

MARA RÚBIA KELLER SARTORI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DE
EXTRATOS E COMPOSTOS PUROS OBTIDOS DAS
FLORES DA *Acmela brasiliensis* SPRENG
(*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**

ITAJAÍ - 2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DE
EXTRATOS E COMPOSTOS PUROS OBTIDOS DAS
FLORES DE *Acmela brasiliensis* SPRENG
(*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)

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

MARA RÚBIA KELLER SARTORI

Itajaí, julho de 2005

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Co-orientador:

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Às minhas queridas filhas, Cristina e Fernanda,
pelo amor, dedicação, apoio e incentivo
em todos os momentos de nossa caminhada.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao Professor Dr. Alexandre Bella Cruz, pela constante atenção, apoio e orientação durante o trabalho de elaboração desta dissertação.

Agradeço também ao Professor Dr. Valdir Cechinel Filho pela amizade, paciência, incentivo e orientação durante a realização deste trabalho, oportunizando um intercâmbio com a Universidad Nacional de Rosario, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

À professora Dra. Susana A. Zacchino da Universidad Nacional de Rosario - Argentina, que com sua cordial atenção e amizade nos ajudou e orientou, juntamente com sua equipe, na elaboração das pesquisas da atividade antifúngica deste trabalho.

Às professoras e queridas amigas Inês Stoffel e Josiane Vitorino pela valiosa amizade, incentivo e carinho nas horas difíceis.

Agradeço ao Prof. José Roberto Bresolin e Prof. Dra. Tania Belle Bresolin pelo incentivo e amizade, desde o momento que esta etapa era apenas uma vontade.

À toda a equipe da Farmácia Escola Comunitária da UNIVALI pela colaboração prestada.

À equipe de professores e organizadores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela dedicação e competência.

À todos os colegas do curso de mestrado, pela amizade e discussões interessantes que contribuíram para o crescimento profissional.

Às queridas colegas Juliana e Rosângela, por dividirmos e somarmos esforços na conquista de mais uma etapa de vida.

Aos meus pais, Renato e Tamar, pelo amor, carinho e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Às minhas amadas filhas, Cristina e Fernanda, que muito me incentivaram e sempre me auxiliaram na superação das dificuldades e comemoraram alegremente as vitórias de nossas vidas. Pelo amor e compreensão quando estive ausente. Agradeço a Deus por ter-me dado a graça de tê-las ao meu lado nesta jornada.

Ao Fernando, que de onde estiver, estará torcendo por nós.

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DE
EXTRATOS E COMPOSTOS PUROS OBTIDOS DAS FLORES
DE *Acmela brasiliensis* SPRENG
(*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**

Mara Rúbia Keller Sartori

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Microbiologia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí”.

Orientador Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Coordenadora do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêutica
Profa. Dra. Tania Mari Belle Bresolin

Banca Examinadora:

Presidente da Banca Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz (UNIVALI)

Co-orientador Prof. Dr. Valdir Cehinel Filho (UNIVALI)

Prof^a. Dr. Marco Antônio Bacelar Barreiro (UNIVALI)

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes (UFSC)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	21
3.3 BACTÉRIAS	21
3.3.1 Membrana Citoplasmática Bacteriana	22
3.3.2 Parede Celular.....	23
3.3.3 Bactérias Gram positivas	24
3.3.4 Bactérias Gram negativas	26
3.4 FUNGOS	28
3.4.1 Dermatófitos	29
3.5 ANTIMICROBIANOS	30
3.5.1 Classificação dos Agentes Antimicrobianos	32
3.6 <i>Acmela brasiliensis</i> SRENG ASTERACEAE	39
3.6.1 Características gerais	39
3.6.2 Estudos fitoquímicos de <i>Acmela brasiliensis</i> SRENG	40
3.6.3 Estudo Analítico - Cromatografia em camada delgada	43
3.6.4 Estudos biológicos de <i>Acmela brasiliensis</i> SRENG	43
3.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	45
3.7.1 Estudos Microbiológicos – Método de diluição	45
3.7.2 Ensaio de toxicidade (<i>Artemia salina</i>)	46
3.7.3 Avaliação da atividade antifúngica das frações e compostos obtidos das flores da <i>Acmela brasiliensis</i> (<i>Wedelia paludosa</i>) Spreng por inibição de parede celular.....	46

MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Preparação dos extratos e extratos e compostos puros de <i>A. brasiliensis</i>	
SRENG ASTERACEAE	47
4.2 Cromatografia em Camada Delgada	48
4.3 Microrganismos	48
4.4 Preparação dos inóculos bacterianos	49
4.5 Preparo do inóculo de fungos leveduriformes	49
4.6 Preparo dos inóculos dos fungos filamentosos	50
4.7 Avaliação da atividade antibacteriana	51
4.8 Método da concentração bactericida mínima (CBM)	51
4.9 Avaliação da atividade antifúngica	52
4.10 Estudos preliminares do mecanismo de ação das frações e compostos	
obtidos das flores da <i>Acmela brasiliensis</i> Spreng contra fungos	53
4.11 Ensaio de toxicidade (<i>Artemia salina</i>)	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 SISTEMA DE SOLVENTES - CROMATOGRAFIA EM CAMADA	
DELGADA	56
5.2 RESULTADOS PARA BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM	
NEGATIVAS	57
5.3 RESULTADOS PARA FUNGOS	64
5.4 ENSAIO DA <i>Neurospora crassa</i>	67
5.5 ENSAIO DE TOXICIDADE (<i>Artemia salina</i>)	68
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS E DETALHE DAS PORINAS DAS GRAM NEGATIVAS	24
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR FÚNGICA	35
FIGURA 3	BIOSSÍNTESE DO ERGOSTEROL E DO COLESTEROL. OS QUADROS À DIREITA DAS FLECHAS MOSTRAM AS ENZIMAS QUE PARTICIPAM NESTA ETAPA DA BIOSÍNTESE. OS QUADROS À ESQUERDA DAS FLECHAS MOSTRAM INIBIDORES DESTAS ENZIMAS.....	38
FIGURA 4	FLOR DA <i>Acmela brasiliensis</i> SPRENG	39
FIGURA 5	ESTRUTURA MOLECULAR DO TERPENÓIDE ÁCIDO CAURENÓICO	41
FIGURA 6	ESTRUTURA MOLECULAR DO FLAVONÓIDE LUTEOLINA.....	42
FIGURA 7	ESQUEMA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DIRETAMENTE DE PLANTAS MEDICINAIS ORIENTADO PARA ANÁLISE BIOLÓGICA	47
FIGURA 8	ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO CAURENÓICO.....	61
FIGURA 9	ESTRUTURA MOLECULAR DA LUTEOLINA.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	CLASSIFICAÇÃO DAS MICOSES HUMANAS MAIS COMUNS	30
TABELA 2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS DAS FLORES E PLANTA INTEIRA DA <i>Acmela brasiliensis</i> SPRENG E OS COMPOSTOS PUROS (ÁCIDO CAURENÓICO E LUTEOLINA) CONTRA CEPAS PADRÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS	58
TABELA 3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS DAS FLORES E PLANTA INTEIRA DA <i>Acmela brasiliensis</i> SPRENG CONTRA CEPAS PADRÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS	64
TABELA 4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) PARA FUNGOS CONTRA FRAÇÕES DOS EXTRATOS DAS FLORES DA <i>Acmela brasiliensis</i> Spreng E DE DOIS COMPOSTOS PUROS (ÁCIDO CAURENÓICO E LUTEOLINA)	65
TABELA 5	TESTE DE TOXICIDADE ATIVIDADE PARA <i>Artemia salina</i> DAS FRAÇÕES HEXÂNICAS E DICLOROMETANO DOS EXTRATOS DAS FLORES E PLANTA INTEIRA DA <i>Acmela brasiliensis</i> SPRENG	69

Resumo da Dissertação apresentada à UNIVALI como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRAÇÕES DE
EXTRATOS E COMPOSTOS PUROS OBTIDOS DAS FLORES
DE *Acmela brasiliensis* SPRENG
(*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**

Mara Rúbia Keller Sartori

Julho/2005

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Palavras-chave: *Acmela brasiliensis*, *Wedelia paludosa*, atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima, luteolina, ácido caurenóico.

Número de páginas: 69

O crescente número de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas, trouxe um aumento da incidência de infecções bacterianas e fúngicas, as quais são a maior causa de morbidade e/ou mortalidade. As plantas utilizadas pela medicina popular são recursos promissores, no tratamento destas patologias, aliada às pesquisas que confirmem estas propriedades terapêuticas. Este enfoque é particularmente interessante para o Brasil, pois encontra-se aqui uma rica biodiversidade devido ao clima tropical e o tradicional uso de plantas medicinais. Foi escolhido para o estudo a *Acmela brasiliensis* Spreng (ASTERACEAE) anteriormente classificada como *Wedelia paludosa* DC. Esta é uma planta medicinal nativa do país, usada na medicina popular para tratar várias patologias, incluindo infecções do trato respiratório, inflamações e afecções em geral, revelando atividade antibacteriana e antifúngica. Este trabalho avaliou atividade antimicrobiana das frações de extratos das flores da *A. brasiliensis*, através do método de diluição, revelando atividade contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e dermatófitos (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*). As frações hexânicas, diclorometano e butanólica, demonstraram atividade, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 250 e 1000 µg/mL. Dois composto puros apresentaram atividade antimicrobiana. O ácido caurenóico apresentou atividade para dermatófitos (CIM de 50 a 100 µg/mL) e a luteolina apresentou CIM de 500 a 800 µg/mL para bactérias Gram positivas e CIM entre 125 e 250 µg/mL para dermatófitos. O ensaio para avaliação da toxicidade usando o microcrustáceo *Artemia salina* demonstrou que as frações mais ativas hexano e diclorometano não são tóxicas.

Abstract of Dissertation presented to UNIVALI as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmaceutical Science

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS, FRACTIONS AND PURE COMPOUNDS OF FLOWERS FROM

Acmela brasiliensis SPRENG

(*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)

Mara Rúbia Keller Sartori

July/2005

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Co-advisor: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Key words: *Acmela brasiliensis*; *Wedelia paludosa*; antifungal activity; minimum inhibitory concentration, kaurenoic acid, luteolin.

Number of pages: 69

The growing number of immunocompromised patients in the last two decades, led to an increase in the incidence of microbial and fungal infections, which have become a major cause of morbidity or/and mortality. One of the most promising sources of new antimicrobial compounds are plants used in folk medicine for treating ailments related with the searched activity, in this case, plants used to treat infections. This approach is particularly interesting in Brazil, which possess a biodiversity very rich because of its tropical climate and a long tradition in the usage of medicinal plants. The selected plant in this study was the *Acmela brasiliensis* Spreng (Asteraceae), in the past classified as *Wedelia paludosa* DC, a native Brazilian medicinal plant used in folk medicine against several disorders, including infections of the respiratory tract, inflammations, and affections in general, revealed antimicrobial and antifungal activity. This work evaluated antimicrobial activity of fractions of flowers extracts from *A. brasiliensis*, by dilution methods and revealed activity against Gram positives bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) and dermatophytes (*Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*). The hexane, dichloromethane and butanol fractions, showed activity, with minimum inhibitory concentration (MIC) between 250 and 1000 µg/mL. Two pure compounds showed antimicrobial activity. The kaurenoic acid and luteolin showed activity against dermatophytes (MIC = 50 to 100 µg/mL and 125 to 250 µg/mL, respectably) and Gram positives (MIC = 500 to 800 µg/mL). The plant extracts (fractions hexane and dichloromethane) available by microwell toxicity assay using *Artemia salina* showed no toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o uso irracional de antimicrobianos determinou o surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes, impulsionando a comunidade científica à pesquisa nas áreas de química, farmacologia e microbiologia para descoberta de novos agentes antimicrobianos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003). Linhas de pesquisas têm sido desenvolvidas com êxito por diversos pesquisadores, baseadas nas propriedades antinfeciosas e antiinflamatórias de muitas plantas de utilização consagrada pela medicina popular e poderão contribuir inovadoramente na terapêutica antimicrobiana (YAMAMOTO e OGAWA, 2002; HOLETZ *et al.*, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2003). Os produtos naturais são responsáveis direta ou indiretamente, por cerca de 40 % de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem pode chegar a aproximadamente 70 % (PHILLIPSON, 2000; YUNES e CALIXTO, 2001).

Os avanços constatados nos últimos anos na área da química medicinal e da biologia molecular, possibilitaram o surgimento de novos alvos biológicos, passando de 5 mil para 10 a 15 mil. A química combinatória permite sintetizar milhares de compostos em curto espaço de tempo, e técnicas de triagem em alta escala permitem que sejam testados milhares de compostos simultaneamente (ZACCHINO *et al.*, 2001). Programas computacionais auxiliam na modelação de moléculas ativas e a biotecnologia vem desenvolvendo novos fármacos recombinantes mais potentes e com ação seletiva em alvos moleculares bem definidos (BARREIRO, 2001).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (TAVARES, 1996; COELHO *et al.*, 2004). As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos que, por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (COWAN, 1999; CLARKE *et al.*, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003). Com o avanço das pesquisas, foram atribuídas às referidas substâncias, importâncias relevantes nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (LIMA, 2001; NIERO *et al.*, 2003). Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas

superiores, podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata a agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematóides ou em função de determinados estímulos, como radiações, agentes químicos e outras injúrias (GNANAMANICKAM, 1981; LIMA, 1996; YUNES *et al.*, 2001). As plantas produzem e estocam grande número de metabólitos secundários em diversas partes (folhas, caules, raízes, flores, sementes) que são liberados para o meio ambiente, sendo que muitos deles apresentam ação alelopática. A alelopatia tem sido definida como sendo a inibição da germinação, crescimento ou metabolismo de uma planta em função da liberação de substâncias químicas orgânicas por outra planta, e é reconhecida como importante mecanismo ecológico e agrícola melhorando a produtividade de colheitas (MALHEIROS *et al.*, 2001).

