



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BIOATIVIDADE DE *Aristolochia cymbifera* MART. & ZUCC.  
E ISOLAMENTO DE COMPONENTES ATIVOS**

**DAVI OLIVEIRA E SILVA**

**Orientadores: MARIA AUXILIADORA COELHO KAPLAN  
CELUTA SALES ALVIANO  
DANIELA SALES ALVIANO**

Rio de Janeiro

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

2009  
DAVI OLIVEIRA E SILVA

**BIOATIVIDADE DE *Aristolochia cymbifera* MART. & ZUCC.  
E OBTENÇÃO DE COMPONENTES ATIVOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia Vegetal como  
parte do requisito de obtenção do Título de  
Mestre em Biotecnologia Vegetal.**

**Orientadores: MARIA AUXILIADORA COELHO KAPLAN  
CELUTA SALES ALVIANO  
DANIELA SALES ALVIANO**

Rio de Janeiro

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA**

SILVA, Davi Oliveira e.

Bioatividade de *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc. e Isolamento de Componentes Ativos / Davi Oliveira e Silva - Rio de Janeiro. Decania, CCS – UFRJ, 2009.

XV, 78f.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, Celuta Sales Alviano e Daniela Sales Alviano.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Decania-CCS / Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 54-63.

1. Microrganismos 2. *Aristolochia cymbifera* 3. Bioatividade 4. Antimicrobianos. I Kaplan, Maria Auxiliadora Coelho; Alviano, Celuta Sales e Alviano, Daniela Sales. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania-CCS, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Davi Oliveira e Silva**

**Bioatividade de *Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc e isolamento de componentes ativos.**

Rio de Janeiro, 18 de fevereiro de 2009.

---

Celuta Sales Alviano, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Daniela Sales Alviano, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, Dr<sup>a</sup> em Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Humberto Ribeiro Bizzo, Dr. em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Lucy Seldin, Dr<sup>a</sup> em Ciências – Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Leosvaldo Salazar Marques Velozo, Dr. em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Trabalho realizado no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), sob orientação da Prof<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, Prof<sup>a</sup> Celuta Sales Alviano e Prof<sup>a</sup> Daniela Sales Alviano.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado o prazer de uma vida dedicada e entregue nas mãos Dele. Graças a Ele tenho condições de acordar todo dia e lutar por meus sonhos.

Aos meus pais que me apoiaram e apóiam continuamente ao longo desta caminhada e que acreditam em meus sonhos ao sonharem junto comigo.

À minha irmã, Silvana, pelo incentivo e constante apoio em tudo que esteve ao seu alcance.

À minha noiva Érika que sempre me compreendeu e me deu forças pra vencer cada barreira. Sem você o caminho ficaria mais difícil.

À Profa. Celuta Sales Alviano, não só pelo conhecimento e lições de vida adquiridos ao longo do tempo de convivência, mas também pelas inúmeras portas abertas e horizontes contemplados graças a seu marcante conteúdo interdisciplinar.

À Profa. Daniela Sales Alviano pela paciência, conhecimento, e confiança a mim investidos.

À Profa. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (Profa. Má), pela grande experiência profissional e conhecimento de vida que me foi oferecido.

Ao pessoal do laboratório, Cristina, Rafaela, Gleiser, Cátia, Vanila, Fátima, Luiz, Danielle, Maristela, Profa. Rosângela, Éber, Alexandre, Luciana e Nathália.

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pela credibilidade e investimentos que permitiram financeiramente a realização deste trabalho.

## RESUMO

A flora brasileira caracterizada por sua elevada diversidade possui grande potencial terapêutico dirigido para inúmeras doenças e distúrbios do organismo. Essa característica ímpar é o resultado da interação constante das plantas com o meio ambiente ao longo do processo evolutivo, culmina com a produção de diferentes metabólitos especiais com diversas propriedades. O presente estudo avaliou o potencial antimicrobiano de extratos de *Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc, uma espécie vegetal utilizada tradicionalmente no tratamento de diversas infecções na forma de extratos aquoso (chá) e etanólico (cachaça). Após a avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas por partição líquido:líquido do extrato etanólico bruto utilizando hexano, diclorometano e acetato de etila, foi observada uma potencialização da atividade para a fase diclorometânica. A partir dessa fase diclorometânica foi isolada uma mistura de ácido aristolóquico I e II (AA I e AA II), sendo apenas AA I ativo contra *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (a 250 µg/ml, efeito microbioestático e a 500 µg/ml, ação microbiocida). Não foi observado o envolvimento destes ácidos na ação antifúngica atribuída à fase diclorometânica. A obtenção do extrato bruto hexânico possibilitou a extração de substâncias ativas sem a presença dos ácidos aristolóquicos. Desse extrato, foi isolado o sesquiterpeno espatulenol ativo contra MRSA (a 250 µg/ml, efeito microbioestático e 500 µg/ml, ação microbiocida). Todas as amostras testadas exibiram ação antiviral frente ao Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1), exceto a fase diclorometânica e o extrato bruto aquoso. Nenhuma amostra testada exibiu atividade frente ao Herpes Simplex Vírus tipo 2 (HSV-2). O potencial antioxidante observado foi associado aos grupos de substâncias com possível ação antimicrobiana observadas pela realização de bioautografias. A mistura de AAI e AA II



e o espatulenol, substâncias que foram isoladas dos extratos de *A. cymbifera* não mostram ação antioxidante.

### ABSTRACT

The Brazilian “flora” characterized by its high diversity has a great therapeutic potential focused to a great number of diseases and organism disturbs. This unique aspect is a result of the constant interaction among plants and environment along the evolutive process, which cause the production of different special metabolites with many properties. This study evaluated the antimicrobial activity of extract from *A. cymbifera* Mart. & Zucc, a plant used on traditional treatment of several infections mainly as aqueous (tea) and ethanolic “cachaça” extracts. After the antimicrobial screening of the fractions obtained by liquid:liquid partitions of ethanolic crude extract with hexane, dichloromethane and ethyl acetate, was observed the increase of dichloromethane fraction activity. An active sample against MRSA containing aristolochic acid I and II (AA I and AA II), was obtained from the dichloromethane fraction. After separation AA I exhibited antimicrobial action against MRSA (250 µg/ml microbiostatic effect and 500 µg/ml, microbiocidal action). These substances were not associated to the antifungal activities of dichloromethane fraction. The obtainment of a hexane crude extract made possible the extraction of active compounds without aristolochic acid presence. The sesquiterpene spathulenol isolated from this extract was active against MRSA (250 µg/ml microbiostatic effect and 500 µg/ml, microbiocidal action). All samples were active against Herpes Simplex Virus type 1, except dichloromethane fraction and aqueous crude extract, but all of them were not active against Herpes Simplex Virus type 2. The antioxidant potential observed was associated to substances groups with possible antimicrobial action showed by bioautograph. The AA I, AA II and spathulenol isolated of *A. cymbifera* were not related to antioxidant properties.

## ABREVIATURAS

**AA I** – ácido aristolóquico I.

**AA II** – ácido aristolóquico II.

**AcOEt** – acetato de etila.

**BHI** – Brain Heart Infusion.

**CG-EM** – Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

**CMI** – Concentração Mínima Inibitória.

**CMNT** – Concentração Máxima não Tóxica.

**DMSO** – Dimetil Sulfóxido.

**DPPH** - 1,1-difenil-2-picrilhidrazila.

**EBA** – Extrato bruto aquoso.

**EBE** – Extrato bruto etanólico.

**EBH** – Extrato bruto hexânico.

**HSV-1** – Herpes Simplex Vírus tipo 1.

**HSV-2** – Herpes Simples Vírus tipo 2.

**MEM-Eagle** – Meio Essencial Mínimo de Eagle.

**MeOH** – metanol.

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

**MTT** – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio.

**NCCLS** – National Committee for Clinical Laboratory Standards.

**PI** – Percentual de Inibição.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações.....	31
<b>Tabela 2</b> – Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto etanólico, fase diclorometânica e ácido aristolóquico I.....	38
<b>Tabela 3</b> – Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto hexânico e espatulenol.....	46
<b>Tabela 4</b> - Perfil de atividade antiviral frente a HSV-1 e HSV-2.....	50

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 1</b> – Processo de obtenção dos extratos brutos hexânico, etanólico e aquoso.....	18
<b>Esquema 2</b> – Processo de partição líquido:líquido do extrato bruto etanólico de <i>Aristolochia cymbifera</i> Mart & Zucc.....	24
<b>Esquema 3</b> – Etapas principais do fracionamento da Fase diclorometânica.....	33
<b>Esquema 4</b> – Etapas principais do fracionamento do extrato bruto hexânico.....	42

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Comparação entre a Fração 7 e padrão de ácido aristolóquico por cromatografia em camada fina.....	34
<b>Figura 2</b> – Análise da Fração 7 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	35
<b>Figura 3</b> – Fracionamento da mistura de AA por CLAE em escala semipreparativa.	36
<b>Figura 4</b> – Determinação da CMI de AAI e AAI frente à MRSA.....	36
<b>Figura 5</b> – Estudo do efeito microbiocida e microbioestático de AAI frente à MRSA.....	38
<b>Figura 6</b> – Bioautografia dos extratos brutos hexânico e etanólico e frações ativas semipurificadas.....	39
<b>Figura 7</b> – Avaliação da atividade anti-MRSA das frações obtidas ao longo do fracionamento do extrato bruto hexânico.....	43
<b>Figura 8</b> – Bioautografia da Fração 50-55 eluída ao longo do fracionamento do extrato bruto hexânico.....	43
<b>Figura 9</b> – Análise da Fração 50-55 por CG-EM.....	44
<b>Figura 10</b> – Determinação da CMI da substância isolada espatulenol frente à MRSA.....	45
<b>Figura 11</b> – Estudo do efeito microbiocida e microbioestático do espatulenol frente à MRSA.....	47
<b>Figura 12</b> – Estudo do potencial antioxidante.....	52

## SUMÁRIO

<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	1
<b><u>Uso de plantas com finalidade terapêutica</u></b> .....	1
<b><u>A Planta em Estudo: Aristolochia cymbifera</u></b> .....	4
<b><u>Alguns Componentes Bioativos de Origem Vegetal</u></b> .....	6
<b><u>Aspectos Gerais das Infecções Microbiana</u></b> .....	8
<b><u>Relevância das Infecções Virais</u></b> .....	12
<b><u>Atividade Antioxidante de Plantas</u></b> .....	13
<b><u>Justificativa</u></b> .....	15
<b><u>Objetivo Geral</u></b> .....	16
<b><u>Objetivos específicos</u></b> .....	16
<b><u>MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	17
<b><u>Origem da Planta</u></b> .....	17
<b><u>Obtenção dos Extratos Brutos</u></b> .....	17
<b><u>Testes de Atividade Antimicrobiana</u></b> .....	18
<u>Microrganismos</u> .....	18
<u>Condições de Cultivo</u> .....	19
<u>Técnicas de Difusão em Ágar</u> .....	19
“Drop Test”.....	19
“Spot Test”.....	20
<u>Concentração Mínima Inibitória (CMI)</u> .....	21
<u>Avaliação do Efeito Microbioestático e Microbiocida</u> .....	21
<u>Bioautografia</u> .....	22
<b><u>Técnicas de Fracionamento</u></b> .....	23
<u>Cromatografia em Camada Fina</u> .....	23
<u>Partição Líquido:Líquido</u> .....	23
<u>Cromatografia em Coluna Aberta</u> .....	24

<b><u>Identificação dos bioativos antimicrobianos nos extratos: EBH e EBE</u></b> .....	25
<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i> .....	25
<i>Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas – CG/EM</i> .....	25
<b><u>Avaliação do Perfil de Atividade Antiviral</u></b> .....	26
<b><u>Cultura de Células</u></b> .....	26
<b><u>Amostras de Vírus Utilizadas</u></b> .....	26
Determinação da <u>Concentração Máxima Não Tóxica - CMNT</u> .....	27
<u>Teste de Atividade Antiviral</u> .....	27
<b><u>Avaliação do Potencial Antioxidante</u></b> .....	28
<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b> .....	29
<b>Estudo da Atividade Antimicrobiana do extrato bruto etanólico – EBE</b> .....	29
<b>Estudo da Atividade Antimicrobiana do extrato bruto hexânico – EBH</b> .....	41
<b>Estudo da Atividade Antiviral de <i>A. cymbifera</i></b> .....	49
<b>Estudo do Potencial Antioxidante de <i>A. cymbifera</i></b> .....	51
<b><u>CONCLUSÃO</u></b> .....	53
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	54



## **INTRODUÇÃO**

### **Uso de Plantas com Finalidade Terapêutica**

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto sua própria existência, geralmente associada tanto para fins nutricionais como terapêuticos, estando sempre inserida no cotidiano de diversos povos em diferentes partes do mundo como um importante artifício na busca de uma melhor qualidade de vida (DHAR *et al.*, 1968; ESQUENAZI *et al.*, 2002; KONG *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2006).

Mesmo sem embasamento científico, a utilização de plantas foi estabelecida de modo empírico baseada em crenças populares, uma vez que se apresenta como uma fonte renovável e de fácil acesso (COWAN, 1999). Com o passar do tempo os benefícios oriundos da alimentação e tratamentos com base em plantas possibilitaram a formação de uma cultura terapêutica ao longo de gerações. Desse modo foi criado um hábito alimentar que, ao permitir a observação de efeitos benéficos, possibilitou um acúmulo de conhecimento terapêutico empírico (NEWTON *et al.*, 2002).

Diversos povos de culturas distintas, desenvolvidas ou não, conhecem e usufruem do potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças. A utilização de plantas no tratamento de infecções comuns tornou-se corriqueira desde a antiguidade e, atualmente, várias dessas plantas ditas “medicinais” ainda estão inseridas como parte de tratamentos habituais para vários males (RÍOS & RECIO, 2005). Tais enfermidades são descritas por inúmeros grupos étnicos como infecções cutâneas, disenterias e malária dentre outros tipos de infecções (DHAR *et al.*, 1968; DAHANUKAR, KULKARNI & REGE, 2000).

Por volta do Século V a.C., Hipócrates registrou cerca de 300 a 400 plantas medicinais (SCHULTES, 1978). Já no século I d.C., Dioscorides publicou *De Materia Medica*, um protótipo das atuais farmacopéias modernas. Demonstrando um profundo interesse em documentar determinadas propriedades terapêuticas presentes nas plantas, tais registros indicam uma preocupação em dominar o conhecimento referente ao poder de cura oriundo dos vegetais como uma alternativa em busca de melhor qualidade de vida (COWAN, 1999).

A descoberta de papiros datados de 1550 a.C. permitiu conhecer registros que descrevem a utilização de cerca de 700 plantas (RATES, 2001). Tal fato corresponde a um forte indício da preocupação dos homens primitivos em acumular informações relacionadas ao uso terapêutico de plantas, o que indica o nascimento de uma cultura na arte de curar a ser considerado como um dos pilares do surgimento da medicina.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional no tratamento de suas necessidades primárias de saúde, dentre os quais 85% correspondem à participação de extratos de plantas e seus princípios ativos na aplicação dessa terapia (TSHIBANGU *et al.*, 2002). Principalmente por corresponder a uma fonte renovável e de grande disponibilidade que apresenta baixo custo e boa acessibilidade, aproximadamente 75 a 90% da população rural, em escala global, utiliza a fitoterapia como a principal alternativa de cura para uma série de enfermidades (KONG *et al.*, 2003).

