999.
- TSHIKALANGE, T. E.; MEYER, J. J. M.; HUSSEIN, A. A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *55l Ulsjg 5 N 5U NL3s 55 5b g* 96, n. 3, p. 515-519, 2005.
- VAN BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHÈRE, J. C.; TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *55l Ulsjg 5 aUB 5L5. fjgS 1350 lls 4 g* 51, 1055-1065, 2003.
- VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *nauplii. N500 / 55 5b g NU 5U3 U0jgS 10 g* 5, p. 382-387, 1981.
- VASQUES DA SILVA, R.; NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI VDA, S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *and* *. u 505 13 00 g* 59, n. 5, p. 521-527, 2002.
- VOLK, W. A.; GEBHARDT, B.; HAMMARSKJOLD, M.; KADNER, R. *N61U0fj6g5 N 12 fjg d 5L5. f5b 1* ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic O157: H7. *55l Ulsjg 5 N 5U NL3s 55 5b g* 94, p. 49-54, 2004.
- YANG, Y. C.; LEE, S. G.; LEE, H. K.; KIM, M. K.; LEE, S. H.; LEE, H. S. A piperidine amide extracted from *L. fruit shows activity* *mosquito larvae. 55l Ulsjg 5 N abLHjs 1s jg 552gS 13 00 g* 50, p. 3765-3767, 2002.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *y 1s 3 f gm5^ s g* 24, n. 1, p. 147-152, 2001.
- ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. *ujs U02ILF12g U0B 55050* Current trends and future prospects. The Haworth Press, 1-41, 2003.
- ZACCHINO, S.; RODRIGUEZ, G.; SANTECCHIA, C.; PEZZENATI, G.; GIANNINI, F.; ENRIZ, R. *studies on mode of action of antifungal 8.O.4'-neolignans occurring in certain species of* *and related genera of Myristicaceae. 55l Ulsjg 5 N 5U4 s L3s 55 5b g* 62, n. 1, p. 35-41, 1998.

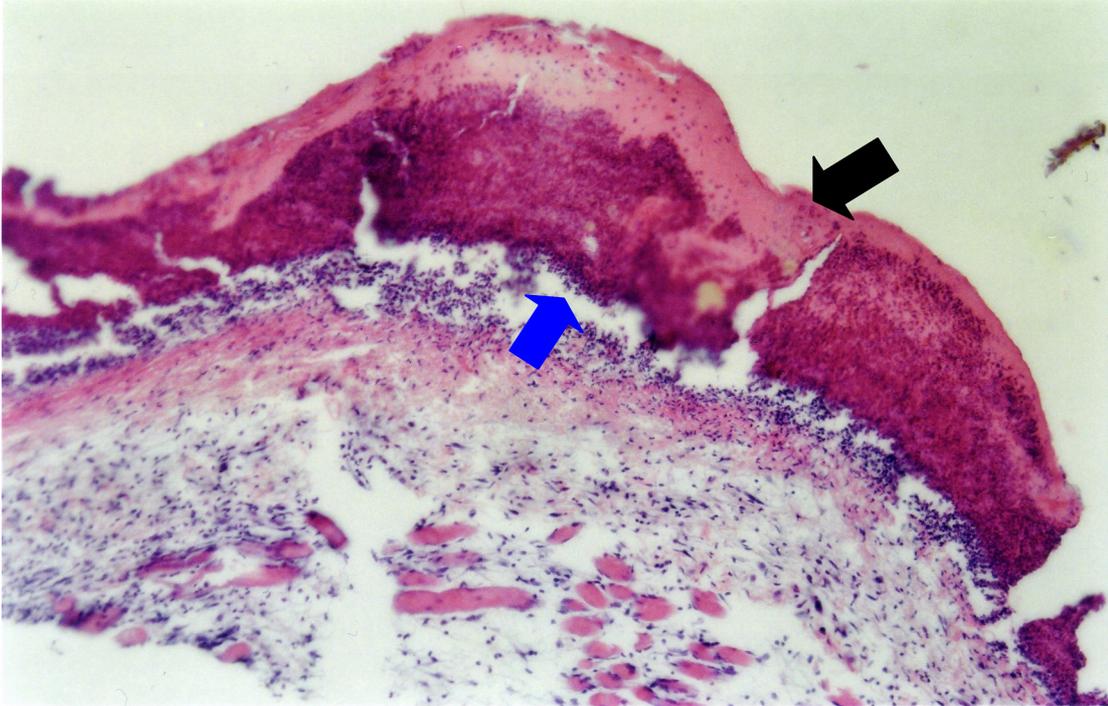
ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. **S5341U2 Fg21g d 5j5b8g 12 8 g** Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda., 1998.

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening sstem for anti activity. **u 3 12 F E1g** 2, n. 1, p. 47-50, 1995.