A terapia para infecções bacterianas e fúngicas, particularmente em paciente imunocomprometidos, representa um desafio para pesquisadores e clínicos. Os fármacos disponíveis estão “perdendo” para a resistência que os microrganismos adquirem frente ao uso não racional e pouco seguro dos medicamentos ou devido a toxicidade que provocam. Estudos que contribuam na obtenção de fármacos naturais, seguros, estáveis, padronizados e eficientes poderão servir como modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos e mais específicos contra bactérias, fungos, helmintos, protozoários, vírus, ou ainda como antitumorais. Esta especificidade também contribui para que se reduzam efeitos colaterais e indesejáveis ao hospedeiro, fato este, que muitas vezes limita a terapia medicamentosa instituída aos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de frações e compostos puros obtidos a partir do extrato das flores da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar a Concentração Inibitória e Bactericida Mínima das frações do extrato e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng.

2.2.2 Determinar a Concentração Inibitória e Fungicida Mínima das frações do extrato e compostos puros obtidos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng.

2.2.3 Propor possível mecanismo de ação antimicrobiana dos princípios ativos extraídos das frações das flores da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng.

2.2.4 Avaliar o potencial de toxicidade de extratos das flores e de planta inteira da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng pelo Método da *Artemia salina*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Em muitas civilizações antigas, a origem das plantas medicinais está relacionada ao poder divino. Segundo a mitologia hindu, quando o homem surgiu na Terra, o Deus Indra previu que os atos humanos desarmônicos podiam gerar males físicos e doenças. Pediu então a Brahma, o senhor absoluto, que insuflasse nas plantas o poder de curar. O pedido de Indra se realizou e foi assim que as plantas - até então todas semelhantes entre si - ganharam uma enorme diversidade de formas, aromas e virtudes terapêuticas. A mitologia grega conta que Apolo, compadecido ante o sofrimento que as doenças traziam aos homens, dotou as ervas de poderes curativos e transferiu esse conhecimento a seu filho Asclépio Deus da medicina, chamado de Esculápio pelos romanos (BONTEMPO, 1990).

Povos como os chineses, árabes, caldeus, egípcios, incas e muitos outros dominaram (no passado) os segredos da ação das plantas sobre o organismo humano. Na Idade Média e na Era Moderna, as escolas médicas só diplomavam aqueles que demonstrassem um profundo conhecimento sobre as plantas medicinais (YUNES *et al.*, 2001).

O fato de a matéria viva ser constituída em última análise, dos mesmos elementos que a matéria não viva, perturbou os cientistas e pensadores por um bom tempo. Porém, a observação da “força vital” no século XVIII, atribuída à química orgânica (teoria vitalista), vislumbrou o início da compreensão dos sistemas vivos: a existência de um padrão de organização inerente à vida (CAPRA, 1997; BIAVATTI, 2001).

Por volta de 1970, a Organização Mundial de Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa (paradigma oriental à base de extratos de plantas), onde surgem pesquisas e desenvolvimento de medicamentos obtidos de fontes naturais. Levantamentos realizados no período de 1981 a 2002 pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry* demonstraram que dentre 90 novas substâncias com potencial farmacológico analisadas, 61 delas eram derivados semi-sintéticos de plantas e eram oriundas de produtos naturais (SIXEL e PECINALLI, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003).

A medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para os mais diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (MITSCHER *et al.* 1987). Isto é justificado, em parte, pelo alto grau de aceitabilidade das plantas medicinais, bem como, a grande disponibilidade destes recursos, diferente do que ocorre com os medicamentos

industrializados, que na maioria, dependem de tecnologia e matéria-prima externas (AMORIM *et al.*, 2003.).

A quantidade de plantas existente no planeta, reconhecida sob o ponto de vista científico, situa-se entre 250 a 500 mil espécies, sendo que somente cerca de 5 % têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; YUNES *et al.*, 2001). O valor da biodiversidade, principalmente nas florestas tropicais, tem sido muito discutido pela indústria farmacêutica, devendo-se considerar ainda que os tratamentos baseados em produtos naturais são de uso corrente por 80 % da população mundial (JOYCE, 1994; BIAVATTI, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003). A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de plantas tem permitido descobrir muitos fármacos clinicamente úteis para tratar muitas doenças. No Brasil apenas 8% das espécies vegetais nativas foram estudadas em busca de moléculas bioativas (AMORIM *et al.*, 2003).

De acordo com Grifo e Rosenthal (1997), 57 % dos 150 medicamentos mais prescritos pelos médicos contém no mínimo um componente derivado da diversidade biológica. A Organização Mundial de Saúde considera como básicos e essenciais cerca de 250 medicamentos, sendo que 11 % são exclusivamente obtidos de plantas medicinais a partir de fonte natural (NIERO *et al.*, 2003). Biodiversidade refere-se ao número e variedade de genes, espécies, população, comunidades e ecossistemas que provém à base da vida no planeta. Espécies tropicais têm grande valor por suas naturezas química, devida em parte, às condições climáticas adversas e o ataque sem “trégua” dos seus predadores, desenvolvendo assim proteção química contra predadores, parasitas e microrganismos, podendo ser interessante fonte de substâncias para uso terapêutico humano. Especula-se que menos de 1 % do potencial químico oriundo da diversidade vegetal tenha sido explorado até o momento (LIMA *et al.*, 2001; NIERO *et al.*, 2003).

Baseados no conhecimento empírico sobre as propriedades terapêuticas de algumas plantas, desenvolveram-se alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina científica, como os digitálicos, quinina, morfina, atropina, aspirina, entre outros (SIMÕES *et al.*, 2003).

Dentre os vários exemplos demonstrando a importância dos estudos com plantas, podemos destacar a pilocarpina, alcalóide isolado de gênero *Pilocarpus* (ANDRADE NETO, 1989), empregado na preparação de uns dos poucos fármacos usados no combate do glaucoma (MATOS, 1990), a capsaicina extraída de *Capsicum* sp.. com ação anestésica, a colchicina

extraída da *Colchicum autumnale* com agente anti-reumático (YUNES *et al.*, 2001; NIERO *et al.*, 2003). Como agentes cardiovasculares citam-se os efeitos benéficos dos extratos de *Digitalis purpúrea* e *Digitalis lanata* que levaram à descoberta de glicosídeos cardíacos como a digoxina e a digitoxina (CLARK, 1996), um antiarrítmico – a quinidina, isolada da *Cinchona* sp.. e ainda a reserpina isolada da *Rauwolfia* sp.. com potente ação anti-hipertensiva (BARRETO, 2001; NIERO *et al.*, 2003).

Inúmeros alcalóides apresentam propriedades centrais, sobretudo derivados indólicos que ocorrem em plantas utilizadas pelos ameríndios e por povos africanos como bebidas sagradas em festas pagãs com propriedades alucinógenas. Dentre elas a iboimbina isolada da *Tabernanthe iboga*, que apresenta propriedades afrodisíacas e apresenta similaridade estrutural com a serotonina; a huperzina-A isolada da erva rasteira *Huperzia serratae* e a galantamina isolada da *Galantus nivalis* utilizadas para o tratamento da doença de Alzheimer; a bicuculina isolada da *Dicentra cucullaria* com emprego em neurofarmacologia; a hipericina um dos componentes do extrato alcoólico de *Hypericum perforatum* com propriedades antidepressivas (BARRETO, 2001).

A contribuição das plantas medicinais na área da oncologia, podem ser reiteradas com a citação dos alcalóides vimblastina e vincristina extraídas de *Catharanthus roseus*, utilizados no tratamento de linfomas e leucemias; o taxol, diterpeno isolado de plantas do gênero *Taxus* que se encontra disponível no mercado farmacêutico e vem demonstrando efeitos positivos em pessoas portadoras de câncer, principalmente de carcinoma ovariano e pulmonar; a camptotecina, alcalóide extraído da *Camptotheca acuminata* (KINGSTON, 1991; HORWITZ, 1994; BARRETO, 2001; NIERO *et al.*, 2003). Outros agentes que compõem o arsenal terapêutico no combate ao câncer são derivados semi-sintéticos de compostos extraídos das plantas como do docetaxol, derivado do taxol e apresenta maior solubilidade e o dobro da potência do composto natural; irinotecano usado no tratamento do câncer ovariano e cervical; o etoposídeo e tenoposídeo derivados sintéticos da podofilotoxina extraída do rizoma da *Podophyllum peltatum* (NIERO *et al.*, 2003). Os flavonoídes apresentam atividade anticâncer sendo demonstrada sua importância na alimentação (WILHELM FILHO *et al.*, 2001; CHOWDHURY *et al.*, 2002).

Os terpenóides e compostos esteróides são largamente distribuídos no reino vegetal e exibem distintas propriedades farmacológicas. Entre outras ações, os terpenóides que ocorrem naturalmente, apresentam propriedades antiinflamatórias e antinoceptivas, inibem a agregação plaquetária e interferem a nível intracelular em vários passos do mecanismo de transdução (CALIXTO *et al.*, 1998; 2000). O isolamento e identificação de vários terpenos com efeito

antinoceptivo, antiinflamatório, antimicrobiano, antiparasitário, tripanomicida, larvicida, hipoglicemiante tem sido demonstrado em estudos preliminares. O ácido caurenóico, componente da *Acmela brasiliensis* SRENG (ASTERACEAE) anteriormente conhecida por *Wedelia paludosa* é um diterpeno que apresenta os efeitos citados (BLOCK *et al.*, 1998 a,b; BRESCIANI *et al.*, 2000; SARTORI *et al.*, 2003; BRESCIANI *et al.*, 2004). Outras plantas como a *Annona glabra* (OLIVEIRA *et al.*, 2002), marrubín, a furanolactona diterpeno da *Marrubium vulgare*, folidotín e 24-metilenocicloartenal isolado do *Epidendrum mosenii*, moretenona e glutinol, isolado da *Sebastiania schottiana* (GAERTNER *et al.*, 1999), α -amyrin e β -amyrin da *Aleurites moluccana* (MEYRE-SILVA *et al.*, 1998), iquigoside F1 da *Rubus imperialis* (NIERO *et al.*, 1999) exibiram significativa ação antinoceptiva no ensaio com ácido acético, formalina e testes de capsaïcina (CALIXTO *et al.*, 2000). Terpenos polioxigenados do extrato da árvore *Ginkgo biloba*, os ginkgolídeos apresentam importantes propriedades anti-trombóticas entre outras (BARRETO, 2001).

Estudos preliminares têm demonstrado que vários flavonóides possuem relevantes ações biológicas que previnem acidentes vasculares, sendo utilizados pela indústria farmacêutica na preparação de agentes vasodilatadores como a diosmina e a rutina. Outros flavonóides como a quercetina e luteolina são abundantes na natureza e produzem significativa resposta antiinflamatória, antinoceptiva quando testados com ácido acético, formalina e capsaïcina (CALIXTO *et al.*, 2000), além de atividade antimicrobiana (SCHELEMPER *et al.*, 1998; SARTORI *et al.*, 2003), hipoglicemiante (NOVAES *et al.*, 2001).

Os flavonóides também têm demonstrado atividade antioxidante sendo amplamente encontrados nos alimentos de origem vegetal, como frutas, vegetais, sementes, flores e folhas, fazendo parte da dieta humana. As oxidações biológicas realizadas através do oxigênio molecular representam a principal fonte de energia utilizada pela maioria de plantas (fotossíntese) e animais (respiração mitocondrial). Estas reações bioquímicas se desenvolvem de tal maneira que geram produtos secundários, na ordem de 2 % dos produtos finais (H_2O e CO_2). Estes intermediários da redução parcial do oxigênio são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e possuem reatividade química mais acentuada que o oxigênio molecular. Os radicais ERO são: o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ($-OH$), o radical ROO^- e o oxigênio singlete (O_2) e fazem parte do processo de lipoperoxidação (BOVERIS *et al.*, 2000; WILHELM *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002).

Grande interesse tem sido voltado para o papel das ERO na etiologia de várias doenças. As propriedades antioxidantes dos flavonóides têm, assim, atraído a atenção para a

nutrição preventiva, pois eles protegem os constituintes alimentares contra o dano oxidativo, podendo contribuir na prevenção de patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, cânceres e outras (CHOWDHURY *et al.*, 2002; SCHROEDER-VAN DER ELST *et al.*, 2003; UEDA *et al.*, 2004). Existem relatos de que os flavonóides exibem efeitos biológicos, tais como, ação antimicrobiana, antiviral, antimalaria, antiinflamatória, antialérgica e vasodilatadora, e capacidade neuroprotetora (HANASAKI *et al.*, 1994; BOVERIS *et al.*, 2000; PHILLIPSON, 2000; DAJAS *et al.*, 2003). Além disso, inibem *in vitro* a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, a permeabilidade capilar, a fragilidade capilar, e a atividade de enzimas, como ciclo-oxigenase e lipooxigenase (BOVERIS *et al.*, 2000). Os flavonóides exercem esses efeitos como antioxidantes, seqüestradores de ERO, quelantes de cátions divalentes e como seqüestrantes de peroxinitrito (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2000; YUNES e CALIXTO, 2001).