Atualmente o interesse na descoberta de novas drogas vem sendo ampliado, especialmente no que se refere aos produtos vegetais com potencialidades terapêuticas (MACHADO *et al.*, 2005). Indústrias farmacêuticas de grande porte demonstram interesse em investigar componentes vegetais como fonte de novas substâncias ativas e também no desenvolvimento de agentes fitoterápicos com eficácia, segurança e

qualidade asseguradas (CALIXTO, 2000; MACHADO *et al.*, 2005). Também é válido ressaltar a importância prioritária do emprego dos mesmos critérios de qualidade utilizados na produção de medicamentos sintéticos. Com base nisso, a descrição dos principais componentes ativos presentes em uma planta, associada aos testes toxicológicos e controle de qualidade eficiente, podem ser descritos como procedimentos adequados à padronização de fitoterápicos em geral (WAGNER, 1997).

Cerca de 12% da área terrestre do planeta é coberta por florestas tropicais, onde concentram-se 60% das espécies de plantas presentes no globo. Somente cerca de 1% dessas espécies vegetais são avaliadas com base em seus potenciais farmacológicos, embora 25% de todas as drogas modernas sejam produtos de origem vegetal, seus derivados e análogos sintéticos (KONG *et al.*, 2003).

O Brasil é um país tropical conhecido mundialmente por sua ampla diversidade de fauna e de flora. O potencial bioativo vegetal estimado gira em torno de 10 a 20% das espécies de plantas do planeta. Dessa forma, o país apresenta uma flora bem diversificada que compreende, por exemplo, cerca de 56.000 espécies de Fanerógamas descritas, o que é 22% dos representantes existentes em todo o mundo (ALVES *et al.*, 2001).

Plantas medicinais têm despertado grande interesse por parte da comunidade científica por conterem componentes de grande valor terapêutico e por serem considerados uma extensa fonte de agentes quimioterápicos valiosos com potencialidade futura de aplicação prática (PANNUTI & GRINBAUM, 1995).

**A Planta em Estudo: *Aristolochia cymbifera***

A família Aristolochiaceae pertence à superordem Magnoliiflorae (*sensu* Dahlgren 1980) sendo formada por 7 gêneros (*Saruna, Asarum, Apama, Thottea, Holosttylis, Euglypha e Aristolochia*) apresentando cerca de 400 espécies distribuídas ao longo das regiões tropicais, embora algumas espécies possam ser encontradas em regiões de clima subtropical ou até mesmo temperado (KELLY & GONZÁLEZ, 2003). O gênero *Aristolochia* compreende aproximadamente 300 espécies, das quais cerca de 90 são brasileiras, constituídas por ervas anuais, trepadeiras, com distribuição predominantemente tropical (LEITÃO & KAPLAN, 1992).

Diversos estudos envolvendo os integrantes desse gênero têm sido desenvolvidos com base em uma série de abordagens do potencial terapêutico, sendo importante ressaltar: avaliação da atividade antibacteriana (GADHI *et al.*, 2001; CAMPORESE *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005), atividade antioxidante (VELÁZQUEZ *et al.*, 2003), atividade antiinflamatória (SOUSA *et al.*, 2002) e atividade anti-*Trypanossoma cruzi* (ABE *et al.*, 2002). *A. cymbifera* é pouco descrita na literatura especializada em estudos de elucidação de componentes com atividade antimicrobiana, sendo válido citar apenas a atividade antibacteriana frente a MRSA que foi atribuída à presença do diterpeno ácido 2-oxo-populifólico (MACHADO *et al.*, 2005).

Popularmente *A. cymbifera* é conhecida por diversos nomes, dentre eles: cassau, jarrinha, cipó-milhomem, papo-de-peru, dentre outros. Embora amplamente utilizada na medicina popular, há alguns produtos do seu metabolismo descritos como sendo tóxicos (ZHOU *et al.*, 2004). Com base nessas informações torna-se de grande interesse um estudo mais aprofundado da planta visando o esclarecimento dos reais perigos da utilização de seus produtos em terapias em geral, uma vez que o desconhecimento de

componentes tóxicos presentes em qualquer planta utilizada para um dado tratamento pode representar grande risco à saúde do usuário (KONG *et al.*, 2003).

A espécie em questão, assim como outros integrantes do gênero *Aristolochia*, são descritos como produtores de um metabólito secundário conhecido como ácido aristolóquico (AA), amplamente estudado e descrito na literatura por demonstrar acentuada ação tóxica aos rins e fígado (ZHOU *et al.*, 2004). Esses metabólitos são estruturalmente de natureza nitrofenantrênicas (LEITÃO & KAPLAN, 1992; IOSET; RAOELISON & ROSTETTMANN, 2003) e os principais representantes são o AAI e o AAI, além de ser muito comum a sua presença acompanhada das lactamas correspondentes, aristolactamas. Essas substâncias relacionadas são associadas a um potencial altamente mutagênico, uma vez que possuem grande afinidade pelas bases nitrogenadas guanina e adenina, culminando em uma propriedade degradativa do DNA, contribuindo para formação de neoplasias (KOHARA *et al.*, 2002). Tal fato mais uma vez ressalta a grande importância do estudo em questão, já que essa planta está bem popularizada na medicina tradicional e seus reais efeitos benéficos, ou até mesmo deletérios, ainda não são conhecidos em sua totalidade devido à ausência de embasamento científico.

A necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e o baixo número de citações científicas referentes à *A. cymbifera*, apesar de seu potencial bioativo, estimulam o estudo mais aprofundado dessa espécie visando uma aplicação futura de seus componentes de modo eficaz e seguro para o usuário.

### Alguns Componentes Bioativos de Origem Vegetal

As Plantas produzem uma infinidade de substâncias das mais variadas classes, podendo ser responsáveis por suas funções bioquímicas e, em muitos casos, associados à sua defesa contra os patógenos presentes no meio ambiente (WOJTASZEK, 1997; ESQUENAZI *et al.*, 2002).

O metabolismo vegetal pode ser descrito como primário ou secundário. O primário considera os processos essenciais à vida e são comuns aos seres vivos, tais como processos bioquímicos associados à sua nutrição. Já o secundário, compreende a produção de substâncias que conferem vantagens adicionais à sobrevivência no ambiente podendo garantir a perpetuação da espécie, principalmente por relacionar-se a aspectos mais específicos a grupos de plantas (SIMÕES *et al.*, 2004).

Em parte, a ocorrência de grande variedade de substâncias produzidas por plantas pode ser explicada com base em sua interação com o meio ambiente. Principalmente por não se deslocarem, tal fenômeno ocorre via interações químicas que são desempenhadas principalmente por produtos resultantes de seu metabolismo secundário. Essa riqueza de substâncias pode ser explicada devido a evolução natural influenciada pela constante interação dos vegetais com as condições estabelecidas por fatores bióticos e abióticos (HARBONE, 1973; WALLACE, 2004).

Uma série de classes de substâncias químicas pode ser resultante do metabolismo secundário das plantas e compreende produtos de diversas naturezas. Dentre as principais classes de metabolitos especiais encontrados em plantas podem ser destacadas: Alcalóides, Terpenóides, Taninos, Saponinas e Flavonóides, dentre muitas

outras descritas na literatura responsáveis pelas mais variadas atividades biológicas (COWAN, 1999).

Os alcalóides podem ser compreendidos como substâncias orgânicas naturais que contêm um ou mais átomos de nitrogênio, podendo apresentar-se de formas variadas. Estudos com base na composição química e nos aspectos estruturais dos alcalóides consideram a classe dividida em diversos grupos, dentre eles: alcalóides indólicos, quinolínicos, piridínicos, piperidínicos, esteroídicos, derivados do triptofano e da fenilalanina, entre muitos outros (KARIBA *et al.*, 2002). A morfina apresenta-se como um dos primeiros alcalóides utilizados na medicina, tendo sido isolada em 1805 do ópio de *Papaver somniferum*. Seu nome é uma referência ao deus grego do sono Morpheus (FESSENDEN & FESSENDEN, 1982).

Os terpenos em geral denotam uma grande variedade estrutural e possuem como constituintes de sua estrutura básica unidades isoprênicas (COWAN, 1999). Essas substâncias representam os principais constituintes dos óleos voláteis de plantas (Óleos Essenciais), e são classificadas como mono-, sesqui-, di-, tri- e tetraterpenos. O óleo essencial de *A. cymbifera*, obtido por arraste com vapor d'água, é rico em sesquiterpenos além de outras substâncias tais como: n-undecano (17,7%) e n-dodecano (12,4%) (LEITÃO *et al.*, 1991). Também foi registrada para a planta a presença de diterpenos do tipo clerodano, como os ácidos 2-oxo-populifólico e epi-populifólico, que foram descritas inicialmente por Leitão e colaboradores (1992) e, posteriormente foi atribuída ao ácido 2-oxo-populifólico a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (MACHADO *et al.*, 2005).

Flavonóides são substâncias fenólicas que podem ocorrer em diferentes tipos estruturais, tais como: flavonóis, flavonas, isoflavonas, dentre outros (SIMÕES *et al.*, 2004). A atividade antimicrobiana dos flavonóides geralmente está relacionada à sua

capacidade de se complexar tanto com proteínas extracelulares e solúveis quanto com parede celular de bactérias em geral. Os flavonóides são bem descritos como produtos antioxidantes (COWAN, 1999). Espécies do gênero *Aristolochia* são produtoras de flavonóides onde se destaca a isorhamnetina-3-O-robinobiosídeo isolado de *A. indica*, o qual foi descrito pela primeira vez no gênero (MIZUNO *et al.*, 1990).

As saponinas em geral são substâncias muito comuns nas plantas. Do ponto de vista químico, caracterizam-se pela presença de um grupo glicosídeo ligado a uma aglicona. A sua propriedade principal é reduzir fortemente a tensão superficial da água, sendo assim, as saponinas constituem excelentes emulsificantes (KHAN, KIHARA & OMOLOSO, 2000).

Os taninos são outros produtos de espécies da família Aristolochiaceae, possuem composição variável e apresentam uma característica comum: a capacidade de precipitar proteínas, complexar metais pesados e alcalóides. São quimicamente definidos como polifenóis, podendo ser condensados, hidrolisados ou mistos (COWAN, 1999; ESQUENAZI *et al.*, 2002). A atividade antimicrobiana desses polifenóis frente a *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Fonsecaea pedrosoi* e Herpes Simplex Vírus tipo I e II já foi bem descrita (ESQUENAZI *et al.*, 2002).

### **Aspectos Gerais das Infecções Microbianas**

O dramático aumento do índice de resistência aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado é um crescente problema de saúde pública (CHOPRA *et al.*, 1996; BAQUERO, 1997). Tal fato compõe um cenário em que os constantes avanços dos conhecimentos científicos, médicos e tecnológicos ainda não impedem de forma



eficaz a progressão das doenças infecciosas como causa mundial de morbidade e mortalidade (MOELLERING *et al.*, 2007).

A constante demanda por novos agentes antimicrobianos tem estimulado a pesquisa de substâncias capazes de tratar as infecções resistentes aos agentes antimicrobianos disponibilizados atualmente no mercado, muitas vezes associada ao uso incorreto de antibióticos (NOSTRO *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2003).

Microrganismos são conhecidos principalmente por sua capacidade genética intrínseca de adquirir resistência aos mais diversos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções, particularmente destacando-se as bactérias Gram-negativas. A membrana mais externa desses microrganismos constitui uma barreira de permeabilidade que dificulta a penetração de substâncias antimicrobianas polares e permite a passagem de produtos com caráter mais lipofílico (TEGOS, STERMITZ & LOMOVSKAYA, 2002).

As infecções fúngicas e bacterianas constituem atualmente um grande problema médico-social o que aumenta consideravelmente o interesse pela micologia e bacteriologia médicas. O aumento significativo de pacientes portadores de imunodeficiências adquiridas (HIV-positivo) e induzidas (terapias imunossupressoras) contribui consideravelmente para a consolidação desse quadro (BURIK & MAGEE, 2001).

O primeiro antibiótico utilizado como substância isolada foi a penicilina, em 1942, o que possibilitou a cura de diversas infecções comuns e ampliou o horizonte na descoberta de agentes antimicrobianos. Atualmente não há uma terapia totalmente eficaz contra todos os tipos de infecções e a descoberta de novos agentes antimicrobianos é de extrema necessidade (MARQUES-SANTOS *et al.*, 1999).

O processo infeccioso bacteriano abrange desde a etapa de transmissão, reconhecimento superficial e adesão às células do hospedeiro como eventos iniciais, até processos mais avançados como invasão celular e/ou tecidual e evasão do sistema imunológico do indivíduo infectado (MACHADO *et al.*, 2003).

Com o aumento da prevalência de bactérias resistentes a muitas drogas, a busca por produtos naturais originados de plantas com potencial terapêutico oferece uma alternativa viável no combate às infecções de difícil tratamento (COWAN, 1999). Além disso, pesquisadores em diversos campos da ciência estão desenvolvendo estudos que visem a elucidação do potencial terapêutico presente nas plantas. O aspecto interdisciplinar dos grupos de estudo possibilita obtenção de produtos farmacológicos com maior rapidez e segurança por agilizar o desenvolvimento de cada etapa do estudo (AHMAD, AQIL & OWAIS, 2007).

Na última década do século XX foi observado um grande aumento no número de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), tanto em unidades hospitalares quanto em comunidades (SANTOS *et al.*, 1999). No caso do MRSA, o tratamento restringe-se apenas ao uso do antimicrobiano vancomicina (BOYCE, 1992), ressaltando que já são registrados casos de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (HIRAMATSU, 1998; MACHADO *et al.*, 2005).

Estima-se que mais de 60% dos problemas de saúde associados às infecções em ambiente hospitalares nos Estados Unidos estão relacionados aos microrganismos *Staphylococcus* Coagulase-Negativa (CoNS), *S. aureus* e espécies de *Enterococcus*, em que 89,1% dos CoNS e 59,5% de *S. aureus*, isolados em Unidades de Terapia Intensiva, foram resistentes à meticilina enquanto 28,5% das espécies de *Enterococcus* encontrados demonstraram resistência à vancomicina. Portanto, é válido ressaltar que no período entre 1992 e 2002 ocorreu um aumento de 36% para 62% da prevalência de

MRSA em Unidades de Terapia Intensiva nos EUA (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; MCDONALD, 2006).

Tendo em vista o aumento de casos de infecções associadas à MRSA tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários, estima-se que com o maior uso de vancomicina na terapia antimicrobiana desses agentes possa ser possível o surgimento cada vez maior de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). Evidências descritas na literatura demonstram a transferência *in vivo* dos genes de resistência à vancomicina de *Enterococcus* sp. para *S. aureus* (CRAVEN & SHAPIRO, 2006).

Infecções fúngicas sistêmicas são constantemente associadas aos casos de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados. Embora haja diferentes patógenos fúngicos, os integrantes do gênero *Candida* continuam sendo uma causa cada vez mais comum de infecções fúngicas em ambientes hospitalares em que até 40% dos casos de candidíase invasiva não respondem ao tratamento antifúngico utilizado (GUDLAUGSSON, GILLESPIE & LEE, 2003; OSTROSKY & PAPAS, 2006).

Existem aproximadamente 50.000 espécies de fungos, em grande parte benéficas ao homem, por atuarem na degradação e reciclagem de matéria orgânica e também por serem utilizados como modelos experimentais na pesquisa de variados processos eucarióticos. Entretanto, além do impacto econômico como fitopatógenos (HOSTETTER, 1998), diversas espécies são agentes etiológicos de intoxicações, micotoxicoses e micoses, sendo a última dividida em superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e até mesmo oportunistas (HOGAN, KLEIN & LEVITZ, 1996; GRAYER & KOKUBUN, 2001).