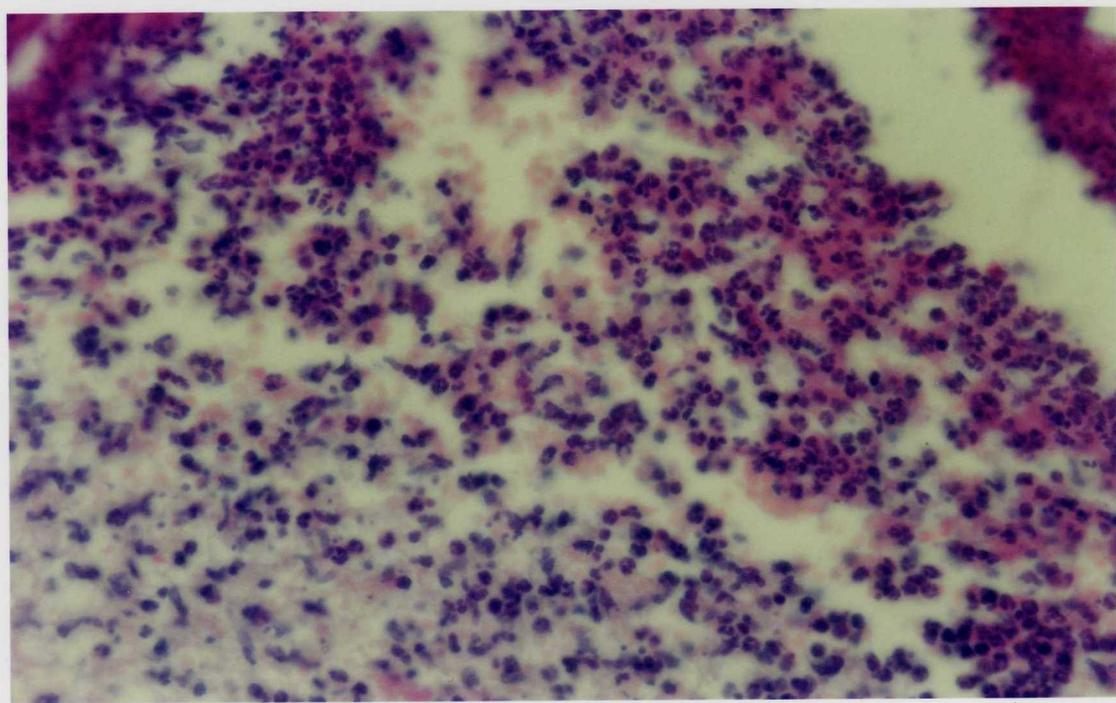
ZUQUE, A. L. F.; WATANABE, E. S.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA, A. L. A.; RESENDE, U. M.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de Benth. (Chrysobalanaceae). **g P r 6gJls 6jFl 8 g2 1g s L3s 55bU56 Fg** v. 14, n. 2, p.129-136, 2004.

**amN p o**

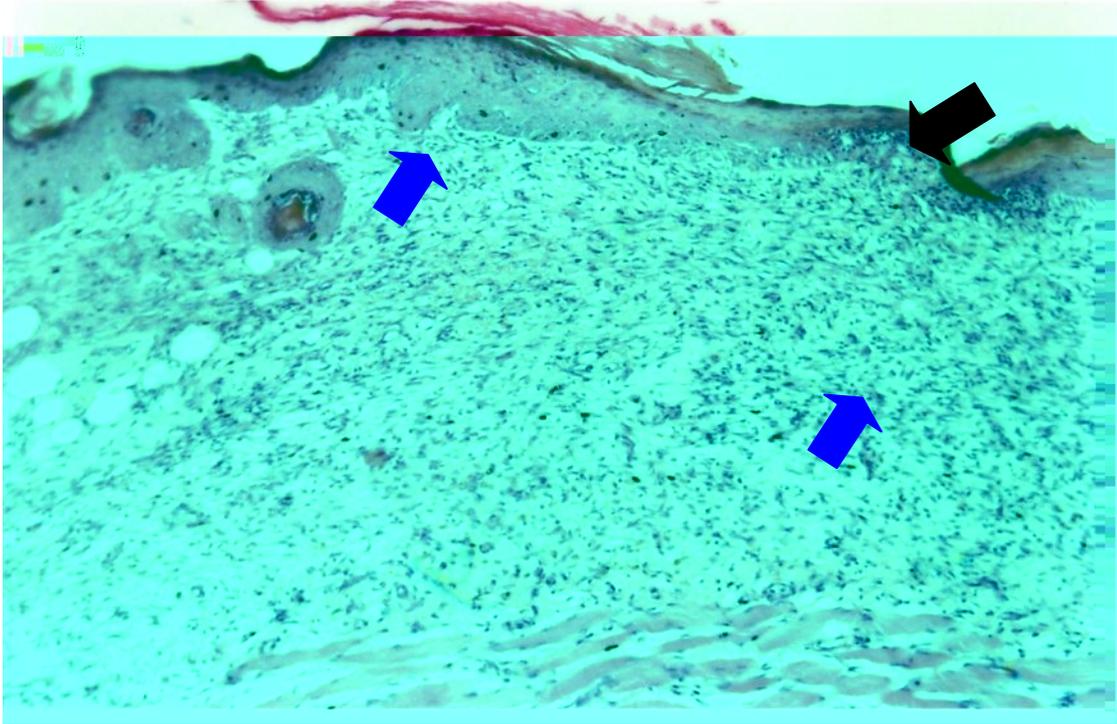
ANEXO A - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo controle não infectado (G1). **➡** área de necrose, **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