Extratos naturais de misturas herbáceas têm sido usados empiricamente há milhares de anos no tratamento de processos infecciosos. Alguns têm demonstrado propriedades bacteriostáticas, não destruindo as bactérias, mas impedindo-as de se multiplicarem com conseqüente diminuição da possibilidade de ocorrência de mutações bacterianas (CAPRA, 1997; PHILLIPSONS, 2000). Muitos estudos estão voltados para o potencial antimicrobiano das plantas medicinais como o diterpeno biflorina isolado das raízes de *Capraria biflora*; o triterpeno maitenina isolado de espécies das famílias Velasteraceae e Hippocrateaceae; primina e miconidina isolado da *Miconia* sp.; alcalóides como anonaína e isoboldina da *Annona sazmani* (LIMA, 2001) e filantimida isolada de *Phyllanthus sellowianus*; flavonóides como luteolina (SCHELEMPER *et al.*, 1998; SARTORI *et al.*, 2003); xantoxilina constituinte da *Sebastiania schottiana*, extratos de *Polygonum* sp. e *Xanthium* sp. com significativa ação antifúngica (ZACCHINO *et al.*, 1998). A relevância destes compostos dentro da farmacologia é devida às ações analgésicas, antiespasmódicas, antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias, antiviral sendo que a correlação entre o uso popular e a atividade farmacológica positiva para os agentes antimicrobianos é de 55,2 % (BRITO, 1993; LIMA, 2001).

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microrganismos. Embora vários estudos tenham avaliado e confirmado as propriedades antimicrobianas em diferentes extratos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (PEDERSON, 1944), verificou-se também, que outros extratos estimulavam de modo acentuado, o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (SANDERS, 1945).

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos (1948) que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas, indicadas em terapêutica como antiinflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus X-19*.

A partir de 1950 foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais: o diterpeno biflorinina, e o triterpeno maitenina. Outros compostos flavonóides com propriedades antimicrobianas efetivas contra *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foram isolados, como a primina, a miconidina, lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, filantimida, luteolina, mirecetina (XU e LEE, 2001; ZACCHINO *et al.*, 2001).

Com relação aos antifúngicos, pesquisa-se fármacos com alvos específicos, para diminuir a toxicidade, já que células fúngicas e humanas são semelhantes e compartilham de muitas vias metabólicas intermediárias, onde há enzimas similares. As pesquisas, no que tange aos antifúngicos, buscam inibidores da biossíntese do ergosterol, da inibição das topoisomerasas ou ainda da parede celular fúngica (ZACCHINO *et al.*, 2001).

3.3 BACTÉRIAS

Bactérias são células procarióticas uni ou pluricelulares, com organização celular relativamente simples. Apresentam tamanho em média de 1 a 2 μm por 1 a 4 μm , com membrana citoplasmática (FIGURA 1) sem esteróides apresentando cadeias de peptidoglicanos que vão influenciar na forma da bactéria dependendo do tamanho destas cadeias e da quantidade de interligações existentes entre os peptidoglicanos. A membrana

nuclear está ausente e o ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma macromolécula em forma de dupla fita circular, com comprimento de aproximadamente 1.100 nm, altamente empacotada. Os ribossomos 70S estão distribuídos no citoplasma (TRABULSI *et al.*, 1999). Podem ser autotróficas (fotossintéticas ou quimiossintéticas) ou heterotróficas (saprófitas e parasitas).

A parede celular das bactérias Gram positivas são compostas de aproximadamente 90 % de peptidoglicanos diferindo das Gram negativas que é mais complexa (TRABULSI *et al.*, 1999).

Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ ou membrana celular, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou sínteses de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microrganismos (RANG *et al.*, 1997; TRABULSI *et al.*, 1999).

3.3.1 Membrana citoplasmática bacteriana

Estrutura de aproximadamente 8 nm de espessura, responsável pela separação do citoplasma (meio interno) com o meio externo. É composta de 60 % de proteínas imersas em uma bicamada fosfolipídica (40 %), variando entre diferentes espécies bacterianas e condições de cultivo. Os ácidos graxos dos lipídios são responsáveis pela condição hidrofóbica da porção interna da membrana enquanto a parte hidrofílica dos mesmos fica exposta ao meio externo aquoso. Além das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, cátions como Mg^{+2} e Ca^{+2} são responsáveis pela manutenção da integridade da membrana (BARON e FINEGOLD, 1990).

Como funções da membrana plasmáticas têm-se (BARON e FINEGOLD, 1990; SCHAECHTER *et al.*, 2002):

- 1- Transporte de solutos – A membrana plasmática atua como barreira altamente seletiva, porém, moléculas hidrofílicas polares como ácidos orgânicos, aminoácidos e sais minerais não conseguem passar livremente pela membrana e portanto são transportados com o auxílio de “proteínas de transporte de membrana”. A maioria das proteínas envolvidas no transporte está localizada ao longo da membrana com porções expostas tanto ao citoplasma como ao meio externo. Através de mudança conformacional na proteína, o soluto que se ligou do lado externo é liberado para o lado interno. Este mecanismo de transporte que envolve proteína transportadora e que ocorre sempre a favor de gradiente, denomina-se difusão facilitada. Os solutos também podem ser transportados contra um

gradiente de concentração, sendo necessário gasto energético. Esta energia pode ser obtida de compostos com ligações fosfato como o fosfoenolpiruvato, ou outra reação que libere energia na célula ocorrendo de duas maneiras: ou por transporte ativo onde a substância a ser transportada se liga a um carreador utilizando ATP, ou por translocação de grupo onde a substância é alterada quimicamente durante a passagem pela membrana (fosforilação da molécula).

- 2- Produção de energia por transporte de elétrons e fosforilação oxidativa envolvendo citocromos e enzimas da cadeia de transporte de elétrons.
- 3- Biossíntese - enzimas de síntese de lipídios da membrana e outras macromoléculas que compõem estruturas externas à membrana (peptidoglicanos, ácidos teicóicos, lipopolissacarídeos e polissacarídeos extracelulares) ligada à membrana citoplasmática. Depois de sintetizadas, as macromoléculas são permeadas ao lado externo por canais denominados de junções de Bayer. Estes prolongamentos da membrana ligam-se à membrana externa de bactérias Gram negativas estabelecendo contato entre o citoplasma e o limite externo da célula.
- 4- Duplicação do DNA
- 5- Secreção - a membrana secreta enzimas hidrolíticas que rompem macromoléculas que serão fontes de nutriente.

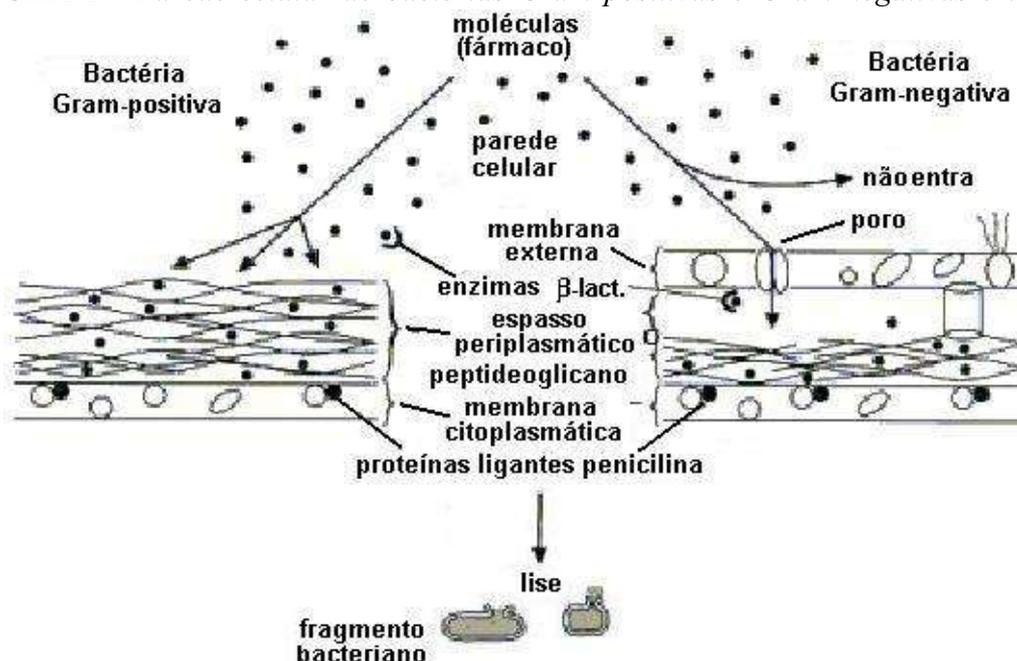
3.3.2 Parede Celular

É responsável pela manutenção da forma bacteriana e desempenha papel na divisão celular. As bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças marcantes sendo relevante ao estudo dos mecanismos de ação dos quimioterápicos e patogenicidade. A rigidez da parede celular é devida a uma camada composta de peptidoglicanos. Nas Gram positivas esta camada atinge de 15 % a 50 % da massa seca da célula e nas Gram negativas não ultrapassa 5 %. A forma da célula é determinada pelo comprimento das cadeias de peptidoglicano e pela quantidade de interligações existentes entre estas cadeias (BARON e FINEGOLD, 1990; RANG *et al.*, 1997).

Os agentes antimicrobianos se difundem com mais facilidade através da parede celular das Gram positivas, porém devem atravessar os canais de porinas nas Gram negativas (BARON e FINEGOLD, 1990).

As propriedades da parede nas bactérias Gram positivas são: facilitar a ligação e regulação da entrada e saída de cátions na célula; regular a atividade das autolinas durante o processo de divisão celular; constituir sítios receptores de bacteriófagos; servir de sítio de ligação com o epitélio do hospedeiro; e, devido à presença de antígenos celulares possibilita identificação sorológica de espécies bacterianas (BARON e FINEGOLD, 1990; TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

FIGURA 1 - Parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas e detalhe das



porinas das Gram negativas.

Fonte: Baron, 2005.

3.3.3 Bactérias Gram positivas

Staphylococcus aureus

Estafilococos são cocos Gram positivos da família Micrococcaceae, catalase positivos. Os estafilococos são amplamente encontrados na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa. O gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 27 espécies, sendo algumas delas causadoras de infecções de caráter oportunista em seres humanos e animais, como o *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*. Um marcador de patogenicidade destes microrganismos é a capacidade de coagular o plasma (TRABULSI *et al.*, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001).

O *Staphylococcus aureus* é a espécie que geralmente está envolvida em infecções piogênicas humanas tanto de origem comunitária como hospitalar, localizadas na pele (foliculites, furunculose, impetigo, pústulas ou abscessos cutâneos) ou em regiões mais profundas (osteomielites, bacteremias, endocardite, pneumonia e toxinfecções alimentares). Atualmente, a espécie coagulase negativa, também tem sido responsável por infecções graves em pacientes imunocomprometidos, ou submetidos a implantes de orteses e próteses, nos ambientes hospitalares (RANG *et al.*, 1997; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

O tratamento de escolha para infecções estafilocócicas é a penicilina para amostras sensíveis, porém, o surgimento e disseminação de amostras resistentes, atribuído à produção de enzimas denominadas penicilinases ou betalactamases, codificadas por genes plasmidiais, vem limitando a utilização deste fármaco. Também foi detectado o aparecimento de resistência ao uso de meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas (oxacilina, nafcilina, cloxacilina) após dois anos do início do seu uso, resistência esta, relacionada às proteínas ligadoras de penicilinase (PBP), sendo que seus determinantes genéticos parecem ser cromossomais. Atualmente, no caso de infecções graves com *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, as alternativas terapêuticas são os glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina), mas que já há relatos de cepas pan resistentes (TRABULSI *et al.*, 1999; MIMS *et al.*, 1999; ANWAR e BOKHARI, 2003).

Staphylococcus saprophyticus

Esta espécie pode ser encontrada na microbiota normal da pele e região periuretral do homem e da mulher, sendo patógeno oportunista em infecções do trato urinário. Sua patogenicidade parece estar relacionada a sua capacidade de se aderir às células do trato urinário (TRABULSI *et al.*, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001).

Streptococcus agalactiae

Os estreptococos pertencem à família Streptococcaceae. Estão amplamente distribuídos na natureza (água, vegetação, leites e derivados), fazem parte da microbiota normal, mas muitas espécies são responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas (TRABULSI *et al.*, 1999).

O *Streptococcus agalactiae* comporta os estreptococos do grupo B classificação de Lancefield. São encontrados na microbiota normal em vias aéreas superiores, trato intestinal e vagina. Sua importância clínica, nos últimos anos, tem sido ressaltada devida ser agente etiológico de meningites, septicemias e pneumonias em neonatos. *Staphylococcus agalactiae*

são regularmente sensíveis a penicilinas, com concentrações inibitórias mínimas mais altas que as encontradas para o *Staphylococcus pyogenes*, cefalosporinas, eritromicina e cloranfenicol (MIMS *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Bacillus cereus

O gênero *Bacillus* compreende bacilos Gram positivos anaeróbios facultativo formadores de esporos, pertencentes à família Bacillaceae. A importância clínica do *Bacillus cereus* é a de ser responsável por intoxicações alimentares, podendo também participar de infecções cutâneas acompanhadas de necrose ou gangrena, bacteremia e septicemia e mais raramente pneumonias, meningites, infecções oculares, etc. (RANG *et al.*, 1997; TRABULSI *et al.*, 1999).