De modo geral, a resistência aos agentes antifúngicos disponíveis atualmente e aos antibióticos apresenta-se como um dos principais aspectos que dificultam o tratamento de doenças infecciosas associadas a esses agentes microbianos. Tal fato dificulta em

muito a abordagem clínica no tratamento dessas infecções e os procedimentos de determinação do perfil de resistência realizado na rotina de laboratório de análise clínica (SCHMOURLO *et al.*, 2005).

A dificuldade no tratamento das infecções, utilizando os agentes antifúngicos, e os demais agentes antimicrobianos, pode ser compreendida como um processo multifatorial dependente de aspectos dos quais destacam-se a difusão incompleta em determinados tecidos, como no caso de abscesso cerebral ou de tecido hepático afetados; absorção incompleta pelo organismo da substância utilizada; fortes associações às proteínas do organismo; ou até mesmo a rápida eliminação que dificulta a manutenção do efeito do agente antimicrobiano. Indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do HIV, são mais propensos às infecções por patógenos oportunistas que desencadeiam processos infecciosos devido a deficiência das defesas do organismo a julgar que a maioria desses microrganismos já está presente na microbiota do indivíduo (MOELLERING *et al.*, 2007).

### **Relevâncias das Infecções Virais**

Desde os tempos antigos lesões do tipo herpéticas têm sido relatadas na Grécia, por Hipócrates, e em Roma, por Herodotus (WILD & WATSON, 1963), sendo atualmente os herpesvírus (família *Herpesvirinae*) disseminados na natureza, infectando de insetos a mamíferos. Cerca de oito herpesvírus humanos já são descritos, dentre os 130 já caracterizados no reino animal. O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2) estão classificados na subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Simplexvirus*, sendo estes dois os de maior importância clínica apresentando

elevada incidência de infecções virais dentre os integrantes da família (ROIZMAN & PELLETT, 2001).

Tanto o HSV-1 quanto o HSV-2 causam infecções com lesões recorrentes. Geralmente o HSV-1 está associado com infecções labial e o HSV-2 com infecção genital. Entretanto, é possível o HSV-2 causar herpes labial e o HSV-1, herpes genital (LAFFERTY *et al.*, 2000; STRUTT *et al.*, 2003).

Embora atualmente o impacto social resultante da infecção labial causada por HSV-2 seja pequeno, há indícios de que ocorre o aumento do número de casos de herpes genital causados por HSV-1. Já foi visto que em alguns países da Europa, o HSV-1 já se tornou o principal agente causador de herpes genital. Porém a infecção genital causada pelo HSV-1 apresenta-se como uma manifestação clínica menos grave e associada a um menor número de recorrências quando comparada à infecção causada pelo HSV-2 (WALD *et al.*, 2002).

De modo geral, a soroprevalência do HSV-1 é superior a do HSV-2, excetuando-se as populações determinadas como sendo de risco, como HIV positivos e pessoas com comportamento sexual promíscuo, por exemplo (LOOCKER & GARNETT, 2005).

### **Atividade Antioxidante de Plantas**

O estudo de radicais livres na biologia tem despertado grande interesse, uma vez que desempenham um papel importante na ocorrência de diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, algumas formas de câncer, processos inflamatórios e distúrbios neurodegenerativos (MAXWELL, 1995). Em organismos aeróbios, lipídeos contendo ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos podem ser oxidados via reações mediadas por radicais livres (RAMOS *et al.*, 2003).

Quando o oxigênio é fornecido em excesso ou sua redução é insuficiente, espécies reativas de oxigênio (ERO) como superóxidos, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio são gerados. As ERO podem atacar e lesar diversas moléculas e estruturas biológicas importantes como proteínas, DNA e membranas, induzindo a ocorrência de diversas doenças. Radicais livres são produzidos ao longo do metabolismo e removidos pelo sistema de defesa enzimático e não enzimático (HALLIWEL, GUTTERIDGE & CROSS, 1992). Porém, o stress oxidativo resultante de um sistema de defesa antioxidante inadequado causa inúmeros danos teciduais. Nesse contexto, substâncias com múltiplos mecanismos de ação, incluindo propriedades antioxidantes, podem contribuir para minimizar danos ao organismo causados por radicais livres (BARRY, 1991).

De modo geral plantas medicinais com propriedades antioxidantes ainda não são bem exploradas cientificamente, mas o seu potencial como fonte natural de substâncias antioxidativas tem despertado grande interesse. A procura por novos compostos que atuem na proteção química da oxidação de moléculas biologicamente importantes se mostra como um campo promissor da fitoterapia a ser explorado (RAMOS *et al.*, 2003). Recentemente, o extrato alcoólico de *Aristolochia cymbifera* analisado pelo método colorimétrico de DPPH exibiu potente ação antioxidante (ALVIANO *et al.*, 2008).

## **Justificativa**

O constante aumento de casos de resistência aos agentes antimicrobianos existentes restringe cada vez mais as possibilidades de tratamento das infecções causadas por microrganismos, elevando cada vez mais os custos com tais terapias. Este cenário contrasta com todo o avanço científico da atualidade ainda incapaz de impedir o destaque das doenças infecciosas como importante causa de morbidade e de mortalidades de pacientes em nível mundial. O Brasil, concentrando grande parte da diversidade biológica global, corresponde a um potencial imenso e eficaz de substâncias com atividades biológicas, muitas delas já utilizadas popularmente contra uma série de enfermidades que, em sua maioria, são doenças infecciosas. Uma vez que grande parte dessas infecções são resultantes da ação de microrganismos resistentes à maioria dos produtos disponibilizados atualmente, estudos direcionados a elucidação de novas substâncias antimicrobianas são necessários. Tais esforços tornariam possível a obtenção de novos produtos terapêuticos úteis ao tratamento dessas infecções, além de tornar o uso empírico dessas plantas mais seguro e eficaz.

## **Objetivo Geral**

O desenvolvimento do presente estudo visa avaliar a atividade antimicrobiana, antiviral e antioxidante da espécie *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc e confirmar o seu uso empírico frente a microrganismos de importância clínica, além da obtenção de substâncias ativas.

## **Objetivos Específicos**

- Obter extratos brutos e frações semipurificadas de *Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos brutos e de frações de *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc frente aos microrganismos testados;
- Observar o perfil de atividade antimicrobiana das frações obtidas por meio de fracionamento acompanhado por testes de avaliação de atividade antimicrobiana;
- Isolar e identificar a(s) substância(s) ativa(s) a partir dos extratos brutos e frações semipurificadas ativos;
- Avaliar a presença do ácido aristolóquico;
- Avaliar o perfil de atividade antiviral para Herpes Simplex Vírus – HSV-1 e HSV-2 dos extratos brutos e das frações semipurificadas;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos, de frações semipurificadas e das substâncias isoladas de *A. cymbifera*.
- Obter informações inerentes ao embasamento científico ao uso popular de *A. cymbifera*;



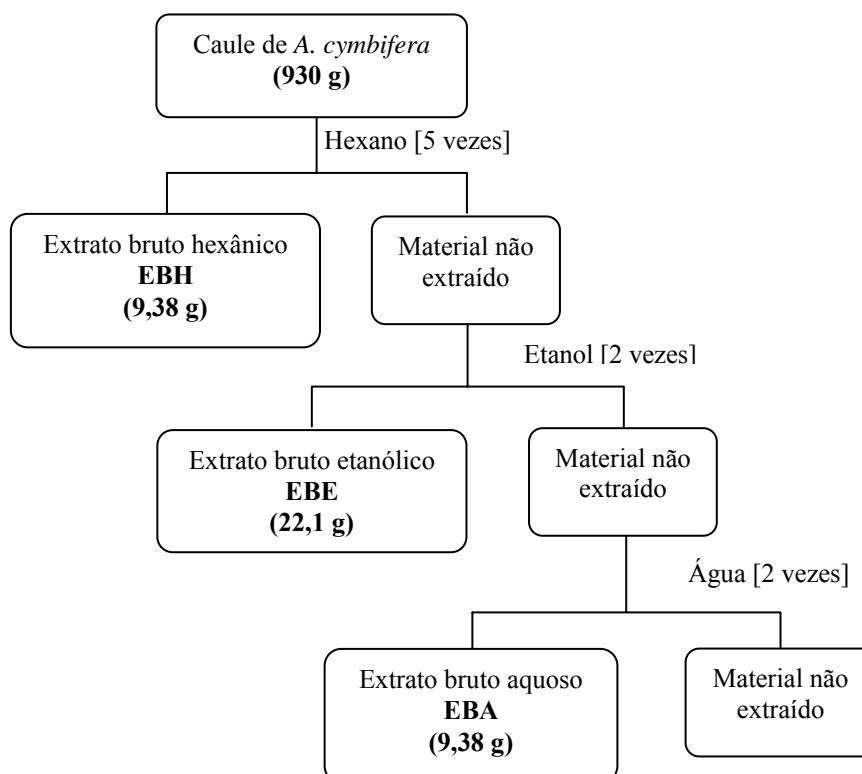
## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Origem da Planta**

A planta abordada nesta pesquisa, *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc, é caracterizada por seu hábito em cipó, sua ampla distribuição no território brasileiro e seu uso para fins terapêuticos. O órgão vegetal eleito para este estudo foi o caule, por ser a parte utilizada na medicina popular. A amostra estudada foi coletada em janeiro de 2005 e é oriunda do Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), onde foi feita também a identificação botânica.

### **Obtenção dos Extratos Brutos**

O material botânico, (930g de caule), devidamente seco foi triturado e submetido aos processos de extração por maceração estática com hexano (5 x 1,5l) e em seguida por etanol (2 x 1l). Após filtração, os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório e acondicionados em frascos bem vedados a -20°C. A seguir, foi realizada a maceração do material não extraído com água aquecida, na qual o material vegetal foi submerso em água (70°C) deixando atingir temperatura ambiente, e mantido em geladeira por 24 h. O extrato aquoso após filtração foi liofilizado e estocado a -20°C (Esquema 1).



**Esquema 1** – Processo de obtenção dos extratos brutos hexânico, etanólico e aquoso.

### Testes de Atividade Antimicrobiana

#### Microrganismos

Vários microrganismos de importância médica foram utilizados nos testes para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *A. cymbifera*: **1) Bactérias Gram positivas** - *Staphylococcus aureus* MRSA (BMB9393) (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ); *Lactobacillus casei* isolado clínico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ; *Streptococcus mutans* isolado clínico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ; **2) Bactérias Gram negativas** - *Escherichia coli* isolado clínico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho **3) Fungos leveduriformes** - *Candida albicans* Sorotipo B ATCC 36802; *Cryptococcus*

*neoformans* T<sub>1</sub>-444 Sorotipo A - isolado clínico (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-SP); **Fungos filamentosos** - *Fonsecaea pedrosoi* amostra 5VPL, isolado clínico (Universidade Federal de Minas Gerais) e *Trichophyton rubrum* isolado clínico (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho).

### Condições de Cultivo dos Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana foram cultivados seguindo as seguintes condições: as bactérias *S. aureus* MRSA, *L. casei*, *E. coli* e *S. mutans* foram cultivados em meio infusão de cérebro e coração (BHI) contendo agar, a 37°C por 24 horas, sendo apenas *S. mutans* mantido em condições de anaerobiose. Os fungos *C. albicans*, *C. neoformans* foram cultivados em meio Sabouraud agar e mantidos a temperatura ambiente por 24 a 48 horas, já os fungos *F. pedrosoi* e *T. rubrum* foram cultivados em meio Sabouraud agar a temperatura ambiente por 7 a 10 dias.

### Técnicas de Difusão em Agar

#### “Drop Test”

A atividade antimicrobiana de cada amostra, extrato bruto e frações, foi determinada por meio da Técnica de Difusão em Agar, que consiste em adicionar (10µl) da amostra diretamente na superfície do meio de cultura previamente inoculado com o microrganismo teste de modo confluyente. Após o período de incubação, 24h (bactérias) e 48h (fungos leveduriformes) e 72h (fungos filamentosos), o diâmetro dos halos correspondentes à inibição do crescimento microbiano foram medidos e devidamente

registrados (HILI, EVANS & VENESS, 1997). Como controle positivo das bactérias utilizamos Vancomicina (1 mg/ml) e para fungos a Anfotericina B (1 mg/ml), sendo aplicado o volume de 10 µl.

Os extratos aquosos foram adicionados diretamente na superfície do meio, enquanto os extratos brutos hexânico e etanólico, assim como as frações orgânicas foram ressuspensos inicialmente em DMSO e diluídos (1:3) em água destilada estéril antes de serem aplicados na superfície do meio, para assegurar a não interferência do diluente na formação do halo de inibição microbiana. A realização do controle com o DMSO mostrou que não há interferência no crescimento microbiano.

#### “Spot Test”

Ao longo das etapas de fracionamento, as frações obtidas foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana por meio desta técnica. Tal procedimento consiste em aplicar em um ponto marcado da superfície de uma placa de gel de sílica 5 µl da fração concentrada cerca de 10x. Uma vez o solvente da amostra ter sido evaporado, a mesma é exposta a radiação UV em fluxo laminar por 15 min e meio de cultivo contendo ágar previamente inoculado com o microrganismo (de acordo com as condições de cultivo) em questão é vertido sobre a placa de sílica. Após período de incubação, o halo de inibição observado sobre a área em que a amostra foi aplicada indica atividade da fração. Para uma melhor visualização do halo de inibição a superfície do meio é revelada com um corante de viabilidade celular, o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - (MTT) na concentração de 3mg/ml. Essa técnica possibilitou avaliar a atividade antimicrobiana de amostras obtidas ao longo do processo de fracionamento solubilizadas em solventes orgânicos.

### Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Após estabelecido o perfil de atividade antimicrobiana, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos brutos e das frações foi determinada. A CMI é definida como a menor concentração da substância capaz de inibir todo o crescimento do microrganismo empregado no teste, permitindo uma avaliação quantitativa do seu potencial antimicrobiano.

O procedimento foi realizado com base nas normas NCCLS – M7-A6, M11-A6, M27-A2 e M38-A que consiste em incubar as amostras em diluições seriadas em uma concentração padronizada do inóculo ( $10^5$  células/ml). Os meios de cultivo utilizados foram: Caldo Muller-Hinton para bactérias, RPMI para fungos leveduriformes e Caldo Saboureaud quando utilizados fungos filamentosos. Os seguintes controles são realizados: controle negativo do meio de cultivo (Meio puro), controle positivo do inóculo (microrganismos + Meio). O período de incubação é de 24h (bactérias), 48h (fungos leveduriformes) e 72h (fungos filamentosos). A temperatura de incubação foi de 37°C para bactérias e temperatura ambiente para fungos. A leitura foi realizada visualmente e confirmada com a adição de um indicador de viabilidade celular (Resazurina a 0,005% em PBS pH 7,0). Todos os testes foram realizados em duplicata.

### Avaliação do Efeito Microbioestático e Microbiocida

Paralelamente à determinação da Concentração Mínima Inibitória, também foi investigado se a concentração apenas inibia o crescimento do microrganismo (efeito microbiostático) ou se sua ação ocasionava um efeito de inviabilização total do crescimento do microrganismo (microbiocida). O procedimento consiste em reincubar

em meio de cultivo estéril as concentrações do teste de CMI onde não foi observado crescimento microbiano, as concentrações maiores e iguais a CMI. A menor concentração que não exibir nenhum crescimento corresponde a concentração que apresenta efeito microbicida. Ao realizar este procedimento torna-se possível observar se a CMI apenas inibiu o crescimento do microrganismo ou se de fato demonstrou efeito microbicida.