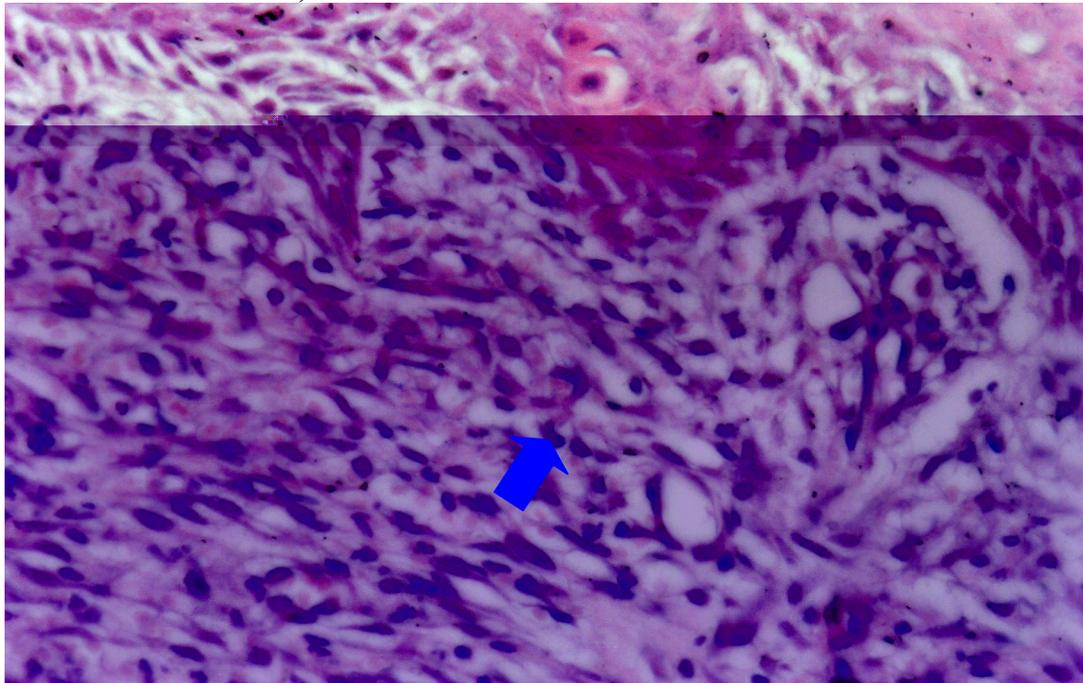
ANEXO B - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo controle não infectado (G1). **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



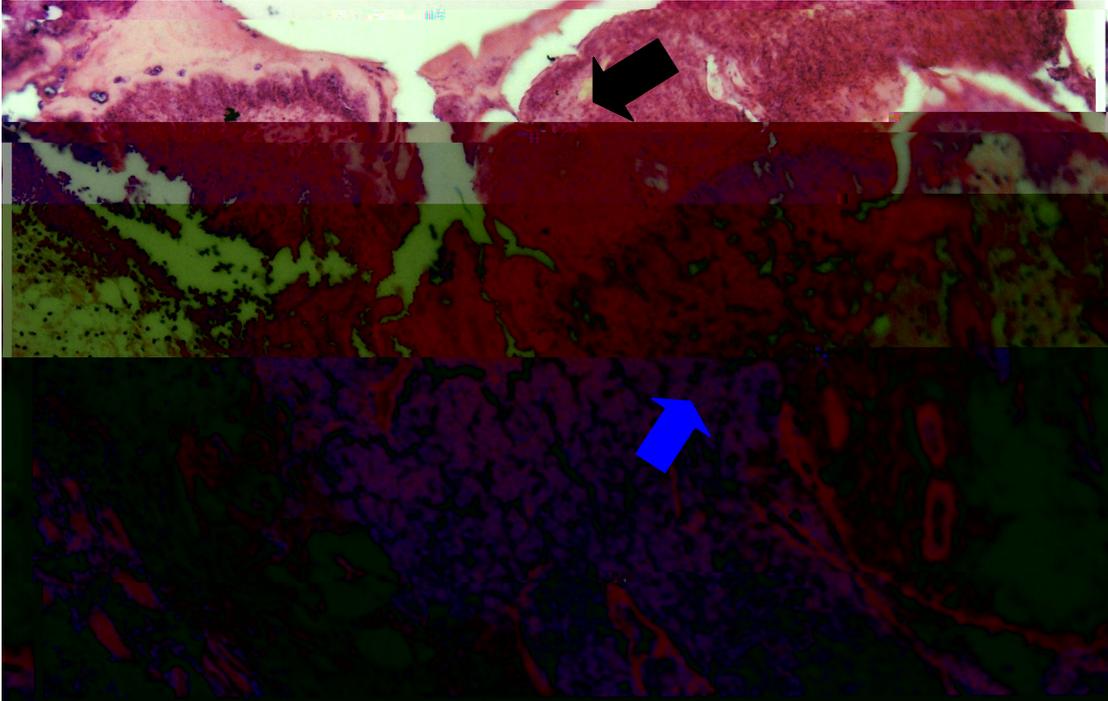
ANEXO C - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo controle não infectado (G1). **➡** área de necrose; **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