3.3.4 Bactérias Gram negativas

Escherichia coli

O gênero *Escherichia* pertence família Enterobacteriaceae, sendo bacilos Gram negativos, móveis ou não. Fazem parte da microbiota intestinal, tornando-se patogênico em localizações extra intestinais ou mesmo intestinais. Em meio de cultivo EMB (Eosina Azul de Metileno), apresenta colônias esverdeadas, com brilho metálico e geralmente com centro mais escuro. Esta espécie compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados com anti-soros preparados com três tipos de antígenos que ocorrem na espécie: O, K e H. Os sorogrupos que são encontrados na microbiota intestinal podem causar infecções urinárias, meningites e septicemia e outros tipos de infecção. Provavelmente, nenhuma outra espécie bacteriana é tão versátil em sua patogenicidade como a *E. coli*. Com relação às infecções intestinais, há pelo menos seis categorias conhecidas: *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxicogênica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC) (TRABULSI *et al.*, 1999; MIMS *et al.*, 1999; BARON e FINEGOLD, 1990; ANWAR e BOKHARI, 2003).

Proteus sp.

O gênero *Proteus* inclui *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* sendo encontrados regularmente nos intestinos do homem. Causam infecções principalmente no trato urinário sendo a primeira causa de infecções comunitárias e a segunda associada a infecções hospitalares. Estes microrganismos hidrolisam uréia formando amônia, tornando assim a urina dos pacientes com infecções crônicas muito alcalinas, fato que favorece formação de cálculos renais devido à diminuição da solubilização do cálcio. Bactérias do gênero *Proteus* apresentam resistência natural as polimixinas, um grupo de antibiótico bastante ativo contra as demais enterobactérias e outros Gram negativos (TRABULSI *et al.*, 1999; ANWAR e BOKHARI, 2003).

Salmonella sp.

A classificação atual divide este gênero em duas espécies, baseando-se nas características bioquímicas: *Salmonella enterica*, que está subdividida em seis subespécies, e *Salmonella bongori*. São microrganismo não fermentadores da lactose e apresentam colônias incolores e transparentes no meio de cultura MacConkey (KONEMAN *et al.*, 2001). Na rotina clínica, a identificação baseia-se no esquema Kauffmann e White, que divide o gênero em tipos sorológicos, baseando-se na composição antigênica das Salmonelas com relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar). O homem é o único reservatório natural de *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi* A, B e C. A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. A capacidade invasora das salmonelas é um processo complexo, envolvendo tanto genes cromossomais como plasmidiais. As infecções por *Salmonella* são geralmente autolimitadas, sendo que o uso de agentes antimicrobianos além de não acelerar a recuperação do paciente pode selecionar cepas resistentes. Nos casos de complicações sistêmicas e na febre tifóide utiliza-se ampicilina, cloranfenicol ou sulfametoxazol-trimetoprima, tanto na fase aguda da doença como para tratamento de portadores (TRABULSI *et al.*, 1999; MIMS *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Enterobacter sp.

São anaeróbios facultativos, fermentam glicose e lactose como fonte de carbono, produzindo gás, em meio de cultivo específico formam colônias grandes, mucóides e róseas transparentes com o centro amarronzado sem brilho metálico. Este gênero tem tido crescente importância como microrganismo causador de infecções hospitalares, sendo que alguns

pacientes hospitalizados apresentam bacteremia decorrente da aplicação endovenosa de líquidos contaminados (BARON e FINEGOLD, 1990; TRABULSI *et al.*, 1999).

Pseudomonas sp.

O gênero compreende grande número de espécies, sendo que 90 % dos isolamentos das amostras clínicas correspondem a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia* e *Pseudomonas cepacia*, sendo a primeira responsável por 70 % das infecções. Uma das características da espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina e pioverdina. A *Pseudomonas aeruginosa* habita solo, água e vegetais, podendo ser encontrada também na pele, fezes, garganta em 3 a 5 % dos indivíduos normais. Em pacientes hospitalizados a colonização pode ser bastante elevada. Este microrganismo causa infecções tipicamente oportunistas, em processos cirúrgicos, queimaduras, pós cateterização urinária, pneumonias principalmente após procedimentos de entubação, podendo resultar em bacteremias severas. A identificação do microrganismo é feita através de suas características bioquímicas e produção de pigmento das cepas isoladas do material proveniente do processo infeccioso. A *Pseudomonas sp* é naturalmente resistente aos antimicrobianos betalactâmicos e as tetraciclina, cloranfenicol, clotrimoxazol e outros. É sensível aos aminoglicosídeos e algumas penicilinas semi-sintéticas (carbenicilina) (BARON e FINEGOLD, 1990; TRABULSI *et al.*, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2002).

3.4 FUNGOS

O atual interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos pode ser parcialmente explicado pelo aumento acentuado do número de casos de SIDA e subsequente supressão do sistema imune em pacientes doentes. Por exemplo, mais de 90 % dos diagnósticos de HIV-positivos adquirem uma infecção fúngica durante o curso da doença. Em particular, algumas formas de dermatomicoses são causa de grande morbidade em pacientes recebendo quimioterapia antineoplásica, transplantados e nos extremos de idade como idosos e neonatos (ARMSTRONG *et al.*, 1989; SELITRENNIKOFF *et al.*, 1992; WALSH *et al.*, 1992; SCHLEMPER *et al.* 1998; BLOCK *et al.*, 1998b; PHILLIPS *et al.*, 2001; LACAZ *et al.*, 2002) Estas infecções são produzidas por um grupo de fungos que caracteristicamente infectam áreas queratinizadas do corpo e freqüentemente são de difícil erradicação, sendo que

novos e efetivos agentes antifúngicos tópicos são necessários (ZACCHINO *et al.*, 1998; 2001; PHILLIPS *et al.*, 2001).

Uma das mais promissoras fontes de pesquisa, para novos compostos biológicos ativos são plantas usadas na medicina tradicional, muitas delas ainda não investigadas do ponto de vista da composição química ou de sua atividade farmacológica (ZACCHINO *et al.*, 1998; 2001; URBINA *et al.*, 2000; SARTORI *et al.*, 2003).

3.4.1 Dermatófitos

No passado as infecções fúngicas eram classificadas como micoses superficiais, subcutâneas e profundas. O advento da terapia antimicrobiana de amplo espectro e a utilização de fármacos imunossupressores e citotóxicos para tratamento de patologias metabólicas crônicas e neoplásicas trouxeram uma mudança etiológica entre os fungos patógenos e “contaminantes”, fazendo com que a classificação das micoses fosse revista (FISHER e COOK, 2001).

A Tabela 1 abaixo apresenta uma classificação das micoses que mais frequentemente acometem o homem, especialmente pacientes imunocomprometidos.

Os fungos causadores de micoses profundas são sempre patógenos e potencialmente capazes de produzir enfermidades graves. Os agentes fúngicos como *Aspergillus fumigatus* ou membros dos gêneros *Zygomycetes* (*Phycomycetes*), *Nocardia* e *Candida*, antes considerados contaminantes com pouca importância clínica, são atualmente reconhecidos como causadores de patologias generalizadas e até fatais para o hospedeiro submetido a imunossupressão (WALSH *et al.*, 1992; FISHER e COOK, 2001; LACAZ *et al.*, 2002).

Outros fungos ambientais, como *Scopulariopsis*, *Fusarium* e *Cladosporium*, antes não reconhecidos como causadores de doenças, são hoje considerados agentes etiológicos ocasionais de endocardites, queratinites micóticas e outras enfermidades broncopulmonares alérgicas como a síndrome pulmonar de granjeiros. Algumas destas espécies produzem também aflatoxinas, que podem provocar transtornos gastrointestinais ou manifestações neurológicas ao serem ingeridas por homens e animais (WALSH *et al.*, 1992; KONEMAN *et al.*, 2002).

TABELA 1 - Classificação das micoses humanas mais comuns.

MICOSES PROFUNDAS	MICOSES OPORTUNISTAS	MICOSES SUBCUTANEA	MICOSES SUPERFICIAIS
Blastomicoses	Actinomicoses*	Actinomicoses*	Dermatomicoses Tinea capitis Tinea corporis Tinea cruris Tinea pedis Tinea versicolor
Coccidioidomicoses	Aspergiloses	Cromomicoses	
Criptococoses	Candidíase	Maduromicoses	
Histoplasmoses	Geotricoses	Nocardioses*	
Paracoccidioidomicoses (blastomicoses sulamericana)		Esporotricoses	

*Os membros da família *Actinomycetaceae*, incluindo os gêneros *Actinomyces* e *Nocardia*, são considerados atualmente bactérias e são classificados dentro da ordem *Schizomycetes*.

Fonte: Koneman, 2001.

3.5 ANTIMICROBIANOS

O uso de substâncias químicas e derivadas de plantas é tão antigo quanto a humanidade, mas somente com o crescente desenvolvimento da alquimia a partir do século XVI, as drogas medicinais passaram a serem obtidas por métodos laboratoriais. Inicialmente, foram testados os fenóis, cresóis, formol e outras substâncias químicas, as quais se comportaram de forma eficiente na destruição dos microrganismos, porém de forma não seletiva, restringindo assim seu uso na terapêutica antiinfeciosa devido a toxicidade que provocam à célula hospedeira. A pesquisa planejada conduziu à descoberta das primeiras substâncias que utilizadas em doses adequadas, eram capazes de destruir os microrganismos sem destruir a vida humana (TAVARES, 1984; MIMS *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

Evidências do uso do quinino extraído de folhas das árvores de chinchona, pelos índio peruanos, para o tratamento de malária, de outras substâncias extraídas de bolores com ação antibacteriana e antifúngica pelos chineses para o tratamento de doenças infecciosas e substâncias isoladas de plantas foram a emetina utilizada contra amebíase e a ipecacuanha utilizada no tratamento de diarreias (TAVARES, 1984; NIERO *et al.*, 2003), datam de 3000 anos atrás. Os sumérios recomendavam emplastros com uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixa (RANG *et al.*, 1997) e estes tratamentos marcam o início da quimioterapia

bem sucedida (RANG *et al.*, 1997; NEU e GOOTZ, 2004).

A moderna quimioterapia teve início na Alemanha com Paul Ehrlich com o uso de p-rosanilina para tratamento de tripanosomíase e arsfenamina contra sífilis, postulando que seria possível encontrar agentes químicos que fossem seletivamente tóxicos para parasitas e não tóxicos para seres humanos.

A partir dos trabalhos de Pasteur e Koch em 1878, ficaram demonstradas as origens infecciosas das enfermidades que acometiam homens e animais (TAVARES, 1984; RANG *et al.*, 1997; MIMS *et al.*, 1999).

Em 1930, Gerhard Domagk descobre os efeitos protetores do prontosil, precursor das sulfonamidas. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, deu início a era da antibioticoterapia. O advento da antibioticoterapia contribuiu com um aumento da expectativa de vida de várias doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e de alta mortalidade (SCHAECHTER *et al.*, 2002). O isolamento da penicilina G ocorre em 1939 na Universidade de Oxford por Florey e colaboradores, marcando o início de seu uso terapêutico (NEU e GOOTZ, 2004). A quimioterapia sulfamídica e a penicilina impulsionaram as pesquisas e começaram a surgir por síntese orgânica ou biossíntese, novas substâncias ou fármacos com espectro de ação não só para bactéria, mas também com atividade antifúngica que atuavam por via tópica ou sistêmica em diversas micoses (LACAZ *et al.*, 2002).

Em 1944, Waksman isolou a estreptomicina e subsequente descobriu-se agentes como o cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina em amostras do solo. Por volta de 1960, com o desenvolvimento de técnicas de fermentação e o avanço da química medicinal permitiram a síntese de inúmeros agentes quimioterápicos por modificação molecular dos compostos já existentes (NEU e GOOTZ, 2004).

As reações adversas aos medicamentos antimicrobianos são restrição importante ao seu uso terapêutico. Para amenizar estes efeitos adversos, procura-se estudar compostos que apresentem seletividade de ação. O trimetropim é um medicamento que atua no bloqueio da enzima catalisadora da síntese de ácido fólico. Na concentração de 0,005 mM, o trimetropim inibe apenas a enzima presente na bactéria (RANG *et al.*, 1997; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

O uso abusivo e indiscriminado da penicilina para o tratamento das infecções bacterianas trouxe a constatação de que algumas patologias não cediam ao seu uso. Observou-se também que alguns microrganismos que anteriormente eram sensíveis estavam tornando-se resistentes (MIMS *et al.*, 1999; LIMA, 2001).

3.5.1 Classificação dos agentes antimicrobianos

3.5.1.1 Agentes Antibacterianos

A classificação dos antibacterianos segue diversos critérios como estrutura química, mecanismo de ação, espectro de ação entre outros (RANG *et al.*, 1997; MIMS *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Segundo o mecanismo de ações os grupos de agentes antimicrobianos, podem ser classificados em:

A) Inibidores da Síntese de Parede Celular Bacteriana

A parede celular bacteriana de Gram positivos contém peptidoglicanos, ácido teicóico e teicurônico e as bactérias podem estar rodeadas por proteínas ou envelope de polissacarídeos. Bactérias Gram negativas contém na parede celular peptidoglicanos, lipopolisacarídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e proteínas. O sítio de ataque dos agentes que agem contra a parede celular é a camada de proteção de peptidoglicano que reveste a membrana celular bacteriana. Os antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular atuam produzindo uma parede com defeitos estruturais atuando sobre o processo de replicação celular causando dano ou perdas nesta camada destruindo a rigidez da parede celular e resultando na morte celular. Esta ação é seletiva, visto que as células dos hospedeiros mamíferos não apresentam parede celular (RANG *et al.*, 1997; MIMS *et al.*, 1999).