### Bioautografia

Inicialmente é realizada uma cromatografia em camada fina, onde os componentes são separados com base em sua afinidade com o sistema solvente utilizado que é descrito ao longo dos resultados. Após o solvente ter sido evaporado da placa de sílica, a mesma é exposta à radiação UV por cerca de 20 min para assegurar descontaminação, sendo esta posicionada dentro de uma Placa de Petri estéril onde é vertido meio de cultura (BHI – ágar) ainda no estado líquido (45°C) previamente inoculado com o microrganismo teste. Após período de incubação, específico para cada microrganismo, a região onde ocorrer o halo de inibição do crescimento microbiano é comparada com a placa espelho (duplicata) revelada como descrito na técnica. Sendo assim torna-se possível elucidar a região cromatográfica correspondente à substância responsável pela inibição do crescimento microbiano (SAXENA *et al.*, 1995 e NOSTRO *et al.*, 2000). Para uma melhor visualização do halo de inibição foi utilizado um corante de viabilidade celular, o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - (MTT) na concentração de 3mg/ml.

## Técnicas de Fracionamento

Todas as etapas de fracionamento dos extratos brutos e frações foram direcionadas tendo como base o perfil de atividade biológica. O emprego em conjunto de técnicas analíticas para avaliação de bioatividade e do perfil químico viabilizou a elucidação de substâncias bioativas presentes nos extratos e frações.

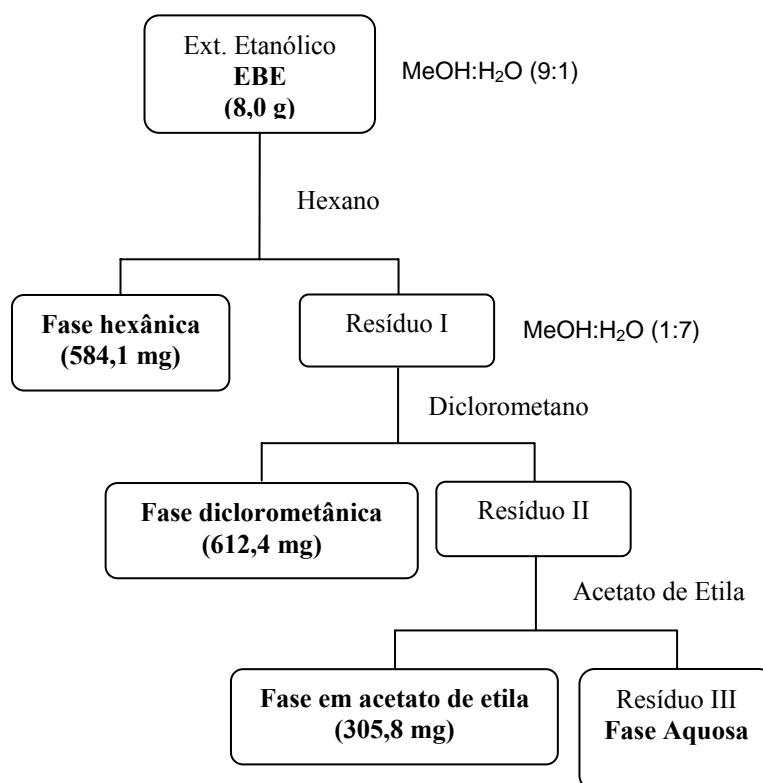
### Cromatografia em Camada Fina

Após ser aplicada a amostra (extrato bruto ou fração) na placa cromatográfica de gel de sílica a 1,0 cm da base (Sílica G60 F<sub>245</sub> - Merck), a cromatografia é desenvolvida de modo a promover a separação de seus componentes. As placas foram observadas sob radiação UV e reveladas com anisaldeído sulfúrico (17 ml de metanol, 2 ml ácido acético, 1 ml de ácido sulfúrico e 0,1 ml de anisaldeído) para observar a distribuição das substâncias ao longo do campo cromatográfico. Os diversos sistemas solventes são descritos ao longo da apresentação dos resultados.

### Partição Líquido:Líquido

Partições líquido:líquido entre água e solventes orgânicos foram desenvolvidas, em funil de decantação, objetivando a obtenção de frações semi-purificadas do extrato bruto etanólico (EBE). O EBE foi inicialmente suspenso em MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1) e então extraído com hexano (Fase hexânica). Posteriormente, todo o material não extraído foi evaporado, ressuspenso em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:7) e extraído sequencialmente com diclorometano (Fase diclorometânica) e acetato de etila (Fase em acetato de etila)

(Esquema 2). Após a evaporação dos respectivos solventes em evaporador rotatório, as frações obtidas foram pesadas e avaliadas quanto o seu perfil de atividade biológica.



**Esquema 2** – Processo de partição líquido:líquido do extrato bruto etanólico de *Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc com solventes orgânicos.

### Cromatografia em Coluna Aberta

O EBH e a fração semipurificadas ativa (Fase diclorometânica) foram submetidas à cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica G60 (Merck, 70-230 mesh) utilizando-se como eluentes misturas binárias de hexano, AcOEt e MeOH em gradiente de polaridades crescentes, além dos solventes puros. As frações obtidas foram então concentradas em evaporador rotatório, avaliadas quanto sua atividade antimicrobiana e correlacionadas com o perfil de substâncias observadas através da associação entre cromatografias em camada fina e bioautografia.



## **Identificação dos bioativos antimicrobianos nos extratos: EBH e EBE**

### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Ao longo do desenvolvimento das etapas de fracionamento da Fase diclorometânica obtida do EBE, as amostras obtidas foram comparadas com um padrão de Ácido Aristolóquico por meio de cromatografia em camada fina para observar o seu possível envolvimento na ação antimicrobiana. O perfil cromatográfico da amostra ativa foi observado e comparado com um padrão de Ácido Aristolóquico (A5512 - SIGMA-Aldrich) contendo uma mistura do AA I e AA II. A avaliação foi realizada em um aparelho de cromatografia líquida modelo HP-1090, utilizando coluna RP-18 XTerra® (250mm x 4,6 mm x 5µm) e gradiente de acetonitrila (Solução B) em água (Solução A): inicialmente 20%B por 2min, 71%B até 5min, isocrático em 71%B até 8min, 72%B aos 11min, 100%B até 20min. Detector de UV ajustado em 254 nm e fluxo de 1 ml/min. O cromatograma foi obtido utilizando o integrador HP3396A.

A mistura de AA I e AA II obtida da Fase diclorometânica em questão foi separada em coluna semi-preparativa SUPELCOSIL™LC-18 (250mm x 10mm x 5µm) baseando-se as mesmas condições anteriores de gradiente de eluição e detecção, e fluxo de 4 ml/min.

### Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas – CG/EM

A fração ativa isolada por cromatografia de adsorção em gel de sílica do EBH foi analisada em cromatógrafo com fase gasosa Shimadzu QP 2010 interfaceada com espectrômetro de massas, utilizando coluna ZB-5MS, injetor a 270°C, interface de

230°C, temperatura da coluna: 60°C a 290°C (10°C/min). Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV. A identificação dos constituintes foi determinada com base na comparação do índice de retenção relativo a uma série de hidrocarbonetos, pela determinação do índice de retenção de Kovats e comparação com os espectros de massas publicados por ADAMS (2001) bem como com o banco de dados NIST21 e NIST107 da biblioteca do CG/EM.

### **Avaliação do Perfil de Atividade Antiviral**

#### Cultura de Células

Para a realização dos testes de avaliação do perfil de atividade antiviral dos extratos brutos e frações semipurificadas, foi utilizada a cultura de células Vero (fibroblasto de rim de macaco *Cercopitheccus aethiops*).

A células foram mantidas em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM-Eagle) acrescido de 0,03 mg/ml de glutamina, 50 µg/ml de gamicina, 2,5 mg/ml de fungizona, solução de bicarbonato de sódio a 0,255, HEPES 10 mM e 10% de soro fetal bovino (meio de crescimento) ou sem soro fetal bovino (meio de manutenção) e incubadas a 37°C por 48 horas.

#### Amostras de vírus utilizadas

As amostras de Herpes Simplex Vírus tipo 1 e 2 foram isoladas a partir de fluido de vesículas características de herpes labial e de lesões na genitália, respectivamente, e

pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas).

#### Determinação da Concentração Máxima Não Tóxica - CMNT

Inicialmente foi determinada a maior concentração não tóxica para a cultura de célula utilizada, célula Vero, em sistema de triplicata sendo cultivadas em microplacas de 96 poços empregando-se diluições seriadas dos extratos por 48 horas a 37°C. O efeito citotóxico foi detectado por alterações na morfologia das células quando comparadas com o controle não tratado. A Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT) foi determinada de acordo com a metodologia utilizada por Rodrigo *et al.*, 1990.

#### Teste de Atividade Antiviral

A atividade antiviral frente ao Herpes simplex Vírus tipo 1 e 2 foi avaliada pela redução do título viral em células tratadas com os extratos brutos e frações semipurificadas na CMNT quando comparadas com as células não tratadas (controle). Foi utilizada cultura de células Vero cultivadas em microplacas de 96 poços onde foram tratadas com os extratos em estudo na CMNT. Imediatamente após, a suspensão de HSV-1 e HSV-2 foram adicionadas para as culturas de células tratadas e não tratadas sendo incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas e a leitura realizada em microscópio invertido. Após a incubação, os títulos virais foram calculados com base nos métodos estatísticos de Reed & Muench (1938) e expressos como índice de inibição viral. Resultados da atividade antiviral foram expressos como percentagem de

inibição (PI) baseando-se nos valores da TCID<sub>50</sub> como segue:  $PI = [1 - (\text{teste valor} / \text{valor controle})] \times 100$  (NISHIMURA, TOKU & FUKUYASU *et al.*, 1977).

### **Avaliação do Potencial Antioxidante**

Após ter sido realizada uma Cromatografia em Camada Fina, conforme descrito anteriormente, a placa é revelada com uma solução de 0,2% de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) em metanol sendo observadas após 30 min. Regiões do campo cromatográfico correspondentes à presença de substâncias potencialmente antioxidantes ficam amareladas, em contraste com as demais áreas em que o revelador mantém sua coloração roxa sugerindo a não ação antioxidante para esses respectivos componentes (CUENDET *et al.*, 2001).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Estudos envolvendo a atividade biológica de plantas são muitas vezes direcionados com base no uso popular. Tal fato permite ao investigador em fitoquímica a oportunidade de confirmar a atividade atribuída à planta, seja de rejeitar o uso da planta ou ainda de padronizar criteriosamente seu emprego como medicamento.

Ao avaliar a atividade antimicrobiana de *A. cymbifera*, os extratos brutos etanólico e aquoso foram obtidos tendo por base sua principal forma de utilização popular, respectivamente a “cachaça” e o chá. Além disso, um importante metabólito secundário potencialmente tóxico é comum ao gênero *Aristolochia* em estudo, o ácido aristolóquico. A avaliação de sua presença é tão importante quanto a confirmação da atividade biológica da planta em estudo, seja como medicamentosa ou tóxica.

Nos testes realizados não foi observada qualquer atividade antimicrobiana para o extrato bruto aquoso (EBA) (**Tabela 1**). Sendo assim, o estudo foi direcionado a avaliação da atividade dos extratos brutos etanólico e hexânico, respectivamente, EBE e EBH.

### **Estudo da Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Etanólico - EBE**

A avaliação do potencial antimicrobiano do EBE demonstrou ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) e ao *Streptococcus mutans* ao ser avaliado por meio da técnica de difusão em agar – “Drop Test” (HILL, EVANS & VENESS, 1997), onde não foi observada ação antifúngica frente aos microrganismos testados (**Tabela 1**). Tal procedimento permitiu a avaliação apenas qualitativa do potencial antimicrobiano.

Tendo em vista o perfil de atividade antimicrobiana do EBE, frações semipurificadas foram obtidas utilizando-se etapas de fracionamento do tipo partição líquido:líquido. Foram então obtidas 4 frações: Fase hexânica, Fase diclorometânica, Fase em acetato de etila e Fase aquosa. Esses materiais ao serem submetidos à avaliação do potencial antimicrobiano mostraram ausência de atividade para as fases em acetato de etila e aquosa. A Fase hexânica apresentou uma atividade antibacteriana e antifúngica moderada, respectivamente para *Lactobacillus casei* e *Fonsecaea pedrosoi*.

A Fase diclorometânica apresentou atividade antibacteriana potencializada comparada à observada para o EBE. A visualização de um maior diâmetro do halo de inibição sugere que a atividade antimicrobiana evidenciada para o EBE é devido ao componente ativo encontrado na fase diclorometânica. Com relação a ação antifúngica, foi possível observar o potencial inibitório frente os fungos filamentosos *F. pedrosoi* e *T. rubrum*.

A obtenção de amostras semipurificadas por meio da técnica de partição líquido:líquido forneceu frações com potencial antimicrobiano diferenciado, sendo possível observar que os principais componentes ativos foram priorizados na fase diclorometânica. O emprego desta técnica de purificação parcial facilitou o processo de isolamento de componentes de extratos de plantas, principalmente por permitir a obtenção de frações com menor complexidade química contendo grupos de substâncias separados com base em seu grau de polaridade.

MICROORGANISMOS	EBA	EBH	EBE	Fase hexânica	Fase diclorometânica	Fase em acetato de etila	Fase aquosa	Anfotericina B [1 mg/ml]	Vancomicina [1 mg/ml]
<i>Staphylococcus aureus - MRSA</i>	-*	Atividade Moderada**	1,0	-	2,0	-	-	-	1,2
<i>Escherichia coli</i>	-	Atividade Moderada	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	Atividade Moderada	-	Atividade Moderada	Atividade Moderada	-	-	-	0,85
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	1,0	-	1,7	-	-	-	1,1
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	1,1	-	-	-	-	-	2,3	-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	-	Atividade Moderada	-	Atividade Moderada	0,9	-	-	1,6	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	0,8	-	-	1,65	-

**Tabela 1** – Avaliação da atividade antimicrobiana (técnica de difusão em ágar “spot test”) dos extratos brutos e frações, sendo os valores referentes ao diâmetro do halo de inibição expressos em cm.