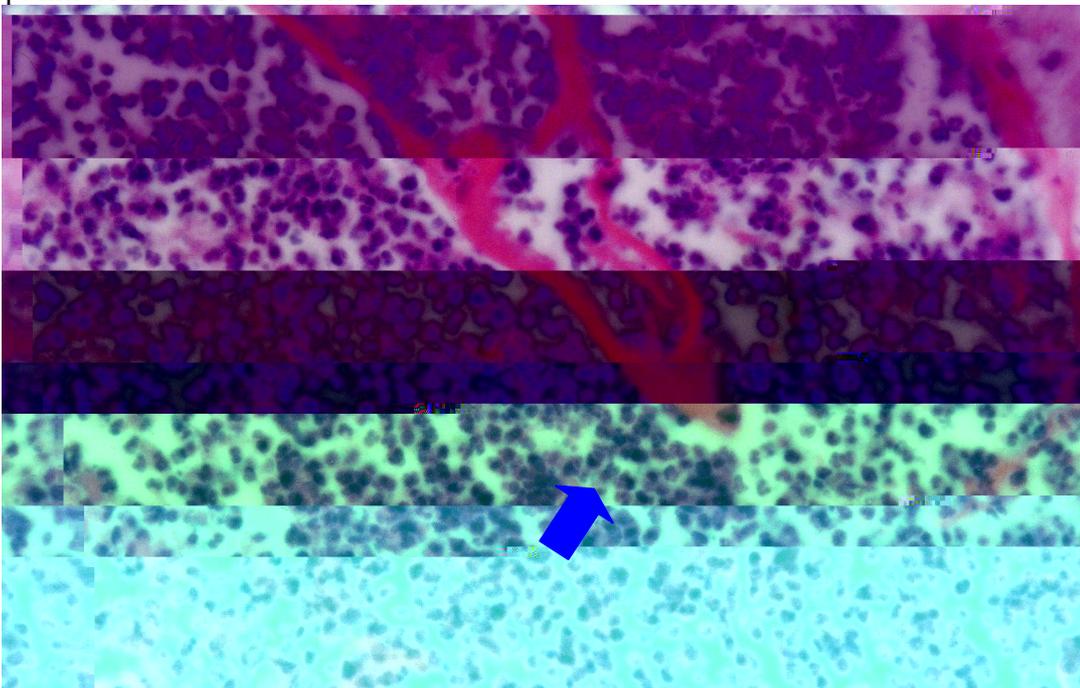
ANEXO D - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo controle não infectado (G1). **➡** tecido de granulação com predomínio de células mononucleares, neovasos e matriz extracelular.



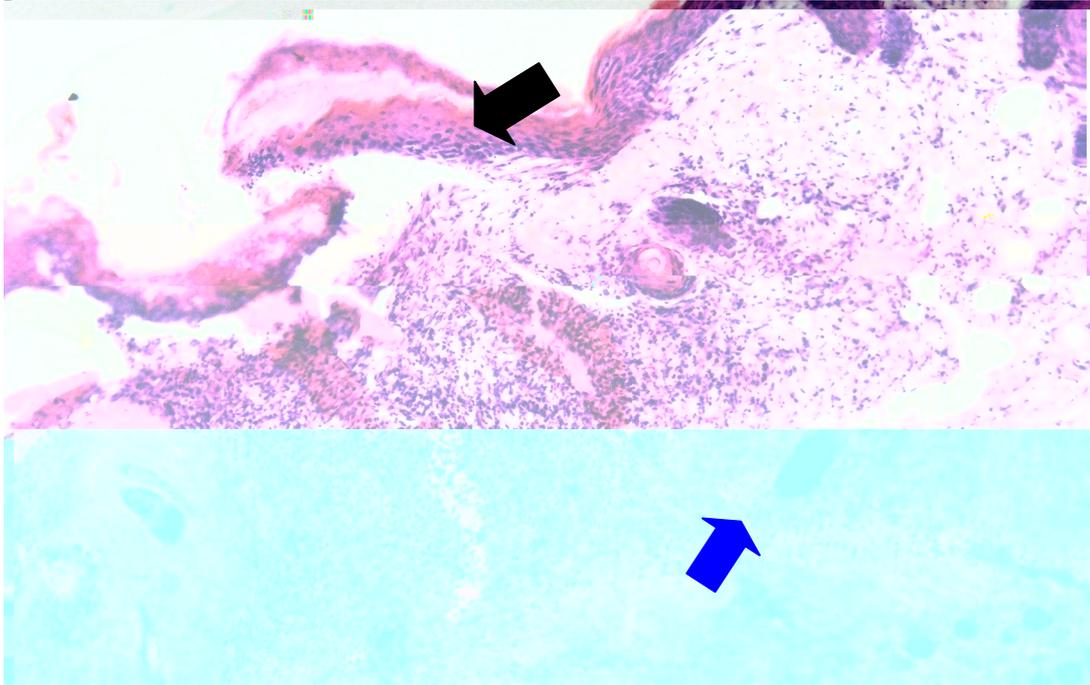
ANEXO E - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo controle infectado (G2). **→** área de necrose, **→** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



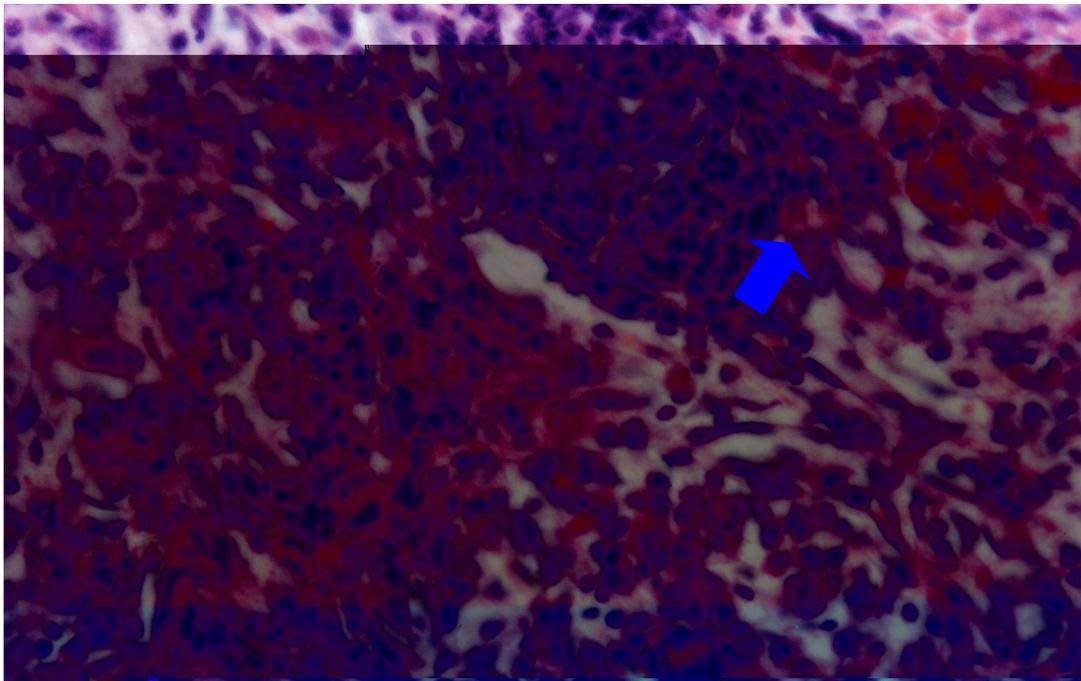
ANEXO F - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo controle infectado (G2). **→** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