- a) Fármacos que inibem a biossíntese de enzimas - Fosfomicina, Cicloserina.
- b) Fármacos que combinem com substratos da parede celular – Vancomicina.
- c) Fármacos que combinem com carreadores de moléculas – Bacitracina.
- d) Fármacos que inibem a polimerização e compressão de novos peptidoglicanos à parede celular - Penicilinas, Cepalosporinas, Carbapenens, Monobactams.

B) Inibidores da Membrana Citoplasmática

A membrana citoplasmática esta localizada abaixo da parede celular e circunda o citoplasma. Apresenta dupla camada lipídica (33 % de lipídeos) com elevado conteúdo de proteínas (66 %), estando os lipídeos com seus grupos polares orientados para fora e as cadeias apolares voltadas para o interior da membrana e possuem permeabilidade seletiva que controla a passagem de substâncias e nutrientes para dentro da célula e a saída de catabólitos dela (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Os antibióticos que atuam por alterações físico-químicas da membrana citoplasmática assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças a presença em sua molécula de grupamentos básicos NH_3^+ e de uma cadeia lateral de ácido graxo. Quando alcançam a membrana citoplasmática, o ácido graxo mergulha na sua parte lipídica e a porção básica permanece na superfície. A intercalação das moléculas do antibiótico na membrana provoca sua desorganização alterando sua permeabilidade seletiva com a saída de elementos vitais à célula como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucléicos ou a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano, resultando em morte celular (RANG *et al.*, 1997; TRABULSI *et al.*, 1999).

A morte da célula bacteriana pode ocorrer por danos ao sistema respiratório da célula, e por alterações nos constituintes resultando em uma má formação da membrana (SCHAECHTER *et al.*, 2002). Podem ser classificados como:

- a) Fármacos que desorganizam a membrana citoplasmática - Tirociclina, Polimixinas.
- b) Fármacos que produzem poros na membrana - Gramicidinas.
- c) Fármacos que alteram estrutura dos fungos - Polienos (Anfotericina).
- d)** Imidazóis - Cetoconazol, Fluconazol (MIMS *et al.*, 1999; NEU e GOOTZ, 2004).

C) Inibidores da Síntese de Ácidos Nucléicos

Agentes antimicrobianos podem interferir em diferentes níveis na síntese de ácidos nucléicos. A inibição pode ser da síntese de nucleosídeos ou interconversão. Para iniciar a síntese de DNA é necessária a ativação prévia de uma enzima para produzir o desenrolar da dupla fita de DNA e introduzir uma superespiral negativa. Esta enzima é a DNA-girase ou topoisomerase II, e a polimerase pode interferir na replicação e transcrição do DNA. (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

- a) Inibidores do metabolismo de nucleotídeos – Adenosina arabinose (vírus), aciclovir (vírus), Flucitosina (fungos).
- b) Agentes que prejudicam a função do DNA – Agentes intercaladores, Cloroquina (parasitas).
- c) Inibidores da replicação do DNA – Quinolonas, Nitroimidazóis.
- d)** Inibidores da RNA polimerase – Rifampicina (RANG *et al.*, 1997; NEU e GOOTZ, 2004).

D) Inibidores da função dos ribossomas:

Alguns agentes se ligam ao ribossoma 30S e parecem inibir a ligação do aminoacil-tRNA no sítios dos ribossomas bacterianos, outros inibem a subunidade 50S ribossomal onde inibe a formação do peptídeo por ligação a enzima peptidiltransferase no ribossoma 50S ou reações de translocação.

- a) Inibidores da Unidade 30S – Estreptomicina, Canamicina, Gentamicina, Amicacina, Espectinomicina, Tetraciclina.
- b) Inibidores da Unidade 50S – Cloranfenicol, Clindamicina, Eritromicina, Ácido fusídico.

E) Inibidores do Metabolismo dos Folatos:

Agentes que interferem com o metabolismo de folato na célula bacteriana por competitividade bloqueando a biosíntese da tetrahydrofolato, o qual atua como carreador de fragmentos do carbono – um e é necessário para o término da síntese do DNA, RNA e proteínas da parede celular.

- a) Inibidor da síntese do ácido pteróico – Sulfonamidas.
- b) Inibidores da dihydrofolato redutase – Trimetoprim.

3.5.1.2 Agentes Antifúngicos

Os antifúngicos existentes no mercado atualmente possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se levam em consideração os efeitos colaterais como a nefro e a hepatotoxicidade. Entre alguns exemplos de antifúngicos que apresentam efeitos tóxicos cita-se a anfotericina B, e o cetoconazol. O fato de alguns antifúngicos apresentarem ação fungistática e não fungicida (azóis), podem contribuir para o surgimento de cepas resistentes. (RANG *et al.*, 1997; ZACCHINO *et al.*, 2003).

Muitos dos fármacos atualmente disponíveis apresentam efeitos colaterais indesejáveis, eficácia duvidosa contra fungos reemergentes, ou desenvolvem uma rápida resistência sendo necessário urgentemente uma nova geração de agentes antifúngicos. As pesquisas estão orientadas na investigação de fármacos antifúngicos, que possam atuar seletivamente na célula fúngica sem inibir nenhum sistema bioquímico do hospedeiro.

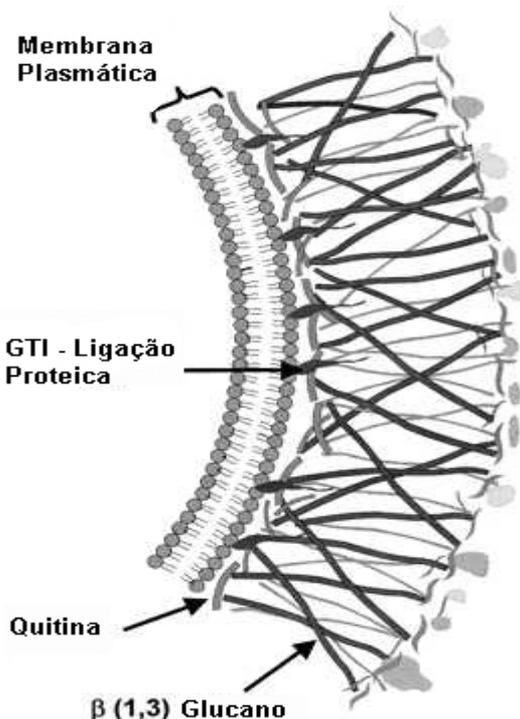


FIGURA 2 - Representação da estrutura da parede celular fúngica

Fonte: Selitrennikoff, 2001

Os fungos possuem paredes celulares (FIGURA 2), sendo uma estrutura essencial para eles, diferentemente das células dos mamíferos, e este fato faz com que todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformem em alvo útil para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos com maior especificidade (WALSH *et al.*, 1992; SELITRENNIKOFF *et al.*, 1995; LÓPEZ *et al.*, 2001; ZACCHINO *et al.*, 2001; SELITRENNIKOFF, 2001). Infelizmente, as células fúngicas e humanas apresentam muitas semelhanças. Compartilham a maioria das vias de metabolismo intermediário, utilizando enzimas muito similares não sendo fácil encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para obter-se um antifúngico seguro. Os alvos que apresentam maior possibilidade de levar a antifúngicos seletivos são os inibidores da biossíntese do ergosterol, a inibição das topoisomerases fúngicas e a inibição da parede celular fúngica (URBINA *et al.*, 2000; ZACCHINO *et al.*, 2001; LACAZ *et al.*, 2002).

A parede celular fúngica como alvo extremamente útil para detectar antifúngicos seletivos e, portanto não tóxicos para o hospedeiro, surgiu recentemente. Já que a parede celular fúngica é uma barreira protetora, evita sua ruptura osmótica e lhe confere forma, é

essencial para seu crescimento e viabilidade. Ela é constituída por muitos componentes macromoleculares, entre eles β -glicanos, quitina, manoproteínas e outras proteínas. Uma vez sintetizados, eles interagem entre si, via uma série de enzimas associadas à parede, realizando-se ligações cruzadas, ramificações e outras funções. Três atividades enzimáticas têm demonstrado serem essenciais para a formação da parede celular fúngica: 1,3 β -glicano sintetase, 1,6 β -glicano sintetase e quitina sintetase que catalisam a formação de 1,3 e 1,6- β -glicanos e quitina respectivamente, sendo portanto, alvos atrativos para o descobrimento de novos fármacos antifúngicos (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Apesar dos inibidores da biossíntese do ergosterol terem demonstrado uma grande seletividade, eles podem inibir vias comuns de biossíntese de esteróides humanos, o que os tornam potencialmente tóxicos. A investigação de antifúngicos seletivos é direcionada para a inibição da etapa de adição de um grupo metil no C-24 da cadeia lateral dos esteróides. O mecanismo de ação do doador do grupo metil é a S-adenosil metionina. A etapa da biossíntese do ergosterol, como a 24 metilação, no C-24 da cadeia lateral dos esteróides é uma das áreas mais promissoras da investigação de antifúngicos seletivos, já que não ocorre nas células dos mamíferos, reduzindo as chances de toxicidade (FIGURA 3).

As topoisomerase I fúngicas são suficientemente diferentes das humanas, logo também podem ser alvos promissores para novos antifúngicos. O DNA celular, tanto cromossomal como plasmídico, encontra-se como um círculo fechado covalentemente que pode estar em estruturas topológicas diferentes, relaxado ou superenovelado. As DNA-topoisomerases são um grupo de enzimas capazes de catalizar a interconversão entre ambas as formas topológicas, permitindo que o mesmo cumpra suas funções de transcrição, tradução ou recombinação dentro da célula. Estas enzimas, rompendo transitoriamente uma das cadeias do DNA (topoisomerase tipo I) ou as duas (topoisomerase tipo II) e logo as relaxando, permite as transformações topológicas que seriam de outra forma impossíveis (CARDENAS *et al.*, 1999; ZACCHINO *et al.*, 2001; 2003).

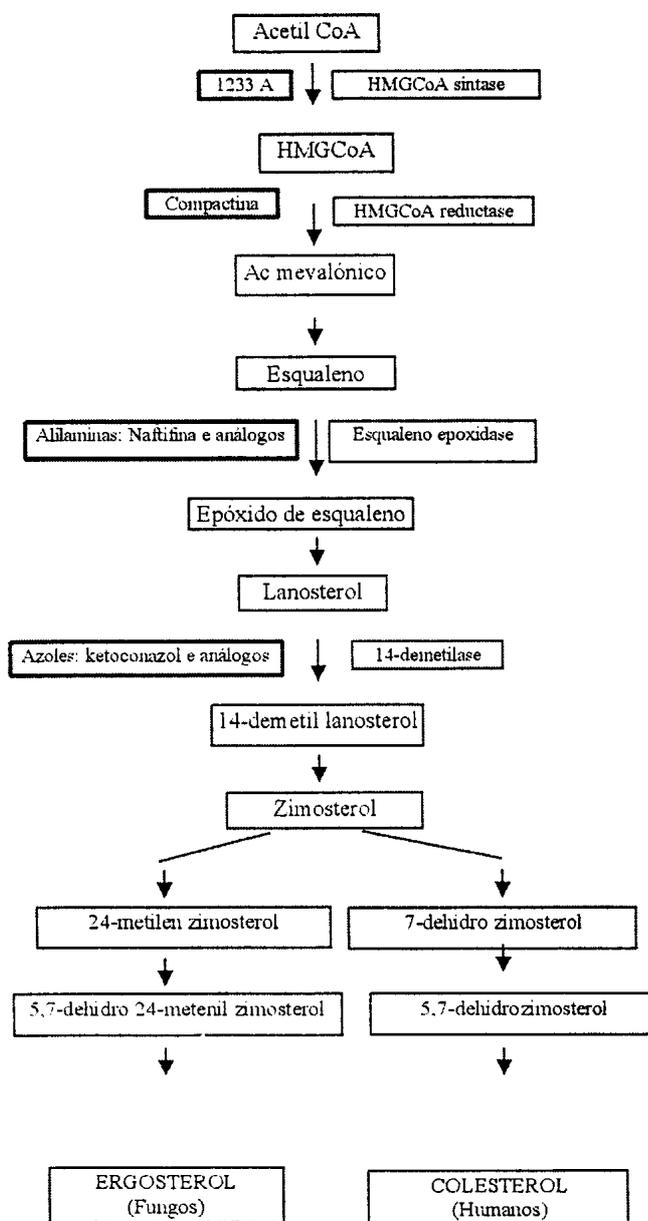
As DNA-topoisomerases mostraram ser alvos moleculares importantes para o descobrimento de fármacos antibacterianos e anticancerígenos. Seus efeitos citotóxicos parecem vir da estabilização do complexo catalítico intermediário que se forma entre a topoisomerase e o DNA, impedindo o relaxamento da espiral de DNA. Esta estabilização desencadeia um processo desconhecido que causa a morte celular. Estudos demonstram que várias topoisomerases I extraídas de fungos seriam alvos promissores para novos agentes antifúngicos mais seletivos (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Os agentes antifúngicos podem ser classificados em duas categorias: os que afetam a membrana celular e os que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como síntese de DNA, RNA ou proteínas (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Antifúngicos podem atuar inibindo a biossíntese do ergosterol (FIGURA 3). Em uma rota sintética que inicia com a acetilcoenzima A, são envolvidas várias enzimas até a formação do ergosterol para fungos e o colesterol para animais. Os antifúngicos que atuam nessa rota, infelizmente inibem enzimas que são comuns para a formação tanto do ergosterol quanto colesterol. Devido a essa não seletividade desses agentes, a síntese do colesterol em mamíferos acaba sendo interrompida, provocando efeitos colaterais como inibição de síntese hormonal (URBINA *et al.*, 2000; ZACCHINO *et al.*, 2003).