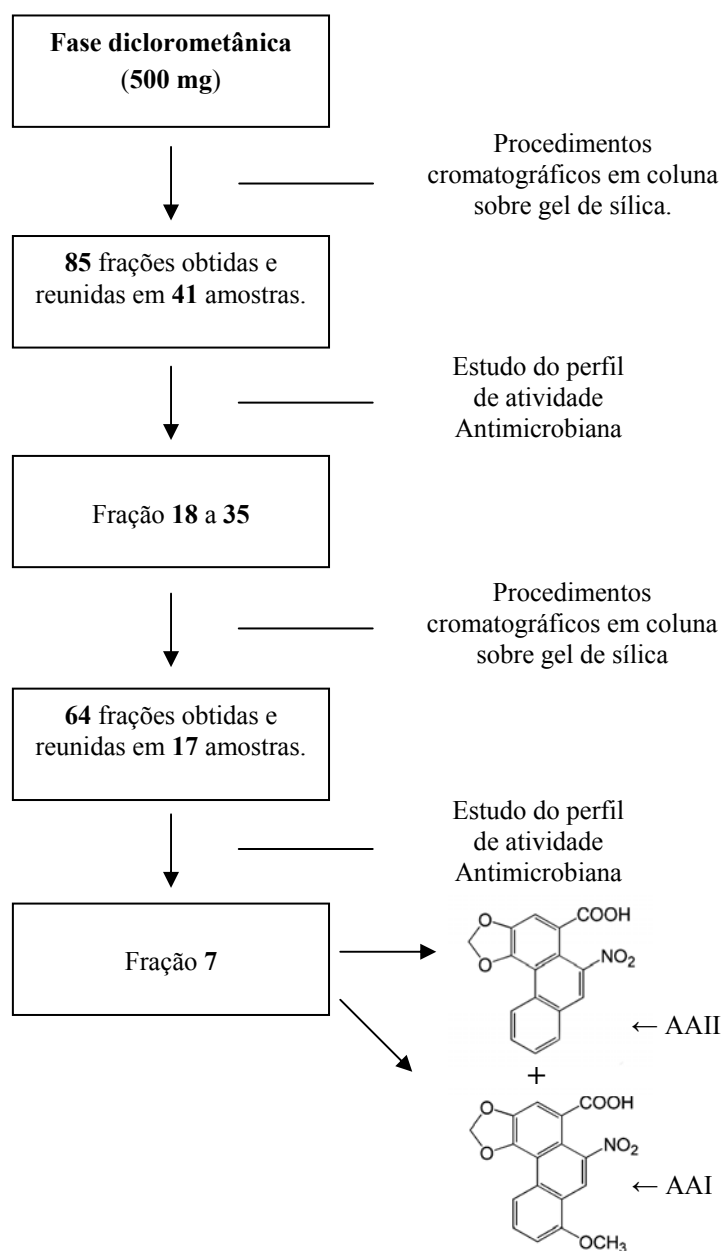
\* (-) indica ausência de atividade inibitória do crescimento microbiano.

\*\* - Atividade Moderada – diâmetro do halo de inibição  $\leq 0,5$  cm.

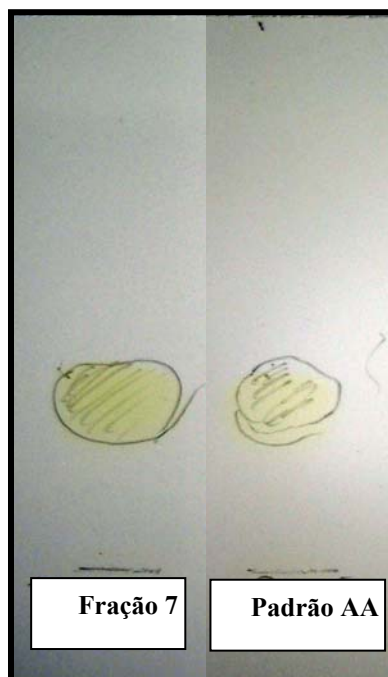
A fase diclorometânica apresentou melhor atividade antimicrobiana e foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando-se como eluente misturas binárias de hexano, AcOEt e MeOH em gradiente de polaridades crescentes, além de solventes puros. As diversas frações obtidas foram reunidas segundo seu perfil cromatográfico em cromatografia em camada fina que foram reavaliadas para determinação do seu potencial antimicrobiano. Essa etapa foi realizada utilizando-se a técnica de “Spot Test” frente à MRSA, o microrganismo que demonstrou maior sensibilidade aos componentes da fração (**Esquema 3**). O emprego dessa técnica de avaliação possibilita o estudo de frações solubilizadas em solventes orgânicos que necessitariam de uma diluição muito elevada para garantir a não influência do solvente no resultado do teste.

Após a realização de sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna, foi obtida uma fração (**Fração 7**) a qual foi associada à atividade inibitória do crescimento de MRSA. A comparação da composição dessa amostra com o padrão de ácido aristolóquico I (AAI) e II (AA II) permitiu inferir ser essa amostra composta da mistura de AAI mais AAII. Entretanto, a comparação utilizando cromatografia em camada fina não permitiu determinar nesse momento se seria AA I ou AA II a substância que corresponde ao princípio ativo com atividade antimicrobiana presente na amostra, nem a proporção dos mesmos (**Figura 1**).





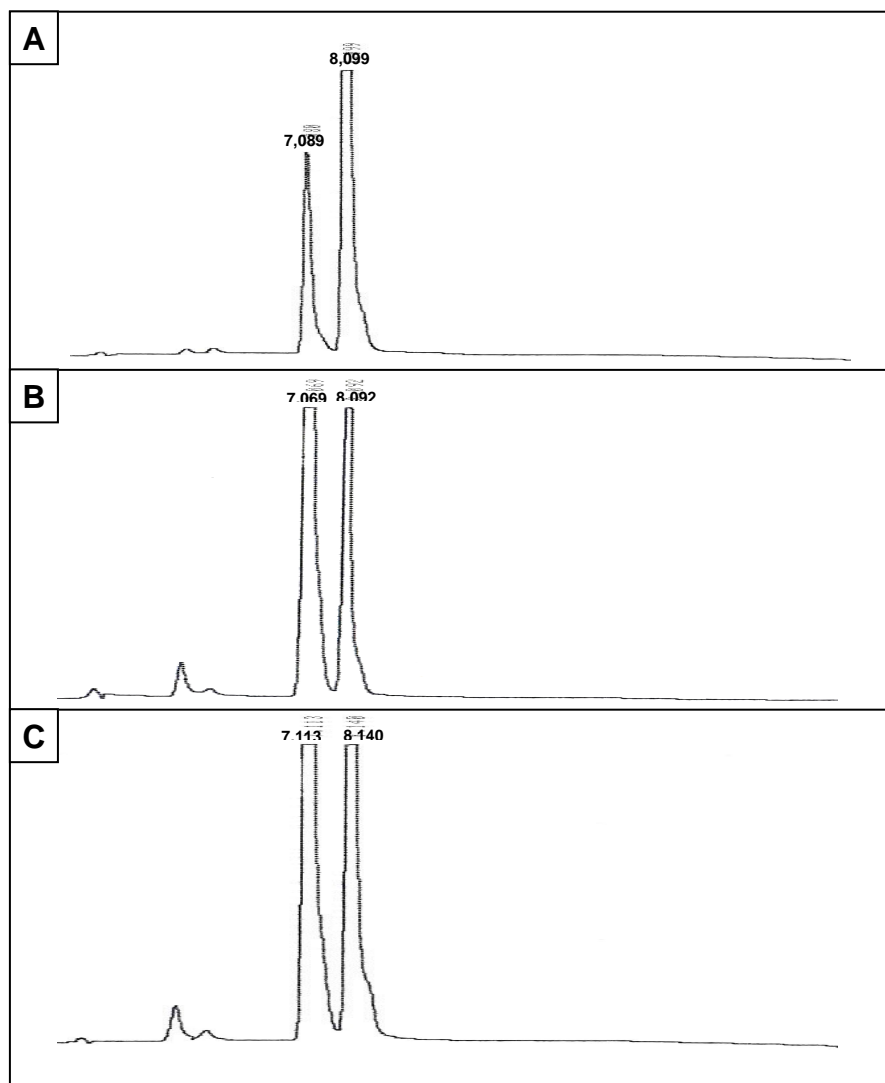
**Esquema 3** – Etapas principais do fracionamento da Fase diclorometânica, mostrando isolamento da mistura de AA I + AA II.



**FIGURA 1** – Comparação entre a Fração 7 isolada da Fase diclorometânica e o padrão de Ácido Aristolóquico por meio de cromatografia em camada fina.

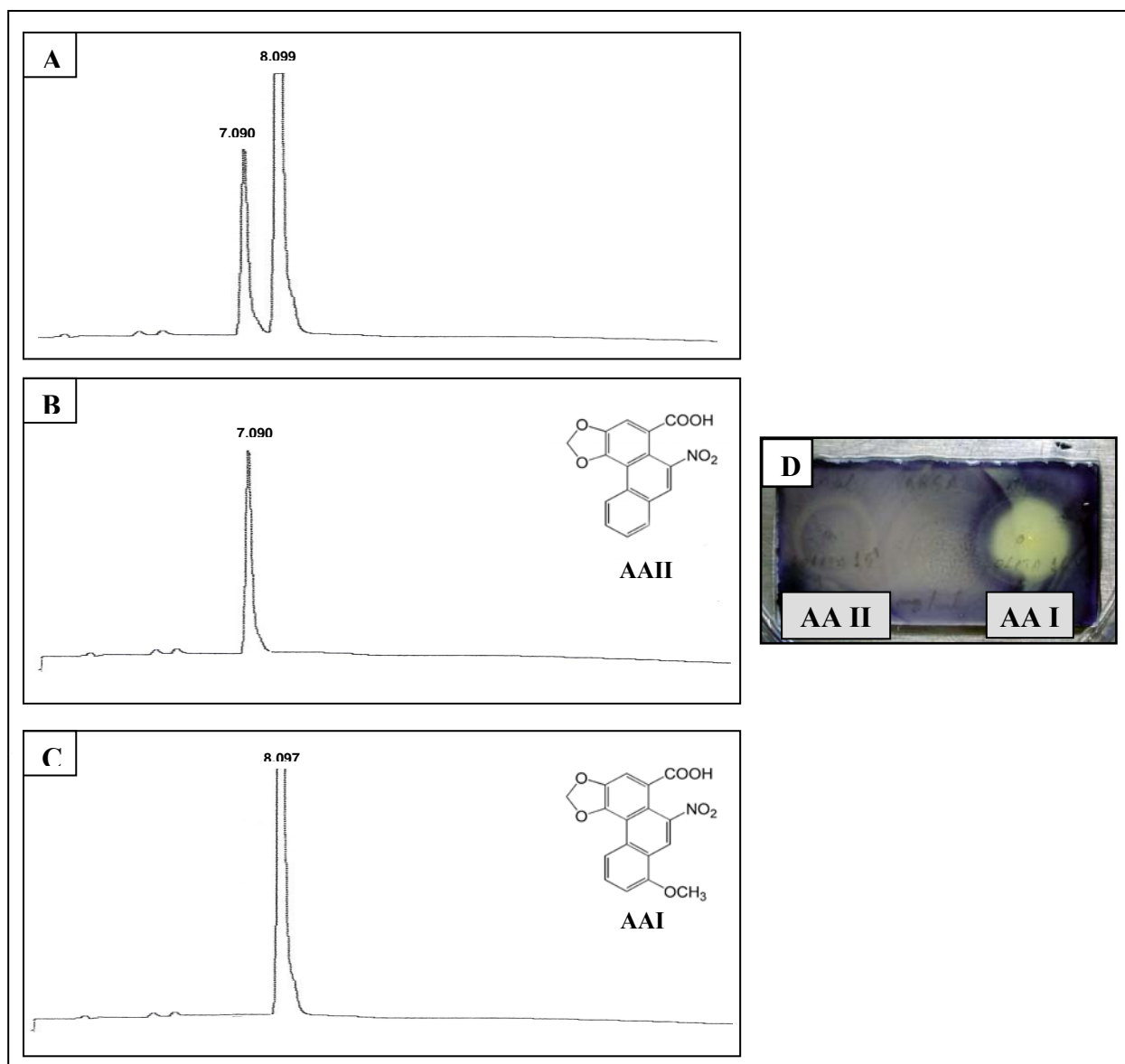
\* - Sistema Solvente: AcOEt (2% de MeOH).

Em um outro momento, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala analítica, foi possível comparar o perfil cromatográfico do padrão de AA com a **Fração 7** da Fase diclorometânica por meio de co-injeção da amostra + padrão. Como pode ser observada na **Figura 2**, os resultados indicam que a **Fração 7** possivelmente é composta da mistura de AA I e AA II. Além disso, foi visto que na amostra o AA I (75%) era mais abundante que o AA II (25%).



**Figura 2** - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE: (A) – Fração 7 isolada da Fase diclorometânica; (B) - padrão comercial de ácido aristolóquico; (C) - perfil obtido pela co-injeção do padrão de ácidos aristolóquicos + amostra (Fração 7). Pela comparação entre as áreas dos sinais observados em (A), foi visto a proporção de AA I:AAII (25% : 75%).

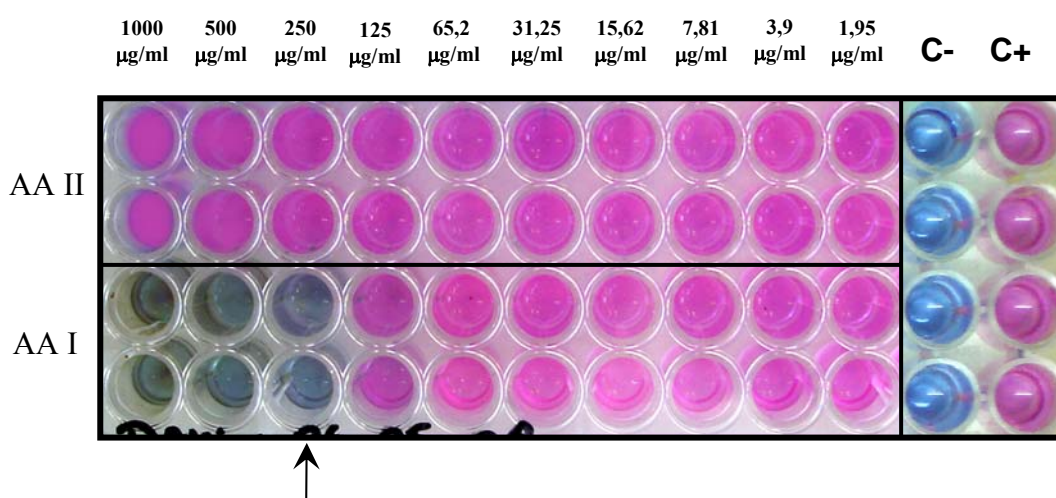
Posteriormente, a mesma técnica de cromatografia (CLAE) foi empregada utilizando-se coluna semipreparativa, possibilitando a separação dos dois componentes presentes na **Fração 7** da Fase diclorometânica. Sendo assim, tornou-se possível determinar o envolvimento dos componentes na ação antimicrobiana para MRSA (**Figura 3**).



**FIGURA 3** – Fracionamento da mistura de AAI e AAI realizada por CLAE utilizando coluna semipreparativa. (A) – Cromatograma da mistura de AAI e AAI correspondente a amostra isolada; (B) – AAI isolado da mistura analisada em A; (C) – AAI separado da amostra representada em A. (D) - Spot Test frente a MRSA das amostras isoladas representadas em B e C.

Com o isolamento desses componentes, foi realizada a determinação da Concentração Mínima Inibitória para avaliação do potencial ativo desses produtos isolados. Apenas o AA I mostrou-se ativo frente a MRSA enquanto o AA II não apresentou atividade inibitória do crescimento desse microrganismo. O valor da CMI para AA I foi de 250  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 4).

Ao comparar as estruturas do AA I e AA II, observa-se que única diferença consiste na presença do grupo metoxila (-OCH<sub>3</sub>) em AA I, o que não ocorre na estrutura do AA II. A presença deste grupamento químico é determinante para a ocorrência da atividade antimicrobiana frente à MRSA, visto que apenas o AA I exibiu ação anti-MRSA.



**Figura 4** – Determinação da CMI para AA I e AA II para a MRSA.

\* Seta indica a CMI observada – 250 µg/ml.