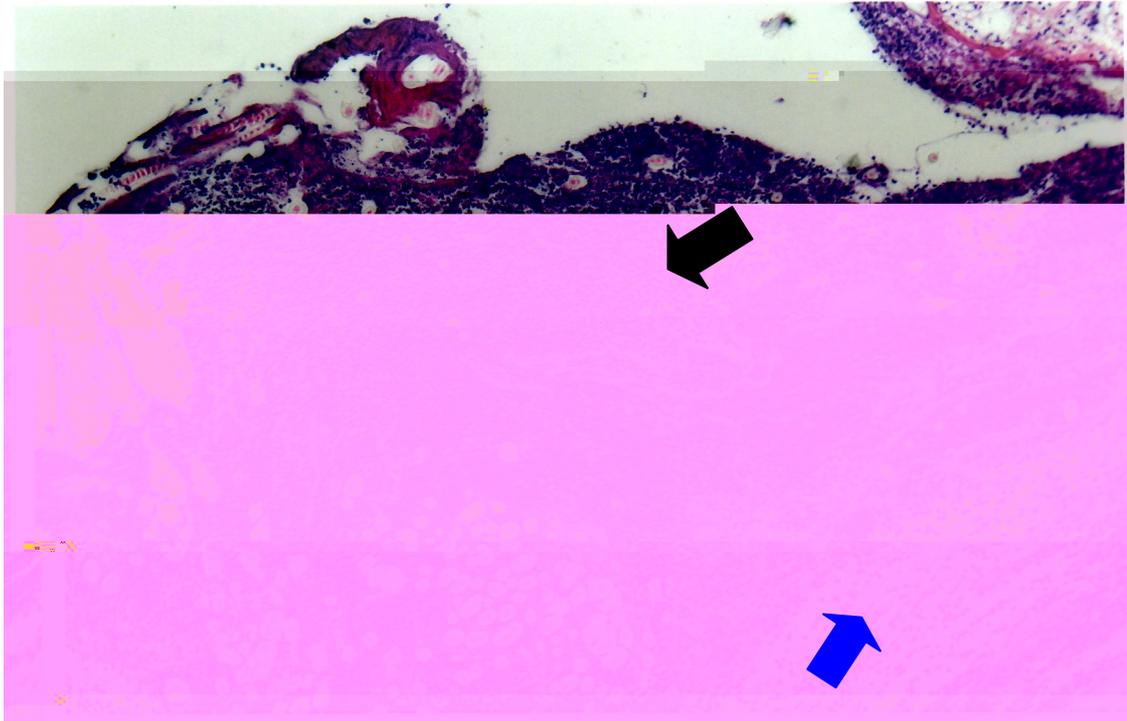
ANEXO G - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo controle infectado (G2). **➡** área de necrose; **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



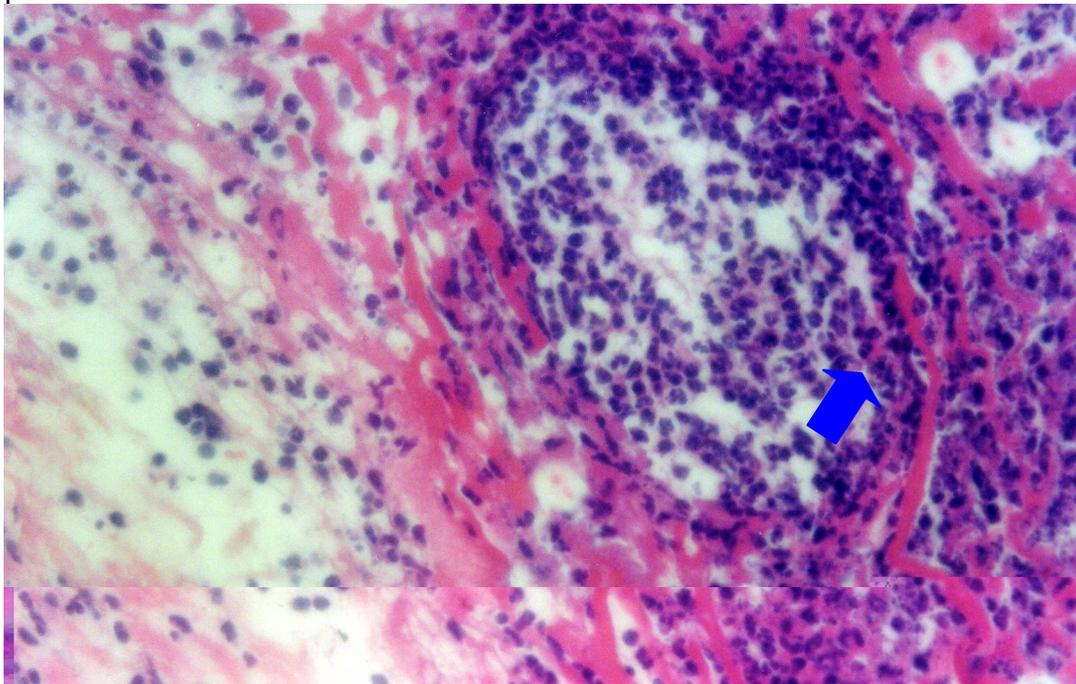
ANEXO H - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo controle infectado (G2). **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