Como exemplos de drogas que afetam a membrana celular podem citar os derivados poliênicos, e derivados imidazólicos. Estas substâncias combinam-se com esteróis da membrana, rompendo a mesma ou tornando-a incapaz de efetuar suas funções normalmente (permeabilidade e transporte). A droga forma um poro na membrana e o centro hidrófilo da molécula criam um canal iônico transmembrana.

Podem ocorrer alterações na permeabilidade celular e causar a perda de constituintes essenciais das células como K^+ , açúcares, proteínas, fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfato (RANG *et al.*, 1997; TRABULSI *et al.*, 1999).



*Inibidores da passagem do acetil Coenzima A (AcCoA) a ácido mevalônico
Inibição da hidroximetilglutaril Coenzima A sintase*

FIGURA 3 - Biossíntese do ergosterol e do colesterol. Os quadros à direita das flechas mostram as enzimas que participam nesta etapa da biossíntese. Os quadros à esquerda das flechas mostram inibidores destas enzimas

Fonte: Zacchino, 2001

3.6 *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)

3.6.1 Características gerais

Acmela brasiliensis Spreng, anteriormente classificada como *Wedelia paludosa*, é pertencente à família das Asteraceae (FIGURA 4). É planta herbácea, prostrada, radicante nos nós, possuindo raízes bastante superficiais; caules cilíndricos de 2-5 mm de largura e até 2 m de comprimento, verde ou castanho avermelhado, esparsamente piloso e com ramos esporádicos, folhas simples, opostas curto peciolada, membranácea, com base regularmente atenuada, dois pequenos lobos laterais agudos, ápice agudo e margens irregularmente denteadas, comprimento até 8 cm por 4 cm de largura, verde escura e superfície brilhante na face ventral, mais clara e pilosa na face dorsal; pecíolo semicilíndrico, ciliado, com 4mm de comprimento; capítulos isolados, 2 – 3 cm de diâmetro, com pedúnculo piloso, fino e reto, chegando a 10 cm de comprimento a partir de uma axila foliar; brácteas involucrais foliáceas, verdes, em duas séries, 8 – 12 mm de comprimento, pilosas no dorso; hermafroditas, com corla tubulosa, abrindo-se em 5 lobos com minúsculos pêlos, também amarelos; androceu com anteras lineares, negras, de bases sagitada; gineceu com estilete de ramos glabros, carnosos, obtusos, semicilíndricos e um estigma bifido; aquênio tríqueto, glabro, estreitado na base, com ciatiformes de 1 mm de comprimento (CORRÊA, 1984; KISSMANN e GROTH, 1991-1992).



FIGURA 4 - Flor da *Acmela brasiliensis* Spreng

Esta planta, nativa do Brasil, é amplamente encontrada em várias regiões do país, incluindo o estado de Santa Catarina. Ocorre de forma espontânea, principalmente em praias e áreas úmidas. Muitas vezes é cultivada para cobertura de barrancos e margens de caminhos e como ornamental, pois forma um vasto “colchão” verde com vistosas flores amarelas (FIGURA 4) durante quase todo o ano, mais pronunciadamente no verão (KISSMANN e GROTH, 1991-1992; CORRÊA, 1984;).

Acmela brasiliensis Spreng é conhecida popularmente como margaridão, mal-me-quer-do brejo, pingo-de-ouro, vedelia, entre outras (CORRÊA, 1984). Estudos desenvolvidos no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da UNIVALI com esta planta indicaram que a mesma produz vários compostos de interesse medicinal. Os extratos brutos apresentaram ações antibacterianas, analgésicas, antiespasmódicas, antiinflamatórias e hipoglicemiantes (CORDEIRO *et al.*, 1998; SCHLEMPER *et al.*, 1998; BLOCK *et al.*, 1998; CECHINEL FILHO, 2000; BRESCIANI *et al.*, 2000, 2004). Os principais constituintes ativos foram identificados como sendo a luteolina (MOLINARI *et al.*, 1997), ácido caurenóico (HANDA *et al.*, 1992; NOVAES *et al.*, 2001) e uma lactona chamada paludolactona (CECHINEL FILHO *et al.*, 2004).

3.6.2 Estudos fitoquímicos de *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng.

Estudos fitoquímicos anteriores com planta *Acmela brasiliensis* Spreng demonstraram o isolamento e identificação de alguns compostos, como o ácido caurenóico e alguns de seus derivados (ROQUE *et al.*, 1987; CARVALHO *et al.*, 1995; BATISTA *et al.*, 1996; BRESCIANI *et al.*, 2000, 2003, 2004), duas lactonas sesquiterpênicas (eudesmanolide lactona 1 e eudesmanolide lactone 2) (FERREIRA *et al.*, 1994; CECHINEL FILHO *et al.*, 2004), o 3 β -O-acil-olean-12-en-28-ol, o estigmasterol, glicosídeos de estigmasterol ésteres alifáticos, uma mistura de 3 β -D-glicopiranosilsterol e 3 β -D-glicopiranosilestigmasterol (CARVALHO *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 2001) e friedelan-3 β -ol (BATISTA *et al.*, 1999).

A análise fitoquímica indicou que as raízes apresentam a maior concentração de terpenóides, enquanto as flores produzem diferentes flavonóides que não são encontrados nas outras partes da planta (BLOCK *et al.* 1998). Um destes flavonóides foi identificado como a chalcona coreopsina (RODRIGUES *et al.*, 1998).

3.6.2.1 Terpenos

O ácido caurenóico é o principal composto da planta e possui diferentes atividades, tais como antibacteriana (WILKENS *et al.*, 2002), antifúngica (SARTORI *et al.*, 2003) larvicida, tripanosomida (BATISTA *et al.*, 1999) e antinociceptiva (BLOCK *et al.*, 1998). É também um potente estimulador da contração uterina. A análise do perfil cromatográfico por HRGC/FID (High Resolution Gas Chromatography Flame Ionization Detection), de diferentes partes da *Acmela brasiliensis* Spreng (raíz, caules, folhas, flores) na fração hexano, demonstrou que a maior concentração do ácido caurenóico está nas raízes (6,65 mg/g da planta seca) (BRESCIANI *et al.*, 2000). Este estudo confirma estudos anteriores em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (BLOCK *et al.*, 1998). O ácido caurenóico foi identificado por co-injeção de amostra autêntica de ácido caurenóico. Verificou-se que há outros compostos, comuns em todas as frações, presumivelmente um diterpeno do tipo caureno, ainda não identificado. Também observou-se vários picos, os quais foram identificados como uma mistura de esteróis ou triterpenos, incluindo estigmasterol, acetato β -amirina e ácido oleanólico (BRESCIANI *et al.*, 2000, 2003).

A estrutura molecular do ácido caurenóico (FIGURA 5) mostra que como outros caurenos pertence à classe dos diterpenos os quais possuem um esqueleto tetracíclico rígido. Eles são intermediários da biossíntese das giberelinas, os quais são hormônios de crescimento de várias plantas, alguns metabólitos de fungos e de alcalóides triterpenos (GUISALBERTI, 1997). Ácido Ent-16-kauren-19-oico ou ácido caurenóico é um dos mais importantes membros desta família, com inúmeras propriedades biológicas já citadas (BRESCIANI *et al.*, 2002).

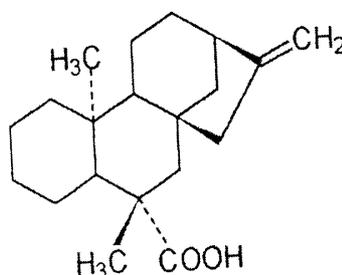


FIGURA 5 – Estrutura molecular do terpenóide Ácido caurenóico

Os terpenóides são sintetizados de unidades acetato e dividem origem com os ácidos graxos diferindo destes por serem cíclicos.

3.6.2.2 Flavonóides

São conhecidos cerca de 4 mil flavonóides naturais e em geral são encontrados nas frações mais polares, como acetato de etila (agliconas) e butanólica (flavonóides glicosados). Alguns compostos apolares, como a luteolina, são extraídos com clorofórmio ou diclorometano (NIERO, 2000).

A luteolina, como mostra sua estrutura molecular (FIGURA 6), é um flavonóide presente nas folhas e flores da *A. brasiliensis* Spreng. Flavonóides são substâncias fenólicas hidroxiladas, mas ocorrem unidas ao C₆-C₃ e ligadas ao anel aromático.

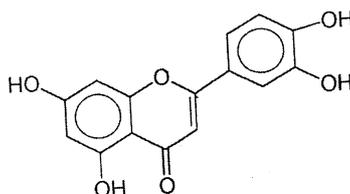


FIGURA 6 – Estrutura molecular do flavonóide luteolina

Dados encontrados na literatura demonstram o isolamento de estigmasterol nas flores de *Acmela brasiliensis* Spreng (CARVALHO *et al.*, 1995). Através da cromatografia em camada delgada comparativa com extratos das diferentes partes da planta, utilizando uma amostra autêntica do flavonóide luteolina e revelada com FeCl₃, demonstraram que este flavonóide está presente nas folhas e flores e ausente nas raízes e caules. Compostos de natureza fenólica também foram detectados por CCD nas folhas e flores com R_f próximo ao da isoquercitina utilizada como amostra autêntica (BLOCK *et al.*, 1997; BRESCIANI *et al.*, 2000).

Os flavonóides são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas, justificando assim sua ação antimicrobiana frente a vários microrganismos. Esta atividade se dá provavelmente devido a habilidade de complexação com a parede bacteriana. Os flavonóides mais lipofílicos podem lisar a membrana microbiana.

Os flavonóides têm grupos hidroxil sobre seu anel B o que aumenta mais sua atividade contra microrganismos, do que as flavonas com grupo –OH não ligados ao anel. Este fato

pode levantar a hipótese de que o mecanismo de ação seja em alvos na membrana plasmática. Compostos lipofílicos podem interromper a estrutura da membrana microbiana e a maior hidroxilação do composto pode levar a maior atividade antimicrobiana por aumento de toxicidade aos microrganismos (COWAN, 1999).

Os compostos fenólicos hidroxilados atuam possivelmente por inibição de enzimas através de reações com grupos sulfidrilas e por interações inespecíficas com proteínas, embora não tenha sido comprovada uma relação entre o grau de hidroxilação e a atividade tóxica (WILHELM FILHO *et al.*, 2001).

3.6.3 Estudo Analítico - Cromatografia em camada delgada

A extração dos constituintes de plantas é um processo de tentativa acerto/erro utilizando-se partições em solventes de polaridades diferentes sob variadas condições de tempo e temperatura de extração e eluição.

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é um método útil para separação, identificação e quantificação de compostos antimicrobianos em um cromatograma de um extrato bruto ou semipuro, permitindo o isolamento bioguiado do composto ativo. A CCD é um método físico de separação, na qual os compostos a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase fixa - sílica gel, de grande área superficial, denominada fase estacionária e outra, onde um fluido elui através dela, chamada fase móvel. Utiliza-se para fase móvel solventes com polaridades crescentes (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000).

3.6.4 Estudos biológicos de *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng

Os modelos de avaliação de atividade biológica utilizada para investigação de plantas medicinais fazem parte da pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento desde ensaios laboratoriais, triagens, testes pré-clínicos e clínicos, aprovação em órgãos competentes, marketing até a comercialização (SOUZA, 2003).

Considerando os efeitos farmacológicos e biológicos demonstrados pela *Acmela brasiliensis* Spreng e seu uso na medicina popular, incentiva que seja feito um controle de qualidade dos extratos das plantas.

No estudo da avaliação de atividade analgésica foram utilizados modelos farmacológicos de dor utilizados mundialmente e validados internacionalmente como modelos de dor induzida quimicamente em animais para avaliação da atividade antinoceptiva a nível de sistema nervoso central e periférico, como os testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético; modelo de dor induzido pela formalina que permite avaliar se a dor é de origem neurogênia por estimulação direta dos neurônios nociceptivos ou de origem inflamatória representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada a liberação de mediadores químicos; teste de dor induzida pela capsaicina que procura analisar a possível ação modulatória sobre a dor de origem neurogênia, onde pode-se evidenciar a possível interação dos compostos em estudo sobre os neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa. Modelos de dor induzida termicamente como o teste da placa quente ou modelos de dor induzida mecanicamente como o teste da pressão das patas - Randal - Selito (BLOCK, 1998; SOUZA *et al.*, 2003).

Bresciani *et al.* (2000; 2004) avaliaram a concentração do ácido caurenóico como importante composto com atividade analgésica e hipoglicemiante. Estudos demonstram que a fração hexânica da *Acmela brasiliensis* Spreng, apresentou significativo efeito hipoglicemiante, promovendo uma redução de 26,47 % da glicemia. O composto majoritário presente nesta fração que poderia estar exercendo o efeito antidiabético seria o ácido caurenóico (BRESCIANI *et al.*, 2004).