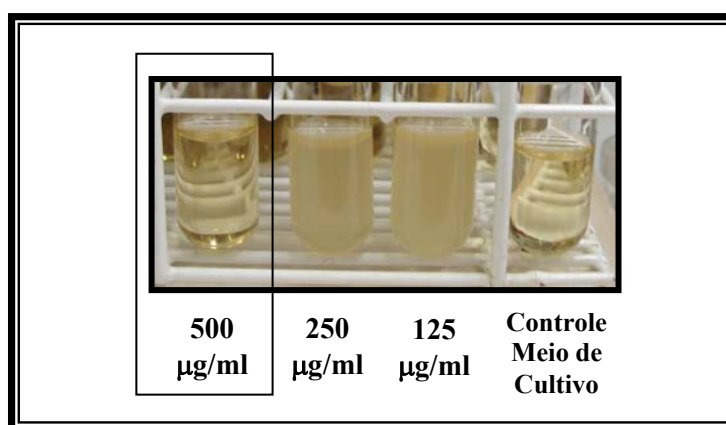
A determinação da CMI para o EBE, fase diclorometânica e AAI permitiu a comparação quantitativa do perfil de atividade antimicrobiana destas amostras (**Tabela 2**). No decorrer do fracionamento, a substância ativa foi sendo concentrada nas amostras obtidas, e conseqüentemente, foi observada uma menor CMI. Como já descrito anteriormente na **Figura 4**, o AA II não possui ação anti-MRSA.

MICROORGANISMOS	EBE	Fase diclorometânica	AA I	Vancomicina	Anfotericina B
<i>Staphylococcus aureus - MRSA</i>	1,85	0,250	0,250	0,001	-
<i>Candida albicans</i>	2,7	0,920	-*	-	0,0001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,920	0,300	-	-	0,0002
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	0,920	0,920	-	-	0,006

**Tabela 2** – Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato bruto etanólico (EBE), da fração semipurificada ativa (Fase diclorometânica) e substância isolada ácido aristolóquico I (AA I) sendo os valores expressos em mg/ml.

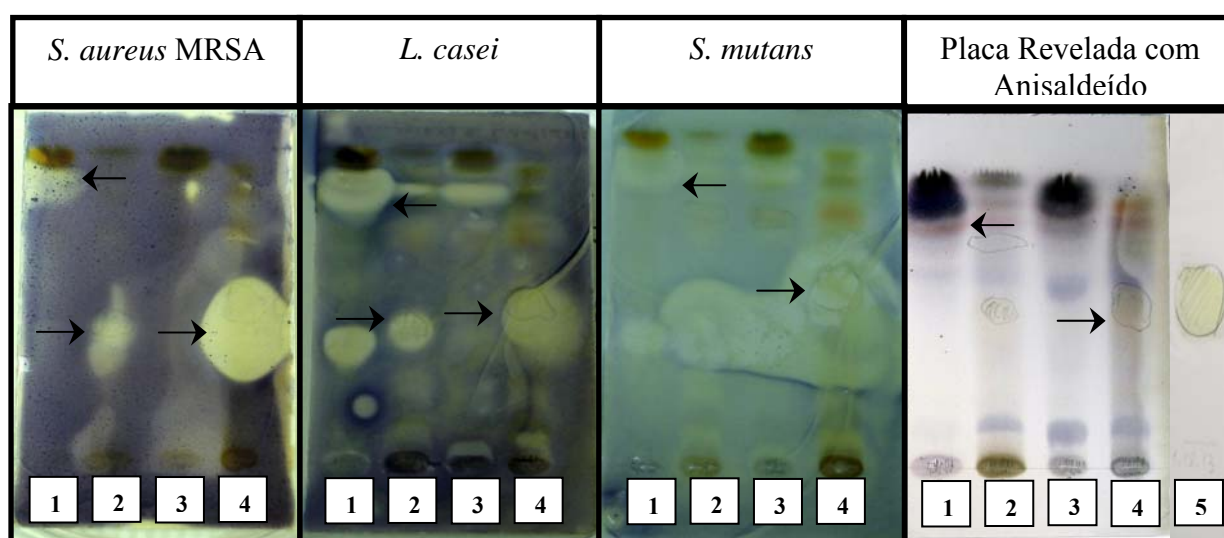
\* (-) – ausência de atividade.

Paralelamente a determinação da CMI, também foi realizada a avaliação do efeito microbioestático e microbocida para MRSA. Tal avaliação estabelece a concentração em que ocorreu inviabilização total do crescimento do microrganismo. Como observado na **Figura 5**, a concentração de 500 µg/ml de AA I exibiu efeito microbocida frente a MRSA, enquanto a CMI observada anteriormente apenas mostrou efeito microbioestático.



**Figura 5** – Estudo do efeito microbocida e microbioestático de AA I frente a MRSA. Destaque na figura indica a concentração em que foi verificado efeito microbocida – 500 µg/ml.

Embora não tenha sido realizada a avaliação da CMI para as bactérias *S. mutans* e *L. casei*, foi possível observar o envolvimento da mistura de AAI e II na ação antimicrobiana por meio de bioautografia (Figura 6). Pelo fato dos microrganismos MRSA, *S. mutans* e *L. casei* possuírem semelhante organização estrutural da membrana, todos sendo Gram-positivos, acredita-se que o mesmo componente AAI envolvido na ação antimicrobiana para MRSA, seja também responsável pela ação sobre *S. mutans* e *L. casei*.



**Figura 6** – Bioautografia das frações ativas. 1 – EBH; 2 – EBE; 3 – Fase hexânico; 4 – Fase diclorometânica; 5 – Padrão de Ácido Aristolóquico (mistura de AA I e AA II). Halos de inibição elucidados com a aplicação de MTT. Sistema Solvente utilizado AcOEt (MeOH 2%). (→) – indicam as principais regiões da cromatografia onde há a presença de componentes com ação antimicrobiana.

Os integrantes do gênero *Aristolochia* são reconhecidos como produtores de ácidos aristolóquicos, sendo diversas espécies descritas como produtoras dessas substâncias. Diversos estudos associam os ácidos aristolóquicos com um forte potencial mutagênico, porém esses ácidos têm despertado grande interesse em estudos envolvendo sua ação como estimulantes do sistema imunológico e potencial antitumoral (HOUGHTON & OGUTVEREN, 1991).

A atividade antibacteriana de AA I foi descrita para bactérias Gram positiva e Gram negativa (KOMATSU *et al*, 1973), mas a atividade de AA II não foi avaliada.

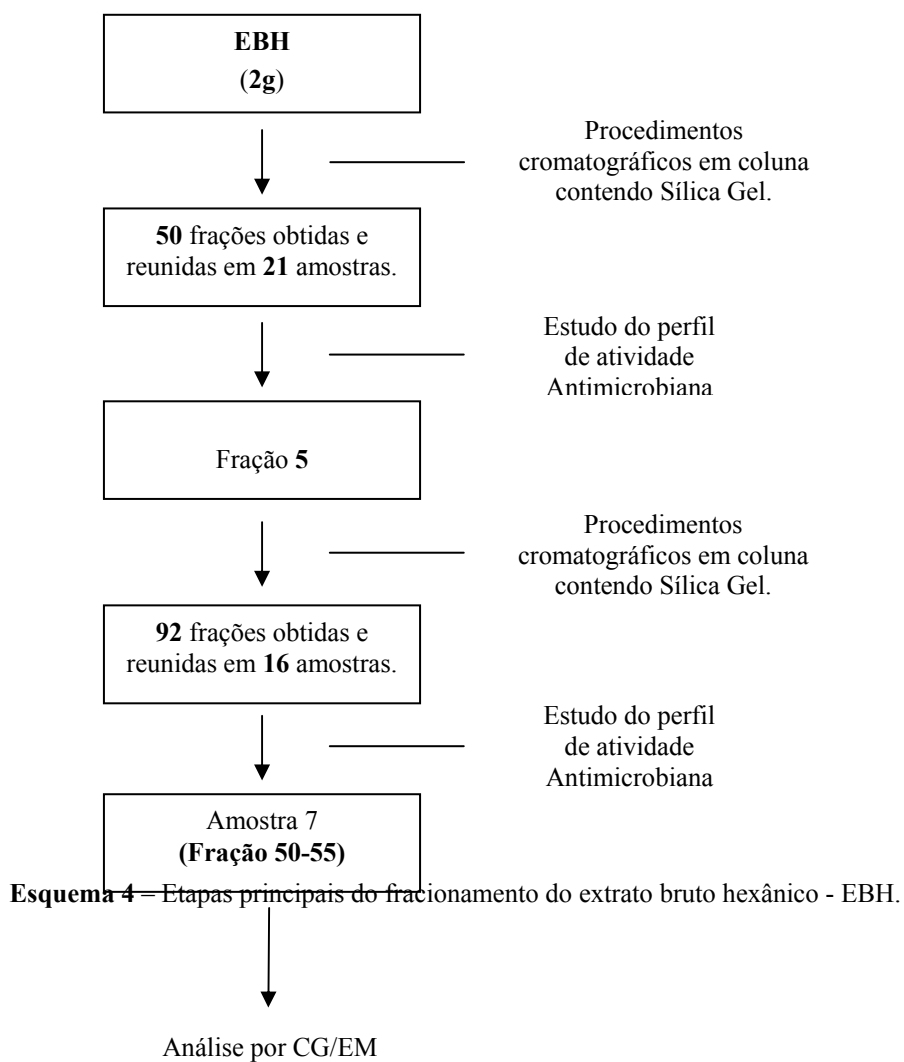


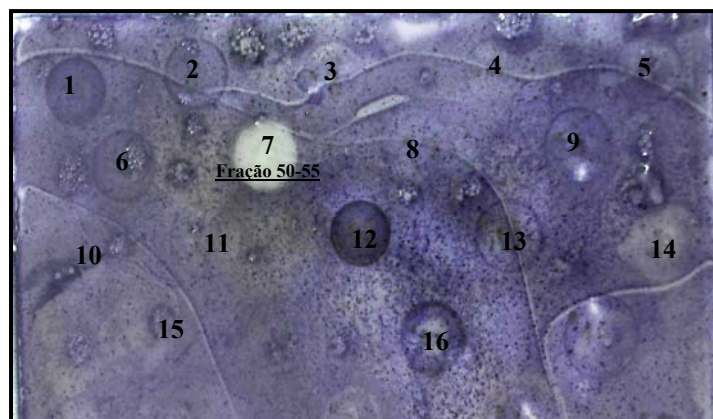
### **Estudo da Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Hexânico – EBH.**

A presença de AA I e AA II no extrato etanólico e posteriormente na Fase diclorometânica estimulou o emprego de uma metodologia de obtenção do extrato de *A. cymbifera* sem que ocorresse a extração desses ácidos aristolóquicos. A planta foi então submetida a um processo de extração direta com hexano e, posteriormente, o mesmo material foi extraído com etanol em maceração estática seguida por extração com água (**Esquema 1**).

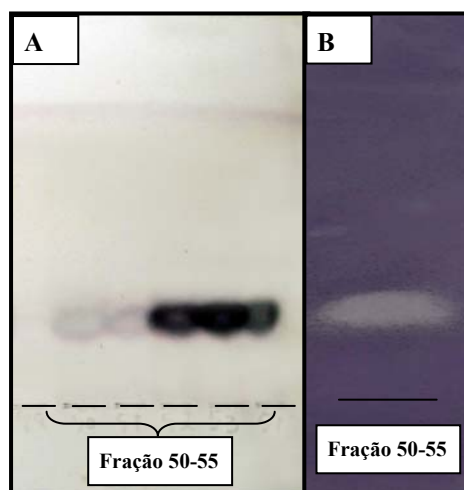
O EBH apresentou potencial antimicrobiano elevado para *C. neoformans* e atividade moderada frente a *MRSA*, *E. coli*, *L. casei* e *F. pedrosoi* (**Tabela 1**).

O fracionamento do EBH foi realizado por cromatografia em coluna aberta sobre gel de sílica (**Esquema 4**) tendo como sistemas eluentes misturas de hexano, AcOEt e MeOH em gradiente de polaridades crescentes, além dos solventes puros. Ao longo das etapas de fracionamento, diversas frações foram sendo obtidas, reunidas com base em seu perfil cromatográfico (observado por cromatografia em camada fina) e avaliadas quanto ao perfil de atividade antimicrobiana. O estudo do perfil de atividade antimicrobiana foi realizado por meio da técnica de difusão em agar – “Spot Test” e evidenciou a ação anti-MRSA da **Fração 50-55 (Figura 7)**. As amostras foram agrupadas em frações com perfil cromatográfico semelhante e após a determinação da atividade antimicrobiana foi realizada técnica de bioautografia que mostrou o envolvimento de ao menos um componente na atividade anti-MRSA (**Figura 8**). Nas etapas desenvolvidas não foi possível isolar o componente responsável pela atividade antifúngica observada frente a *C. neoformans* para o EBH.





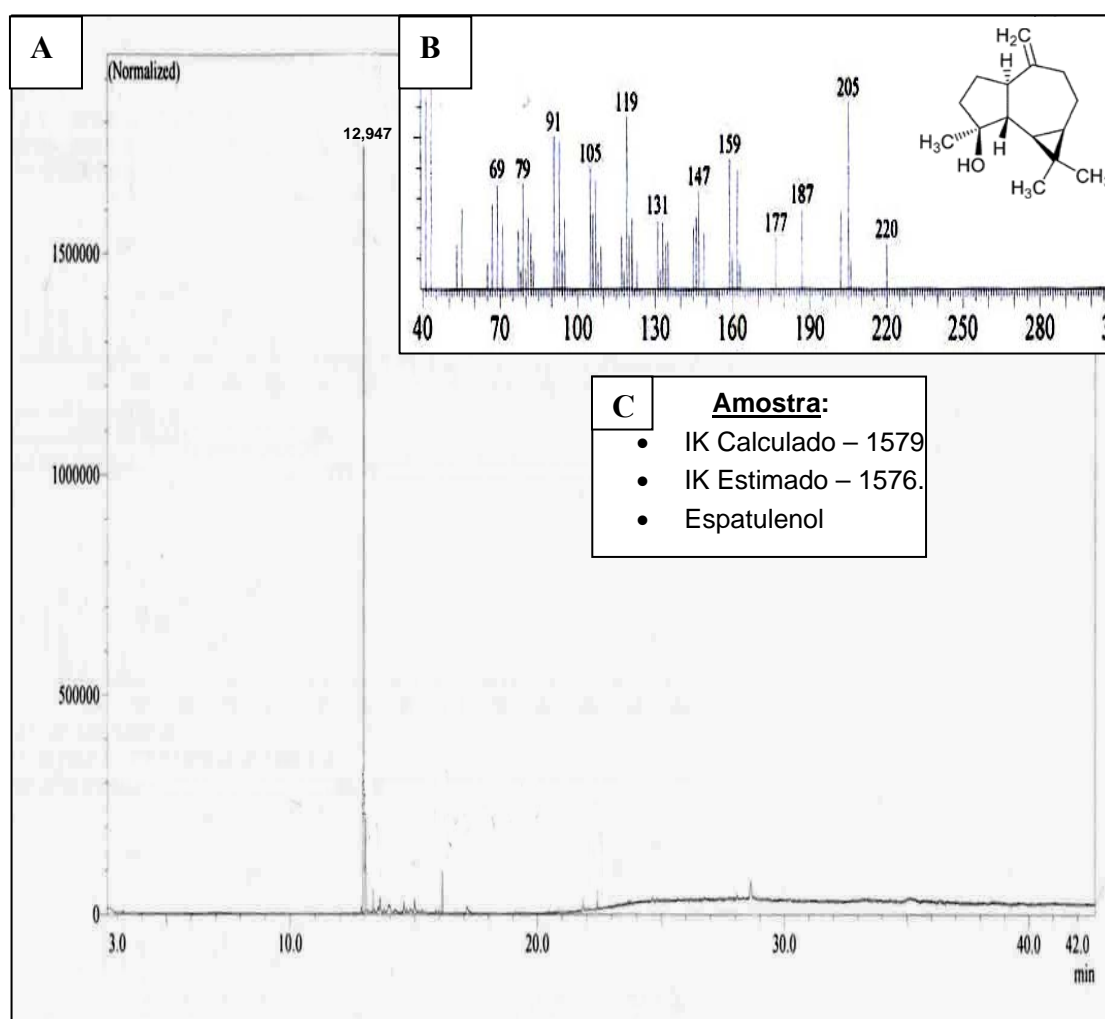
**Figura 7** – Técnica de “Spot Test” avaliando a atividade anti-MRSA das frações obtidas ao longo do fracionamento do EBH. As frações foram testadas após agrupamentos das amostras com perfil cromatográfico semelhante.