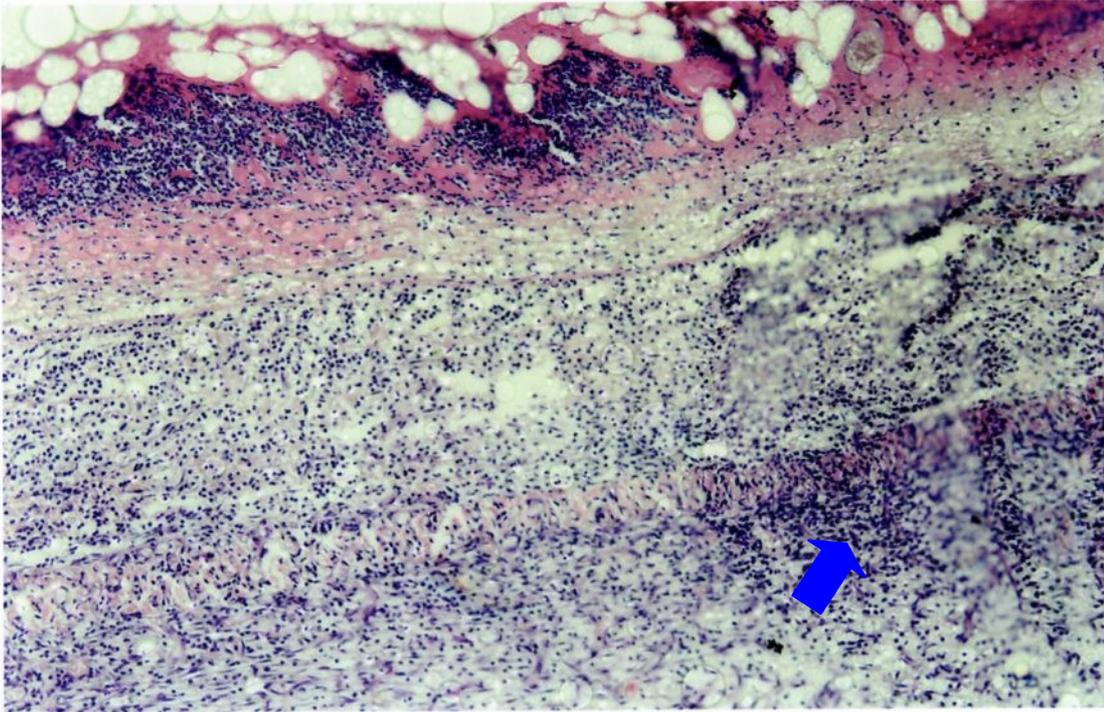
ANEXO I - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo infectado e tratado a partir do 1º dia (G3). **➡** área de necrose, **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



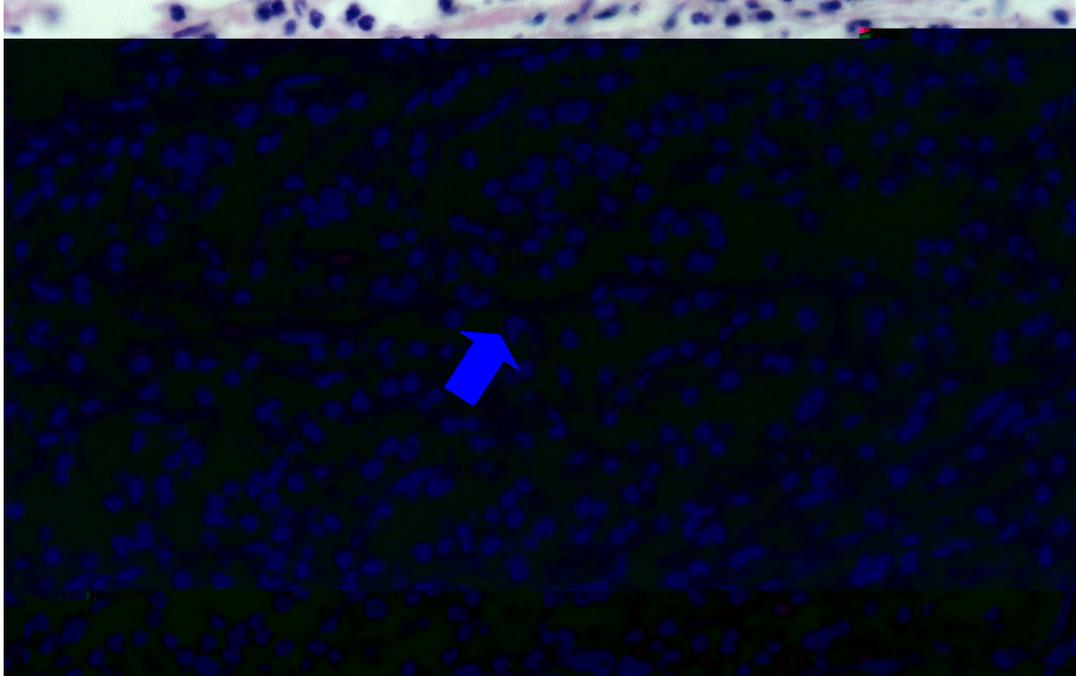
ANEXO J - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo infectado e tratado a partir do 1º dia (G3). **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