O composto puro luteolina mostrou perfil farmacológico analgésico quando administrada via intraperitoneal, com DI_{50} de 26,2 mg/kg para a segunda fase de dor no teste de formalina. A luteolina foi cerca de cinco vezes mais efetivo do que a aspirina e paracetamol usados como comparação, confirmando o uso popular no tratamento de processos dolorosos e inflamatórios (NIERO, 2000). Um estudo comparativo envolvendo as diferentes partes da planta (flores, caules, folhas e raízes) demonstrou que apenas o extrato das flores não foi efetivo no combate a dor produzida pelo ácido acético em camundongos (BLOCK *et al.*, 1998).

Os flavonóides, por serem compostos fenólicos, agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com metais. Possuem atividade contra vírus, bactérias, fungos e são utilizados na alimentação e desenvolvimento animal. São conhecidos como produtos de síntese das plantas em resposta a infecções microbianas, e tem sido considerada substância efetiva em sua ação antimicrobiana contra um largo número de microrganismos patogênicos. Sua atividade é provavelmente devido a sua capacidade de formar complexos extracelulares e

solubilizar proteinase, bem como, complexar com parede celular bacteriana. Flavonóides mais lipofílicos podem também romper membranas microbianas (COWAN, 1999).

O mecanismo de ação de atividade antimicrobiana dos terpenos ainda não é totalmente compreendido, mas especula-se que envolva a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos (COWAN, 1999). A avaliação da atividade antimicrobiana *Acmela brasiliensis* Spreng foi realizado em ensaios microbiológicos *in vitro*, onde são selecionados e utilizados cepas catalogadas (padrão) de gêneros e espécies de bactérias e fungos patogênicos, oportunistas e saprófitas (SCHLEMPER, 1998; ZACCHINO, 2001; SARTORI *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003).

Nas avaliações das atividades biológicas da planta também foram realizados ensaios de citotoxicidade com o composto ácido caurenóico contra células tumorais humanas, não apresentando citotoxicidade (HUI *et al.*, 1989).

3.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.7.1 Estudos Microbiológicos - Métodos de diluição

Os métodos de diluição *in vitro* detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico. O ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é obtido através da macrodiluição que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos, semear a bactéria ou fungo em estudo e após incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo.

Determina-se a CIM, como sendo a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo. Este método apresenta a vantagem de ser quantitativo, podendo ser usado, tanto para amostras hidrossolúveis, como lipossolúveis (MITSCHER *et al.*, 1972; RIOS *et al.*, 1988).

3.7.2 Ensaio de toxicidade da *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes. A simplicidade do bioensaio favorece sua utilização rotineira (SIQUEIRA *et al.*, 2001).

O bioensaio com larvas de *Artemia salina* é utilizado para testar a toxicidade de inúmeras substâncias e extratos de plantas farmacologicamente ativos, de modo a facilitar o isolamento biológico destes compostos e avaliar sua toxicidade. O teste de toxicidade através do uso do microcrustáceo *Artemia salina* serve como uma ferramenta útil para um estudo preliminar biomonitorado dos extratos de plantas sendo também sugestivo como triagem da atividade farmacológica (SIQUEIRA *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002). É um método rápido, confiável e barato para determinação de toxicidade (SIQUEIRA *et al.*, 2001; PAYROL *et al.*, 2001).

3.7.3 Avaliação da atividade antifúngica das frações e compostos obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng por inibição de parede celular

O bioensaio da *Neurospora crassa* permite detectar inibidores da parede, porém, não se consegue definir qual das etapas de síntese da parede celular fúngica que estariam sendo inibidas. O bioensaio está baseado nas seguintes premissas: quando estão em presença de inibidores da parede, os fungos sofrem malformações de suas hifas (GUNJI *et al.*, 1983; FUKUSHIMA *et al.*, 1993; ZACCHINO *et al.*, 2003), porém na presença de um suporte osmótico como sorbitol, um fungo pode crescer a uma concentração muito mais alta de inibidor de parede que quando o sorbitol não está presente, havendo lise da parede (FROST *et al.*, 1995). No método de difusão em agar usando *N. crassa*, os inibidores de parede são detectados porque produzem halos de inibição manchados ao redor dos discos, devido à presença de protoplastos sobreviventes. Os compostos antifúngicos que não atuam por este mecanismo produzem halos claros (FUKUDA *et al.*, 1991; ZACHINO *et al.*, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos extratos e compostos puros de *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*)

Foram fornecidas para o desenvolvimento desta pesquisa, quatro frações distintas: Hexano (Fr. Hex), Diclorometano (Fr. DCM), Acetato de Etila (Fr. AcEt) e Butanol (Fr. BuOH), obtidas a partir do extrato metanólico bruto (EMB) das flores da planta *Acmela brasiliensis* Spreng, coletada na região de Florianópolis/SC, no mês de maio de 1998 e preparadas pela Dr^a. Louisiane F. Bresciani, na época aluna do Curso de Pós-graduação de Química (Doutorado), do Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e co-orientada pelo Prof.Dr.Valdir Cechinel Filho (BRESCIANI, 2003).

Os compostos puros foram obtidos a partir das frações semipurificadas através de procedimentos cromatográficos usuais, como cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD), (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998) cujo desenvolvimento foi no Departamento de Química da UFSC. A FIGURA 7 demonstra a representação esquemática da obtenção dos extratos de planta medicinais.

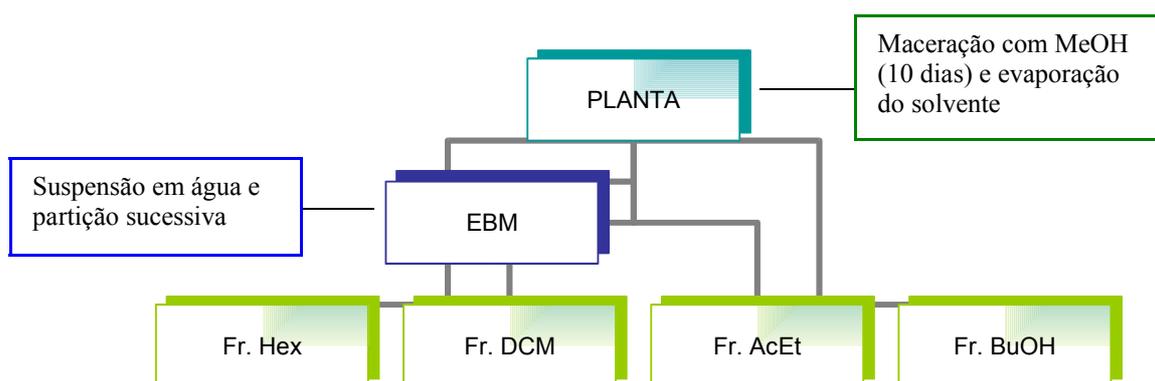


FIGURA 7 - Esquema geral para obtenção de extratos diretamente de plantas medicinais orientados para análise biológica.

Fonte: Cechinel Filho e Yunes, 2001

4.2 Cromatografia em Camada Delgada

Os compostos testes foram dissolvidos em acetona para obtenção de concentrações equivalentes a 500, 1000 e 1500 µg/mL. As soluções testes foram aplicadas em placas de camada delgada (CCD) (Sílica Gel 60 - MERCK) em séries com as mesmas concentrações e em seguida, submetidas à eluição em sistema de solvente apropriado.

Foram testadas três frações para este ensaio: hexano, diclorometano e butanólica.

Para a fração acetato de etila utilizou-se como fase móvel: clorofórmio/metanol nas proporções 90: 10; 85: 15; 80: 20; 70: 30; 60: 40. A revelação foi feita com cloreto férrico após observação sob luz U.V. em comprimento de onda de 240 nm.

Para a fração diclorometano utilizou-se como fase móvel: hexano/acetato de etila nas proporções de 90: 10; 80: 20; 70: 30. A revelação foi feita com anisaldeído e posterior aquecimento da placa cromatográfica.

Para a fração butanólica utilizou-se como fase móvel o acetato de etila/ acetona/ água/ metanol nas seguintes proporções 25:8:1:3. A revelação foi feita com cloreto férrico após observação sob luz U.V. em comprimento de onda de 240 nm.

Como durante a eluição não se conseguiu a separação adequada das frações, não foram completados todos os procedimentos para realização do método bioautográfico, havendo assim prejuízo nos resultados obtidos.

4.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados para a realização da pesquisa foram: *Bacillus cereus* (ATCC14579); *Enterobacter cloacae* (ATCC35030); *Escherichia coli* (ATCC11775); *Proteus mirabilis* (ATCC14273); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27859); *Proteus mirabilis* (ATCC14273); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27859); *Salmonella typhimurium* (ATCC14028); *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P); *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC35552); *Streptococcus agalactiae* (ATCC13813), fornecidos pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello de Campinas/SP. Para os testes com fungos foram utilizadas as seguintes cepas disponíveis na Universidade Nacional de Rosário: *Aspergillus flavus* (ATCC9170); *Aspergillus fumigatus* (ATCC26934); *Aspergillus niger* (ATCC9092); *Candida albicans* (ATCC10231); *Candida tropicalis* (C131); *Cryptococcus neoformans* (ATCC32264); *Epidermophyton floccosum* (C114); *Microsporium canis* (C112);

Microsporium gypseum (C115); *Neorospora crassa* (ATCC9279); *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC9763); *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC9972); *Trichophyton rubrum* (C137).

4.4 Preparação dos inóculos bacterianos

Para o preparo do inóculo microbiano foram utilizadas as cepas de *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*. As bactérias foram ativadas em tubo com caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), incubados a 35 °C por 18 horas. Para o isolamento de colônias jovens, alíquota de cada cultura ativada foi transferida para placa de Petri com agar Mueller-Hinton e incubado a 35°C por aproximadamente 24 horas. Após o período de incubação selecionou-se 3 a 4 colônias, transferindo-as para um tubo estéril contendo 5 mL de solução salina (0,86 %). A turvação da suspensão celular foi medida em espectrofotômetro lendo-se em comprimento de onda de 530 nm em UV VISIBLE SPECTROPHOTOMETER (SHIMADZU UV –1601). A solução salina estéril foi empregada como branco. Quando necessário, fez-se à diluição para alcançar a concentração desejada de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL, compatível com a escala 0,5 de MacFarland. Esta solução foi então diluída para obter o inóculo com concentração entre 5×10^5 e $7,5 \times 10^5$ células/mL (NCCLS, 1993; BARON e FINEGOLD, 1990).

Para cada bactéria testada foram adicionados dois tubos contendo somente o meio de cultura - tubos controles (um branco e outro contendo o solvente empregado nas diluições das amostras - solução de DMSO e água).

As leituras foram consideradas válidas quando o crescimento nos tubos brancos e com solvente foram observados.

4.5 Preparo do inóculo de fungos leveduriformes

O inóculo foi preparado com cepas de: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Os fungos leveduriformes foram semeados em tubos de Agar Sabouraud dextrosado (Merck) inclinados, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas

jovens e incubados a 37 °C por 24 a 48 horas. Após incubação, transferiu-se entre 4 a 5 colônias de levedura com alça estéril para um tubo estéril contendo salina a 0,85 %.

A suspensão foi ajustada por espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm para obtenção de 95 % de transmitância. Como branco, foi utilizada água purificada estéril ajustando-se a transmitância para 100 %. A concentração final obtida foi de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por mL. A confirmação da concentração final foi feita através de contagem dos microrganismos em câmara de Newbauer.

Os inóculos foram armazenados sob refrigeração de acordo com a espécie de fungo. (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* armazenados à - 20 °C e *Cryptococcus neoformans* armazenados a - 4 °C).

4.6 Preparo dos inóculos dos fungos filamentosos

O inóculo de fungos filamentosos foi preparado com *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Neorospora crassa*.

Os fungos filamentosos foram semeados em tubo de Agar Saboraud dextrose, incubando-se a temperatura ambiente por 12 dias. O micélio foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL contendo água purificada estéril e pérolas de vidro. Foram agitados por em agitador de tubos (Vortex) durante 5 minutos. Para a suspensão dos microconídeos a solução foi filtrada em seringa estéril para remover os fragmentos dos micélios. Foi feita a centrifugação das conídeas a 3000 rpm por 15 minutos e lavando-se o sedimento três vezes com água destilada estéril.

A contagem das conídeas foi feita em câmara de Newbauer. A seguir, foram feitas as diluições necessárias para se alcançar a concentração desejada entre 10^5 e 10^6 células/mL.

Após obtenção e padronização dos inóculos, estes foram armazenados sob refrigeração de acordo com a espécie e requerimento de cada fungo filamentoso (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* armazenados à - 4°C; *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* armazenados à 8 °C).

4.7 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antimicrobiana (concentração inibitória mínima) do extrato, frações e compostos obtidos da *Acmela brasiliensis* Spreng, foi realizada pela diluição em agar conforme descrito por National Committee for Clinical Laboratory Standards (1993).

A CIM foi determinada por diluição em agar como descrito por NCCLS (1995) com modificações. Em frascos de vidro de 5 mL, os extratos, frações e compostos foram dissolvidos em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) e água na proporção de 4:6, e adicionados em séries de dez frascos em concentrações que variaram de 100 a 1000 µg/mL. Em seguida, a cada frasco foi adicionado 1 mL do meio de cultura agar Mueller-Hinton estéril e a mistura foi homogeneizada. Os frascos foram inclinados e após a solidificação dos meios de cultura, os microrganismos previamente ativados foram inoculados nas séries correspondentes, sendo então incubados a 35 °C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima através da verificação do crescimento microbiano (HADACEK e GREGER, 2000).