**Figura 8** – Bioautografia da **Fração 50-55** eluída ao longo do fracionamento do EBH. (A) – perfil cromatográfico obtido por cromatografia em camada fina das frações correspondentes a substância ativa (B) – Bioautografia da **Fração 50-55** após o agrupamento das frações semelhantes baseando-se no perfil cromatográfico em camada fina.

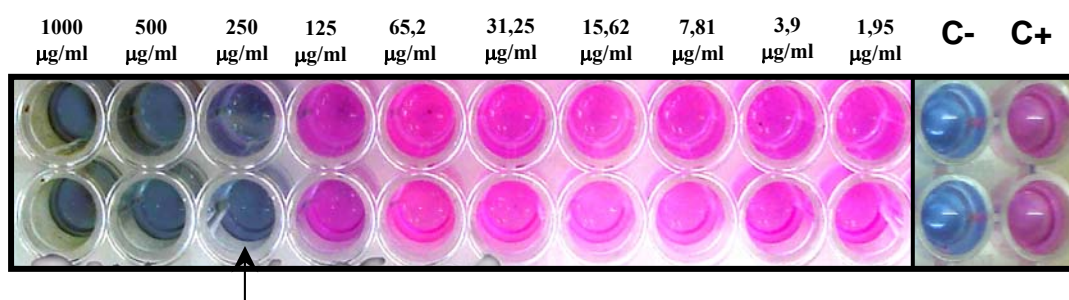
\*Sistema Solvente: Hex:AcOEt 7:3.

A **Fração 50-55** após ter sido isolada e verificada a atividade anti-MRSA foi analisada quanto a sua composição química visando a determinação do componente ativo responsável por essa atividade. A análise por CG-EM demonstrou que a **Fração 50-55** possuía um componente majoritário, que pelo seu perfil de fragmentação em espectrômetro de massas foi possível identificar o sesquiterpeno espatulenol. Além disso, o cálculo do Índice de Retenção de Kovats (IK) reafirmou tratar-se do sesquiterpeno espatulenol (**Figura 9**).



**Figura 9** – Análise da **Fração 50-55** por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. **(A)** - Análise do perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa mostrando o sinal único correspondente ao principal componente da **Fração 50-55**. **(B)** – Perfil de fragmentação da substância detectada no tempo de retenção de 12,947 min indicando ser o espatulenol. **(C)** - Índice de Kovatz calculado e registrado na literatura reafirmando ser a estrutura proposta.

Tendo em vista a atividade já atribuída à **Fração 50-55** e a identificação da substância ativa como o espatulenol, foram realizados testes de avaliação da atividade antimicrobiana frente à MRSA. A técnica utilizada foi a determinação da CMI, que avalia quantitativamente o potencial antimicrobiano (**Figura 10**).



**FIGURA 10** – Teste de determinação da CMI da substância isolada espatulenol obtida do EBH frente a MRSA.

\*Seta indica a concentração que corresponde a CMI - 250 µg/ml.

A comparação dos resultados obtidos com a determinação da CMI do EBH e do espatulenol foi visto que a substância isolada apresenta menor valor de CMI, como o esperado. Além disso, o EBH exibiu potencial antifúngico elevado ao ser comparado com o potencial antibacteriano ao observar que o valor de CMI foi bem menor para os fungos em relação ao observado para MRSA. (**Tabela 3**).

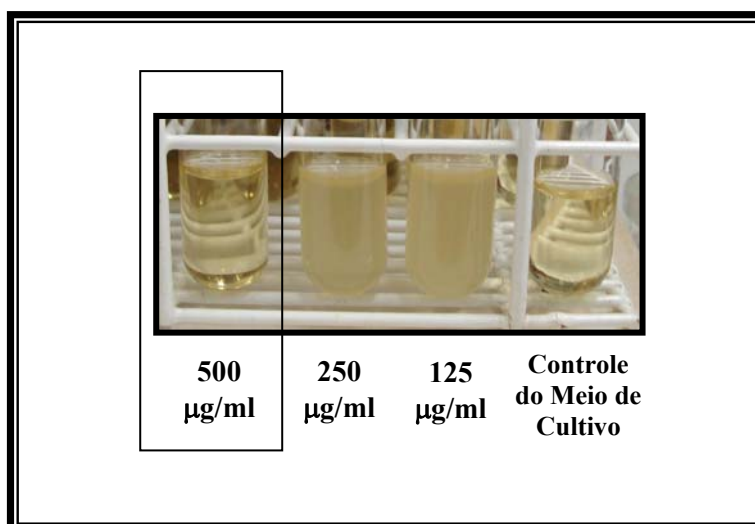
MICROORGANISMOS	EBH	Espatulenol	Vancomicina	Anfotericina B
<i>Staphylococcus aureus</i> - MRSA	5,5	0,250	0,001	-
<i>Candida albicans</i>	2,7	ND*	-	0,0001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,102	ND	-	0,0002
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	0,102	ND	-	0,006
<i>Trichophyton rubrum</i>	-**	ND	-	0,003

**Tabela 3** – Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato bruto hexânico (EBH) e a substância isolada espatulenol sendo os valores expressos em mg/ml.

\* - ND – Teste não realizado.

\*\* (-) – ausência de atividade.

Além da determinação da concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CMI), também foi avaliada a concentração que seria capaz de inviabilizar por completo o crescimento do microbiano. Sendo assim, foi realizado o estudo do efeito microbiocida do espatulenol. Foi visto que a concentração correspondente a CMI (250 µg/ml) apresenta apenas efeito microbioestático ao passo que a concentração de 500 µg/ml possui efeito microbiocida, em que o microrganismo não é capaz de crescer novamente após o contato com a substância durante o período de incubação (**Figura 11**).



**Figura 11** – Estudo do efeito microbiocida e microbioestático do espatulenol frente à MRSA. Destaque na figura indica a concentração que corresponde ao efeito microbiocida – 500 µg/ml.

Componentes da classe dos terpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, porém são comuns na composição de frações não polares do extrato hexânico de diversas espécies do gênero *Aristolochia* (PALMEIRA *et al.*, 2001). Diversos estudos têm descrito a presença marcante de terpenóides do tipo sesquiterpenos em óleos essenciais. A predominância de sesquiterpenos oxigenados é mais comum em raízes e caules, enquanto os óleos essenciais obtidos de folha possuem maior concentração de sesquiterpenos não-oxigenados (PRIESTAP *et al.*, 2003).

A análise quantitativa de frações pouco polares do extrato hexânico de *A. acutifolia* identificou a presença de 47 constituintes terpenoídicos destacando-se a presença predominante de sesquiterpenos, onde o espatulenol foi um dos componentes mais abundante encontrados (PALMEIRA *et al.*, 2001).

Até o presente momento, nenhum relato da presença do espatulenol na espécie *A. cymbifera* foi encontrada. Entretanto, a atividade antibacteriana já foi descrita para este componente isolado de *Helichrysum fulgidum*, uma erva aromática utilizada na África. Onde foi visto que o espatulenol não possui atividade antifúngica (BOUGATSOS *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos descrevem pela primeira vez a presença do sesquiterpeno espatulenol em *Aristolochia cymbifera* Mart & Zucc. Além disso, também foi determinada a sua atividade frente a MRSA. Apenas foi possível isolar este componente em quantidade suficiente para determinar seu potencial de ação antimicrobiana frente a MRSA.



**Estudo da Atividade Antiviral dos extratos brutos e frações semipurificadas de *A. cymbifera*.**

O estudo do potencial antiviral de *A. cymbifera* foi realizado frente a HSV-1 e HSV-2, onde as amostras utilizadas foram EBH, EBE, EBA e as respectivas frações semipurificadas obtidas por partição líquido:líquido a partir do EBE: Fase hexânica, Fase diclorometânica, Fase em acetato de etila e Fase aquosa (**Esquema 2**).

Inicialmente as amostras foram submetidas à avaliação da Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT) à cultura de células utilizada no estudo (célula de rim de macaco - VERO). Esse procedimento consiste em determinar a maior concentração da amostra que não possui efeito citotóxico, alterações morfológicas da cultura de célula.

Dentre os 3 extratos brutos avaliados, o EBE apresentou menor citotoxicidade, e onde a concentração de 200 µg/ml não demonstrou efeito tóxico. A CMNT determinada para o EBA foi de 100 µg/ml enquanto para EBH foi de 50 µg/ml.

As frações semipurificadas obtidas do EBE com a realização de partições líquido:líquido exibiram maior potencial tóxico ao ser comparado ao EBE. Como observado na **Tabela 4**, a Fase hexânica e a Fase em acetato de etila apresentaram CMNT de 50 µg/ml, enquanto para as Fases diclorometânica e aquosa a CMNT foi de 25 µg/ml.

O fracionamento do EBE demonstrou que ocorreu um aumento do perfil de toxicidade dos extratos brutos para as fases semipurificadas. É evidente que a amostra em estado bruto apresenta menor toxicidade já que os componentes potencialmente tóxicos encontram-se em uma mistura mais complexa, minimizando o efeito tóxico observado.

A avaliação do percentual de inibição viral demonstrou que nenhuma das amostras testadas possui potencial antiviral contra HSV-2, desde que todas as amostras testadas

exibiram percentual nulo de inibição do título viral. Já ao avaliar frente a HSV-1 foi visto que apenas o EBA e a Fase diclorometânica não exibiram ação inibitória do título viral de HSV-1, enquanto as demais amostras foram capazes de reduzir o título viral de HSV-1 (**Tabela 4**).

A Fase diclorometânica, descrita anteriormente, apresentando melhor atividade anti-MRSA, não exibiu qualquer potencial antiviral frente a HSV-1 e HSV-2. Sendo assim, acredita-se que não haja o envolvimento do ácido aristolóquico na atividade antiviral frente a estes dois tipos de vírus, tendo em vista ser este um importante componente ativo da Fase diclorometânica.

Substância	CMNT ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentual de Inibição - PI	
		HSV-1	HSV-2
<b>EBH</b>	50	68,4	0
<b>EBE</b>	200	43,8	0
<b>EBA</b>	100	0	0
<b>Fase hexânica</b>	50	85,9	0
<b>Fase diclorometânica</b>	25	0	0
<b>Fase em acetato de etila</b>	50	68,4	0
<b>Fase aquosa</b>	25	43,8	0

**Tabela 4** – Perfil de atividade antiviral frente a HSV-1 e HSV-2.

### **Estudo do Potencial Antioxidante de *A. cymbifera*.**

As amostras foram avaliadas quanto a presença de substâncias com potencial antioxidante. A técnica foi desenvolvida utilizando-se os três extratos brutos, EBH, EBE e EBA, assim como as 4 frações semipurificadas obtidas por meio de partições líquido:líquido a partir do EEB: Fase hexânica, Fase diclorometânica, Fase em acetato de etila e Fase aquosa.

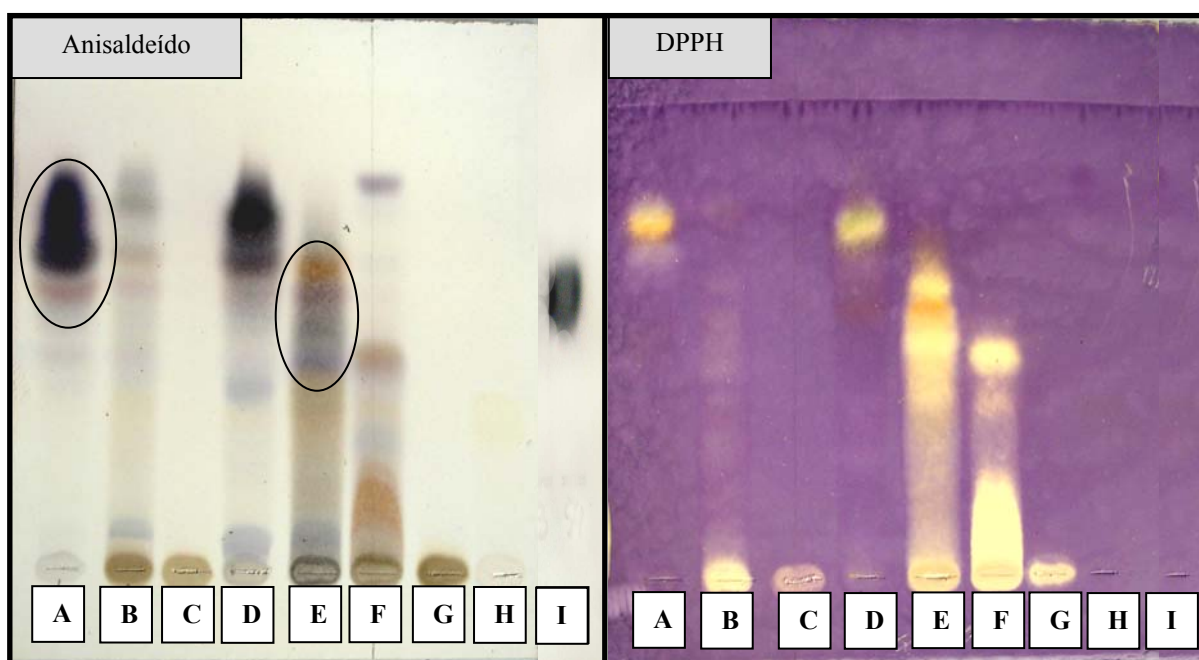
Os resultados observados demonstraram a presença de diferentes componentes com propriedade antioxidante. Como observado na **Figura 12**, diversas regiões do campo cromatográfico indicaram a ocorrência de substâncias com tal propriedade ao proceder revelação da placa cromatográfica utilizando-se DPPH. Foi observado que alguns dos grupos de substâncias associadas a ação antioxidante também estão envolvidos com o potencial antimicrobiano anteriormente descrito por bioautografia (**Figura 6**). As regiões da placa cromatográfica que correspondem a presença desses grupos de substâncias com ação antioxidante e antimicrobiana estão destacadas na **Figura 12**.

Embora diversas amostras tenham sido associadas à presença de componentes com ação antioxidante, a substância isolada espatulenol e a mistura dos ácidos aristolóquicos I e II não exibiram potencial antioxidante no teste realizado. Isto sugere a presença de outras substâncias nos extratos que sejam responsáveis pelo potencial antioxidante.

Diversos estudos mostram diferentes atividades biológicas para um mesmo extrato de planta exibindo um amplo espectro de bioatividade. Este fato estimula cada vez mais o estudo de plantas que possibilitem a obtenção de substâncias com diversas propriedades terapêuticas associadas (ALVIANO & ALVIANO, 2009). A avaliação do

potencial antioxidante permitiu elucidar uma outra propriedade terapêutica além das já descritas para os extratos de *A. cymbifera*.