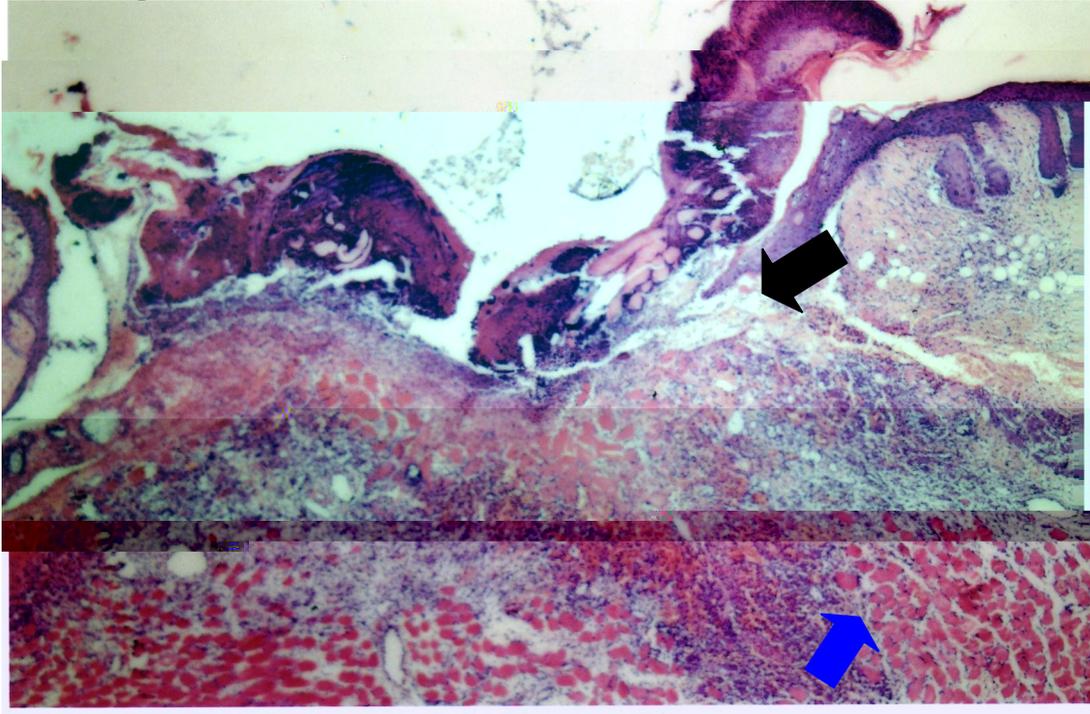
ANEXO L - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo infectado e tratado a partir do 1º dia (G3). ➡ área de células polimorfonucleares e mononucleares.



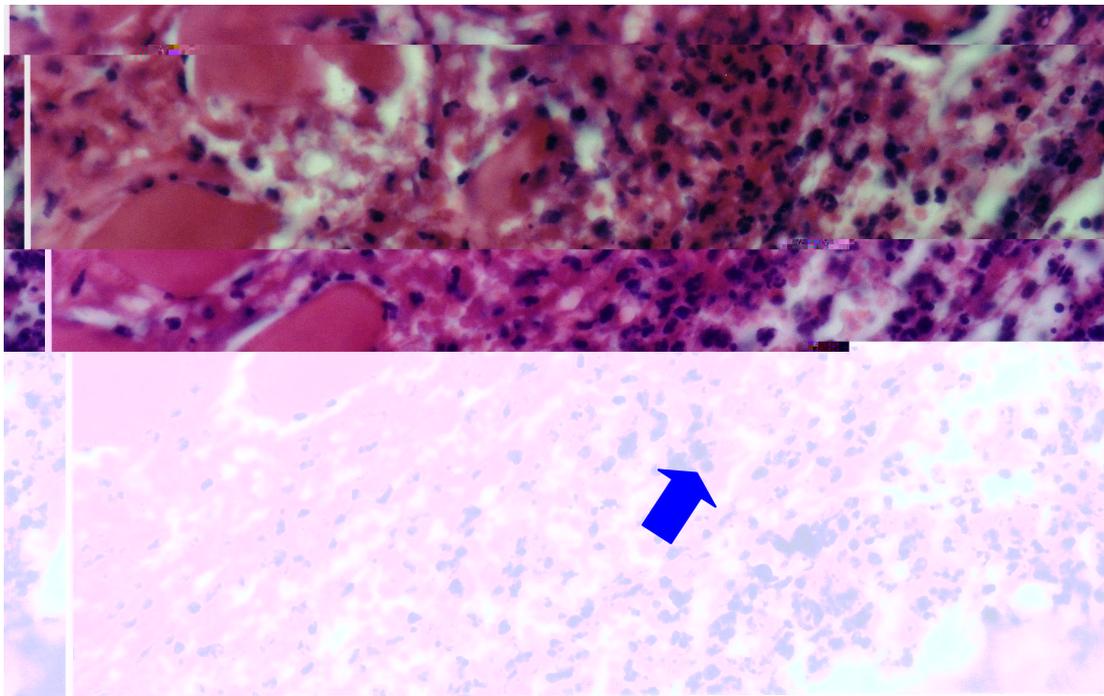
ANEXO M - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo infectado e tratado a partir do 1º dia (G3). ➡ tecido de granulação com predomínio de células mononucleares, neovasos e matriz extracelular.



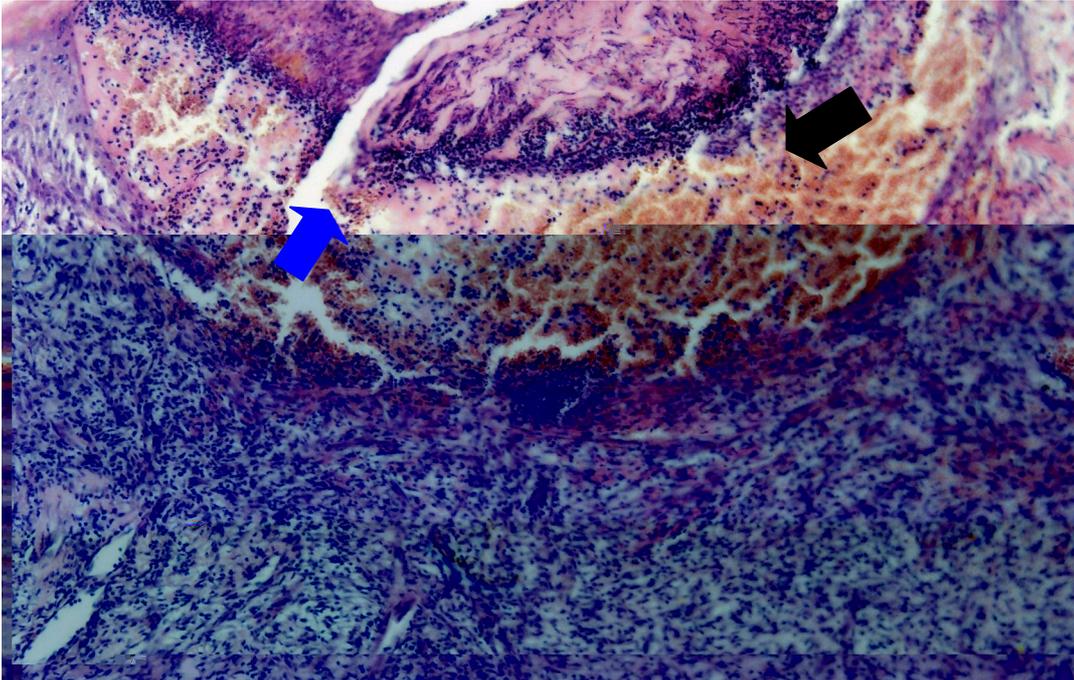
ANEXO N - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 4 x), grupo infectado e tratado a partir do 2º dia (G4). ➡ área de necrose, ➡ área de células polimorfonucleares e mononucleares.



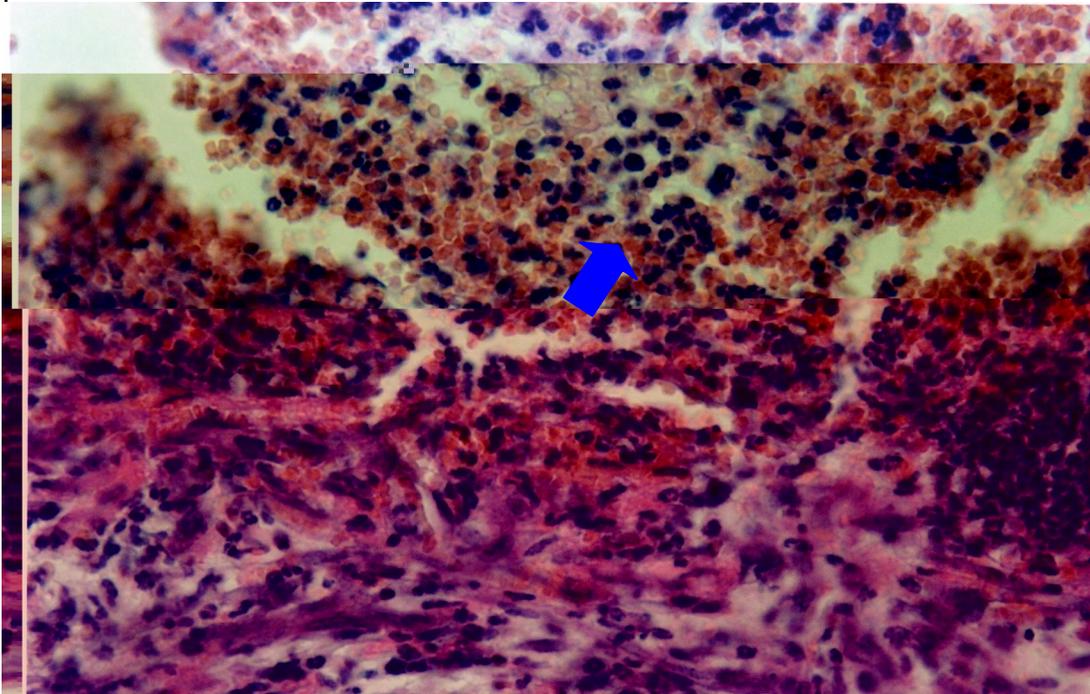
ANEXO O - Reação inflamatória 3 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo infectado e tratado a partir do 2º dia (G4). ➡ área de células polimorfonucleares e mononucleares.



ANEXO P - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 10 x), grupo infectado e tratado a partir do 2º dia (G4). **➡** área de necrose, **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



ANEXO Q - Reação inflamatória 7 dias após o início da lesão (coloração HE, aumento 40 x), grupo infectado e tratado a partir do 2º dia (G4). **➡** área de células polimorfonucleares e mononucleares.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)