O avanço observado na pesquisa de produtos com ação antioxidante tem despertado o interesse em plantas como fonte natural de substâncias capazes de prevenir a oxidação, controlar a proliferação de microrganismos, evitar a produção de toxinas em alimentos, além de possibilitar sua aplicação na terapia de diversas doenças. A busca por novas substâncias antioxidantes que atuem na prevenção químicas de biomoléculas relevantes é um promissor campo a ser explorado na fitoterapia (RAMOS *et al*, 2003).



**Figura 12** – Estudo do Potencial Antioxidante. Placas cromatográficas foram reveladas com anisaldeído e DPPH. **A** – EHB; **B** – EEB; **C** – EAB; **D** – Fase hexânica; **E** – Fase diclorometânica; **F** – Fase em acetato de etila; **G** – Fase aquosa; **H** – Padrão de Ácido Aristolóquico (Sigma®); **I** – Espatulénol.

\* - Sistema Solvente utilizado AcOEt (MeOH 2%). Círculos indicam algumas das regiões correspondentes a presença de substâncias com ação antioxidante também associadas à ação antimicrobiana.

## CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos ao longo do estudo de *A. cymbifera* indicaram a atividade biológica desta planta por diferentes abordagens;
- Foi isolado da Fase diclorometânica obtida do EBE o ácido aristolóquico I e II;
- O principal componente presente no EBE com atividade anti-MRSA foi o ácido aristolóquico I, sendo que o AA II não foi ativo;
- O fracionamento do EBH permitiu isolar o sesquiterpeno espatulenol que apresentou atividade antimicrobiana frente a MRSA;
- A Fase diclorometânica apresentou maior potencial citotóxico juntamente com o EBA;
- Todas as amostras testadas não apresentaram ação antiviral para HSV-2, porém apenas a Fase diclorometânica e o EBA não foram ativos frente à HSV-1;
- Diversos grupos de substâncias presentes nos extratos e frações possuem potencial antioxidante. A mistura de AA I + AA II e o espatulenol não exibiram ação antioxidante.
- A identificação da presença de AA I e AA II nesta espécie ressalta o risco da uso popular desta planta.
- A avaliação futura da relação entre a concentração tóxica e a dose efetiva é necessária para garantir o uso seguro desta planta.

**BIBLIOGRAFIA**

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M. & REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **25**(9):1188-1191. 2002.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois USA: Allured publishing corporation. Carol Stream. 2001.
- AHMAD, I.; AQIL, F. & OWAIS, M. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH. Weinheim – Germany. 2007.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA-JÚNIOR, T. & ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*. **25**(3):367-373. 2001.
- ALVIANO, W.S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G. & BOLOGNESE, A. M. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*. **53**:545-552. 2008.
- ALVIANO, D. S. & ALVIANO, C. S. Plantas extracts: Search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; **10**(1):1-15. 2009.
- BAQUERO, F. Gram-positive resistance: Challenges for the development of new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **39**:1-6. 1997.
- BARRY, H. Antioxidant effects a basis for drug selection. *Drugs*. **42**: 569-605. 1991.

- BOYCE, J. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital and long term care facilities: Microbiology, epidemiology, and preventive measures. *Infection Control Hospital Epidemiology*. **13**:179-189. 1992.
- BOUGATSOS, C.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D. K. B. & CHINOU, I. B. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Z. Naturforsch.* **59**:368-372. 2004.
- BURIK, J. A. & MAGEE, P. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Ann Review Microbiology*. **55**:743-772. 2001.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guideline for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medicinal Biology Research*. **33**:179-189. 2000.
- CAMPORESE, A.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPÓSITO, R. G.; MORSELLINO, N.; DE SIMONE, F. & TUBARO, A. Screening of antibacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*. **87**:103-107. 2003.
- CHOPRA, I.; HODGSON, J.; METCALF, B. & POSTE, G. New approaches to the control of infections caused by antibiotic resistant bacteria. An Industry perspective. *Journal of the American Medical Association*. **275**:401-403. 1996.
- COWAN, M. M. Plants products as antimicrobials agents. *Clinical Microbiology Review*. **12**:564-582. 1999.
- CRAVEN, D.E. & SHAPIRO, D.S. *Staphylococcus aureus*: times they are changing. *Clinical Infection Diseases*. **42**:179-180. 2006.

- CUENDET, M.; POTTERAT, O. & HOSTETTMANN, K. Flavonoids and phenylpropanoid derivatives from *Campanha basbata*. *Phytochemistry*. **56**:631-636. 2001.
- DAHANUKAR, S. A.; KULKARNI, R. A. & REGE, N. N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Journal of Pharmacology*. **32**:81-118. 2000.
- DHAR, L. M.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; NEHROTRA, B. N. & RAY, C. Screening of Indian plants for biological activity. Part. I. *Indian Journal of Experimental Biology*. **6**:232-247. 1968.
- ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B. F.; ROZENTAL, S.; DA SILVA, A. J. R. & ALVIANO, C. S. 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*. **153**:647-652.
- FESSENDEN, R. J. & FESSENDEN, J. S.. *Organic Chemistry*. Second Edition. Willard Grant Press. Boston. Mass. 1982.
- GADHI, C. A.; HATIER, R.; MORY, F.; MARCHAL, L.; WEBER, M.; BENHARREF, A.; JANA, M. & LOZNIOWSKI, A. Bactericidal properties of the chloroform fractions from rhizomes of *Aristolochia paucinervis* Pomel. *Journal of Ethnopharmacology*. **75**:207-212. 2001.
- GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S. & LEE, K. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infection Disease*. **37**:1172-1177. 2003.
- GRAYER, R.J. & KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and the other antifungal compounds for higher plants. *Phytochemistry*. **56**(3):253-263. 2001.



- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. & CROSS, C. E; Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **119**: 598–620. 1992.
- HARBONE, J. B. 1973. Methods of plants analysis. In *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall. p. 1-32.
- HILI, P.; EVANS, C. S. & VENESS, R. G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*. **24**:269-275. 1997.
- HIRAMATSU, K. Vancomycin resistance in Staphylococci. *Drug Resistance Update*. **1**:135-150. 1998.
- HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Review*. **9**:469-488. 1996.
- HOSTETTER, M. K. Linkage of the adhesion, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. **132**:258-263. 1998.
- HOUGHTON, P. J. & OGUTVEREN, M. 1991. Alkaloids and a lignan from *Aristolochia ponticum*. *Phytochemistry*. **30(2)**:717-718.
- IOSET, J. R.; RAOELISON, G. E. & ROSTETTMANN, K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. *Food and Chemical Toxicology*. **41(1)**:39-36. 2003.
- KARIBA, R. M.; ARNASEON, J. T.; ABOUD-ZAID, M.; AKPAGANA, K.; SANCHEZ-VINDAS, P. & SMITH, M. L. Antimicrobial activities of a new Schizozygane indole alkaloid from *Schizozygia coffaeoides* and the revised structure of isochiozagaline. *Journal of Natural Products*. **65**:566-569. 2002.

- KELLY, L. M.; GONZÁLEZ, F. Phylogenetic relationships in Aristolochiaceae. *Systemic Botanical*. **28**:236-249. 2003.
- KHAN, M. R.; KIHARA, M. & OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Evodia elleryana*. *Fitoterapia*. **71**:72-75. 2000.
- KOHARA, A.; SUZUKI, T.; HONMA, M.; OHWADA, T.; HAYASHI, M. Mutagenicity of aristolochic acid in the  $\lambda$ /lacZ transgenic Mouse (MutaMouse). *Mutation Research*. **515**(1-2):63-72. 2002.
- KOMATSU, N.; NAWATA, H.; KIMINO, T.; TSUNODA, H.; NAGUMO, N.; KOIKE, K.; SHOJI, J.; TADA, A. Biological activity of aristolochic acid. I. Antimicrobial spectrum and effects on bacterial toxins. *Showa Igakkai Zasshi*. **33**(6):769-775. 1973.
- KONG, JIN-MING.; GOH, NGOH-KHANG.; CHIA, LIA-SAI. & CHIA, TET-FATT. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*. **24** (1):7-21. 2003.
- KUMAR, V.; CHAUHAN, N. S.; PADH, H. & RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **107**(2):182-188. 2006.
- LAFFERTY, W. E.; DOWNEY, L.; CELUM, C. & WALD, A. Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. *Journal of Infection Disease*. **181**:1454-1457. 2000.
- LEITÃO, G. G.; LOPES, D.; MENEZES, F. S.; KAPLAN, M.A.C.; CRAVEIRO, A. A. & ALENCAR, J. W. Essential oil from Brazilian *Aristolochia*. *Journal of Essential Oil Research*. **3**(6):403-408. 1991.
- LEITÃO, G. G. & KAPLAN, M.A.C. Química do gênero *Aristolochia*. *Revista Brasileira de Farmacologia*. **73**:65-75. 1992.

- LOOCKER, T. J. & GARNETT, G. P. 2005. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sexual Transmitted Infections Diseases*. **81**:103-107.
- MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M. & NETO-dos-SANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **21**:279:284. 2003.
- MACHADO, T.B.; LEAL, I. C. R.; KUSTER, R. M.; AMARAL, A. C. F.; KOKIS, V.; SILVA, M. G. & SANTOS, K. R. N. Brazilian Phytopharmaceuticals – Evaluation against Hospital Bacteria. *Phytotherapy Research*. **19**:519-525. 2005.
- MARQUES-SANTOS, L. P., BERNARDO, R. R., DE PAULA, E. F. AND RUNJANEK, V. M. Cyclosporin A and trifluoperazine, two resistance, modulating agents, increase ivermectin neurotoxicity in mice. *Pharmacology & Toxicology*. **84**:125-129. 1999.
- MAXWELL, S.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49: 345. 1995.
- McDONALD L.C. Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment. *Clinical Infectious Diseases*. **42**:S65-71. 2006.
- MIZUNO, M.; OKA, M.; INUM, M. & TANKA, T. An aristolochic acid derivative of *Aristolochia liukiuensis*. *Journal Natural Products*. **53**(1):179-181. 1990.
- MOELLERING, R.C.; GRAYBILL, J.R.; MCGOWAN, J.E. & COREY, L. Antimicrobial resistance prevention initiative—an update: Proceedings of an

expert panel on resistance. American Journal of Infection Control. **35**:S1-S23. 2007.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests. 4th ed. Wayne (PA), Approved Standards - M27-A2, M38-A, M11-A6 e M7-A4. 2005.

NEWTON, S. M.; LAU, C.; GURCHA, S. S.; BESRA, G. S. & WRIGHT, C. W. The evaluation of forty-three species for in vitro antimycobacterial activities: isolation of active constituents from *Psoralea coryfolia* and *Sanguinaria canadensis*. Journal of Ethnopharmacology. **79**:57-67. 2002.

NEYNDORFF, H.C.; BARTEL, D.L.; TUFARO, F. & LEVY, J.G. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. Transfusion. **30**:485-490. 1990.

NISHIMURA, T.; TOKU, K. & FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of amino hydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. Kitasato Archives Experimental in Medicine. **50**:39-46. 1977.

NOSTRO, A.; GERMANO, M. P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A. & CANNATELLI, M. A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology. **30**:379-384. 2000.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. & PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. Critical Care Medicine. **34**(3):857-863. 2006.

PALMEIRA, S. F.; CONSERVA, L. M.; ANDRADE, E. H. A. & GUILHON, G. M. S. P. Analysis by GC-MS of the hexane extract of the aerial parts of *Aristolochia acutifolia* Duchtr. Flavour Fragrance Journal. 2001. **16**:85. 2001.

- PANNUTI, C. S. & GRINBAUM, R. S. An overview of nosocomial infections control in Brazil. *Infection Control Hospital Epidemiology*. **16**:170-174. 1995.
- PRIESTAP, H. A.; VAN BAREN, C. M.; LIRA, P. D. L.; COUSSIO, J. D. & BANDONI, A. L. Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry*. **63**:221. 2003.
- RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA.; RODRIGUEZ, C. A. & RIVERO, A. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **87**:241-246. 2003.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon* **39**:603-613. 2001.
- REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. *American Journal of Hygiene*. **27**:493-497. 1938.
- RÍOS, J. L. & RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**:80-84. 2005.
- RODRIGUEZ, D. J.; CHULIA, J.; SIMOES, C. M. O.; AMOROS, M.; MARIOTTE, A. M. & GIRRE, L. Search for *in vitro* antiviral activity of new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Medica*. **56**:59-62. 1990.
- ROIZMAN, B. & KNIPE, D. M. Herpes simplex viruses and their replication. In: *Virology* 4<sup>th</sup> ed. Edited by knipe, D. M. & HOWLEY, P. M. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. P. 2399-2459. 1990.
- SAXENA, G.; TOWERS, G.H.N.; FAMER, S.; HANDOCK, R.E.W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemistry Anal.* **6**:125-129. 1995.
- SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; LEAL, G. S.; FONSECA, L.S.; CONTIJO-FILHO, P. P. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:

isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospital. *Journal of Medical Microbiology*. **48**:17-23. 1999.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S. & COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **96**:563–568. 2005.

SCHULTES, R. E. The Kingdown of Plants. In W. A. R. Thomson Ed. *Medicines from Earth*. Mc Grave Hill Bock Co., New York, N.Y. 1978.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5º Ed. Florianópolis. Editora da UFRGS. 2004.

SOUSA, S.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G. & TUBARO, A. Screening of the topical antiinflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **81**:201-215. 2002.

STRUTT, M.; BAILEY, J; TENANT-FLOWERS, M.; GRAHAM, D. & SUCKER, M. Ethnic variation in type of genital herpes simplex virus infection in South London genitourinary medicine clinic. *Journal of Medicinal Virology* **69**(1):108-110. 2003.

TEGOS, G.; STERMITZ, F. R. & LOMOVSKAYA, O. Multidrug pump inhibitor uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**:3133-3141. 2002.

TSHIBANGU, J. N.; CHIFUNDERA, K.; KAMINSKY, R.; WRIGHT, A. D. & KONIG, G. M. Screening of African medicinal plants for antimicrobial and enzyme inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **80**:25-35. 2002.

- VELÀZQUEZ, E. V.; TOURNIEN, H. A.; DE BUSCHIAZZO, P. M. D.; SAAVEDRA, G. & SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* **74**:91–97. 2003.
- WAGNER, H. Guidelines for quality control of phytomedicines. In II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Humam Welfare – WOCMAP II. Mendoza, República Argentina; L4. 1997.
- WALD, A.; ZEH, J.; SELKE, S.; WARREN, T.; ASHLEY, R. & COREY, L. Genital shedding of herpes simplex virus among men. *Journal of Infection Disease*. **15**:186. Suppl1:S34-9. 2002.
- WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceeding of the Nutrition Society*. **63**(4):621-629. 2004.
- WILD, P & WATSON, D. H. Electron microscopy studies on the architecture of animal viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol*. **27**:25-47. 1963.
- WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P. & EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospital: analysis of 24.179 cases from a prospective nation wide surveillance study. *Clinical Infections Diseases*. **39**:309-317. 2004.
- WOJTASZEK, J. Oxidative burst an early response to pathogen infection. *Biochemistry Journal*. **322**:691-692. 1997.
- ZHOU, S.; KOH, HWEE-LING.; GAO, Y.; GONG, ZHI-YUAN. & LEE, E. J. D. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Science*. **74**:935-968. 2004.

# 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](#)