Durante os testes foram realizados controles com o solvente utilizado na solubilização dos extratos, frações ou compostos (DMSO - água), a fim de se verificar seu efeito sobre os microrganismos testados. A concentração do DMSO não ultrapassou a 2 % em relação ao volume total de cada experimento.

4.8 Método da concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a célula bacteriana, sendo possível avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (BARON e FINEGOLD, 1990).

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), foram selecionados os frascos que apresentaram inibição do desenvolvimento de bactérias no ensaio de CIM. Os microrganismos foram isolados desses frascos e inoculados em meio Mueller-Hinton isento de composto e incubados por 24 a 48 horas a 37 °C. Após a incubação, as culturas foram inspecionadas para a verificação visual do crescimento microbiano. Os testes foram feitos em triplicata.

Para a interpretação dos resultados foram considerados os seguintes critérios:

- Crescimento do microrganismo no meio de cultura, significou ação bacteriostática;
- Ausência de crescimento do microrganismo no meio de cultura, significou ação bactericida.

4.9 Avaliação da atividade antifúngica

As amostras testadas que exibiram atividade fungicida importante podem ser consideradas potenciais antifúngicos de uso clínico. Estabeleceu-se que os extratos fossem testados em concentrações menores de 1000 µg/mL e nos casos de compostos puros, 250µg/mL (ZACHINO, 2001; SARTORI *et al.*, 2003).

O etanol, água, acetona e DMSO foram os solventes mais adequados para a preparação das soluções já que estudos preliminares demonstraram que não produziam inibição dos cultivos quando estes solventes eram utilizados em concentrações finais de 2 %. Como os ensaios se realizaram em tubos contendo uma concentração final de meio de cultura de 500 µL, adicionou-se ao mesmo, quantidades de amostra não superiores a 10 µL.

No método de diluição em agar, as amostras testadas foram homogenizadas em concentrações conhecidas com o meio de cultivo, no qual se inoculou o microrganismo teste. Este método quantitativo é utilizado para determinação da concentração inibitória mínima de um composto frente a um microrganismo determinado. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato de *Acmela brasiliensis* Spreng que inibiu o crescimento visível dos microrganismos ensaiados após incubação.

Procedeu-se a fusão do meio de cultivo e colocando-se 500 µL em tubos de khan estéreis (tubos de ensaio de 5 mL), a seguir, adicionou-se aos tubos com o meio de cultura fundido a quantidade necessária da amostra a ser testada. Após esfriar inclinado, preparou-se todos os tubos em duplicata para cada fungo teste.

Para cada fungo testado foi adicionado dois tubos contendo somente o meio de cultura que eram os tubos controles (branco apenas com o solvente como controle positivo e um contendo 30 µg/mL de cetoconazol como controle negativo).

Após solidificação do meio de cultivo, foi inoculado o fungo com alça calibrada estéril (5 µL), sobre a superfície do agar. Os tubos foram incubados a 28 °C o tempo necessário segundo os requerimentos do microrganismo.

Na leitura dos resultados foi considerada válida a bateria onde houve crescimento fúngico nos tubos brancos contendo apenas meio de cultivo e solvente e não houve desenvolvimento fúngico no tubo que continha cetoconazol.

4.10 Estudos preliminares do mecanismo de ação das frações e compostos obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* (*Wedelia paludosa*) Spreng contra fungos.

Os estudos preliminares do mecanismo de ação dos compostos ativos presentes nas frações e compostos obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng, foram realizados no laboratório do Departamento de Farmacognosia, da Universidade Nacional de Rosario (Rosário/Argentina), em colaboração com Prof^a. Susana A. Zacchino.

O estudo para verificação da atividade dos extratos, frações e dos compostos ácido caurenóico e luteolina em inibir a parede celular fúngica foi realizado através da observação de malformações das hifas com uso de protetor osmótico sorbitol e no ensaio da *N. crassa*.

No ensaio qualitativo da *Neurospora crassa* foi utilizado meio de cultura com a seguinte composição: 30 mL de meio contendo 0,5 % de protease peptona (Britania 02-0700), extrato de levedura (Britania -006-05), 4,0 % sacarose (grau reagente) e 1,5 % agar (Merck 1613) foi autoclavado a 115 °C por 15 min. O meio de cultivo foi distribuído em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e após resfriamento parcial foi semeado 30 µL do inóculo de esporos de *N. crassa* e incubado a temperatura ambiente sob luz direta. Aguardou-se a solidificação do meio, e aplicou-se sobre este, discos de 0,65 mm (Baxter F-2882-1). As amostras dissolvidas em DMSO foram colocadas sobre os discos (25 µg/disco).

Para preparar o inóculo dos esporos de *N. crassa*, o cultivo foi feito em meio contendo 0,25 % de protease peptona (Difco 0122-01) (p/p), 0,25 % de extrato de levedura (p/p) 1 % de sacarose (p/p) e 1,5 % agar (p/p) por 4-5 dias de incubação a temperatura ambiente e luz produzindo uma coloração laranja no crescimento das hifas com esporos. O inóculo foi feito em tampão contendo 0,075 g/100 mL K₂HPO₄ (grau reagente) em solução de glicerol e água 15:85.

Os discos contendo somente DMSO como controle negativo também foram incluídos no ensaio e 1,25 µL de miconazol (Sigma M-3512) também foi adicionado ao disco como controle positivo os quais produziram um halo claro.

Neurospora crassa é um fungo filamentoso que quando em presença de inibidores da parede celular fúngica e sob certas condições (37 °C e meio osmótico), cresce como

protoplasma (sem parede celular) e que microscopicamente mostra malformações (hifas curtas e ramificadas) (SELITRENNIKOFF, 1992). Os halos de inibição foram examinados macroscopicamente para verificar se havia má formação das hifas e se a aparência era de aspecto enevado ou manchado, seguindo-se a incubação das placas a temperatura ambiente por 24 horas sob luz direta.

4.11 Ensaio de toxicidade da *Artemia salina*

Foram preparadas baterias com diversas concentrações das frações de extratos das flores da *Acmela brasiliensis* que apresentaram nos ensaios prévios, os melhores resultados de atividade antimicrobiana.

Esta metodologia necessita de quantidades relativamente grandes de composto a testar (20 g para extratos brutos e 4 mg para compostos puros) e o preparo das diluições limita o número e as diluições que podem ser testadas em um experimento. O teste foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meyer *et al.* (1982). Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial (solução de NaCl a 3,8 %) e deixados em temperatura ambiente por 48 horas. Para o preparo da água marinha dissolveu-se 3,8 g de cloreto de sódio em água purificada. Manteve-se o pH da água entre 8 e 9. Para eclosão dos microcrustáceos, foi utilizada uma caixa contendo divisória, de maneira que apenas um dos lados fique iluminado para permitir, por fototropismo, a migração das larvas (SOLIS *et al.*, 1993). Os ovos do microcrustáceo incubados a temperatura de 28 a 30 °C com forte aeração e sob contínua luminosidade. As larvas não foram alimentadas. O experimento foi realizado em triplicata.

Os extratos foram pesados, adicionou-se 1 mL de DMSO (1 % do volume final, v/v) para facilitar a dissolução do extrato e a seguir adicionou-se lentamente água do mar artificial até completar um volume final de 10 mL. A concentração final do extrato ficou entre 8 a 500 µg/mL. A partir desta solução, obteve-se as concentrações de 8, 24, 48, 124, 248 e 500 µg/mL.

Para as frações testadas, pesou-se 4 mg de amostra e adicionou-se 5 mL de água do mar artificial. Quando necessário deixou-se alguns minutos no ultra-som. Desta solução, tomou-se

respectivamente em triplicata 625, 312, 125, 62, e 25 μL que correspondem as doses de 250, 125, 50, 25 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Completou-se o volume de 2 mL com água do mar artificial .

O controle negativo foi realizado com 2 mL de água do mar artificial e o controle positivo por dicromato de potássio em concentrações de 800, 600 e 400 $\mu\text{g/mL}$.

Após a eclosão dos ovos (48 horas), adicionou-se 8-10 larvas de *Artemia salina* no pocinho, juntamente com o extrato e deixou-se incubar a 25 °C por 24 horas para cada experimento, sendo os pocinhos mantidos sob iluminação.

O resultado foi obtido contando-se o número de mortos e vivos em cada pocinho, através de visualização macroscópica e a análise estatística foi feita da contagem do número de sobreviventes calculando-se a porcentagem de mortos. Os microcrustáceos foram considerados mortos quando não exibiam nenhum movimento interno ou externo após vários segundos de observação (MEYER *et al.*, 1982; SOLIS *et al.*, 1993; SIQUEIRA *et al.*, 2001; 1998; PAYROL *et al.*, 2001; CARBALLO *et al.* 2002). Para termos certeza que a mortalidade dos microcrustáceos observada no bioensaio pudessem ser atribuídas ao composto testado e não a falta de alimento, comparou-se a mortalidade de cada tratamento com as larvas controles. As larvas de *Artemia salina* sobrevivem até 48 horas sem alimentação (CARBALLO *et al.*, 2002).

A porcentagem de mortalidade (% M) foi calculada como: % M = porcentagem de sobreviventes no controle – porcentagem de sobreviventes com composto teste (CARBALLO *et al.*, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO *et al.*, 2001; MALHEIROS *et al.*, 2001).

A planta *Acmela brasiliensis* Spreng apresentou atividade antimicrobiana, confirmando estudos preliminares realizados anteriormente (BLOCK *et al.*, 1997; SCHLEMPER *et al.*, 1998; CORDEIRO *et al.*, 1998).

Foram realizadas análises da atividade dos extratos da planta inteira e flores. Especificamente com relação a planta inteira, ainda foram analisadas os extratos de plantas obtidos em dois locais diferentes (jardins da UFSC e praia).

A coleta de diferentes locais foi feita com o intuito de observar possíveis alterações na resposta de atividade antimicrobiana em função do ambiente. Segundo Morrissey (1999) e Selitrennikoff (2001), o ambiente influencia na produção de substâncias antimicrobianas como resposta às “agressões” por agentes patógenos e estresse ambiental.

5.1 SISTEMA DE SOLVENTES - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Considerando que a planta *A. brasiliensis* Spreng em estudo é reconhecida por seus efeitos biológicos, submeteu-se o extrato etanólico das flores e das frações obtidas com solventes de polaridade crescente (hexano – HEX, diclorometano - DCM, acetato de etila – AcEt e butanol – BuOH) à cromatografia em camada delgada testando-se diversos solventes para escolher aqueles que nos fornecessem a melhor resolução para efetivação de um ensaio de bioautografia para o direcionamento da pesquisa que visava a localização dos compostos ativos presentes na planta, pois sua localização nas frações favoreceria seu posterior isolamento.

As frações HEX, DCM, AcEt e BuOH foram escolhidas para a cromatografia, por terem fornecido preliminarmente os melhores resultados na triagem de atividade antimicrobiana. Esta triagem preliminar foi feita testando-se todos os extratos (HEX, DCM, AcEt, BuOH, MeOH/H₂O) das flores e planta inteira coletadas na praia e jardins da UFSC na

concentração de 1000 µg/mL contra um coco Gram positivo e um bacilo Gram negativo (escolheu-se aleatoriamente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). As frações que apresentaram atividade antimicrobiana para o coco Gram positivo na concentração testada foram escolhidas para o ensaio cromatográfico.

Os sistemas solventes utilizados (19) não apresentaram boa resolução para justificar a utilização do método bioautográfico para localizar os compostos com atividade antimicrobiana. A única fração que houve uma pequena separação foi a fração DCM com fase móvel de hexano/acetato na proporção de 70: 30,

porém esta separação inadequada dos compostos pode interferir no resultado dos halos de inibição frente às cepas bacterianas a serem testadas.

5.2 RESULTADOS CONTRA BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS

As propriedades microbiostáticas e microbicidas a partir de produtos vegetais têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo o mundo. Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos *in vitro* em testes de susceptibilidade ou sensibilidade (SOUZA *et al.*, 2003), como foi realizado no presente trabalho.

Dentre as bactérias utilizadas para determinação da atividade antimicrobiana (Gram positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, e Gram negativas: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella typhimurium*) as frações do extrato bruto e compostos da planta *Acmela brasiliensis* Spreng apresentaram atividade somente contra as bactérias Gram positivas.

Na TABELA 2 são apresentados os resultados da determinação de atividade antimicrobiana das frações e compostos isolados da *Acmela brasiliensis* Spreng contra as bactérias Gram positivas.

O critério utilizado para classificação da atividade dos componentes extraídos da *Acmela brasiliensis* Spreng foi: Concentração Inibitória Mínima (CIM) menor que 100 µg/mL foi considerado como boa atividade antimicrobiana; quando CIM de 100 a 500 µg/mL foi considerado moderadamente ativo; CIM entre 500 a 1000 µg/mL foi considerado pouco ativo e CIM maior que 1000 µg/mL, inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2004).

Como pode ser observado na TABELA 2, a fração hexânica das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng apresentou atividade contra as duas espécies de *Staphylococcus* testadas. Por outro lado as frações hexânicas da planta inteira coletadas nos jardins da UFSC e na praia mostraram atividade também contra as outras bactérias Gram positivas. Ressalta-se que as CIM foram consideradas moderadas contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyticus* para planta inteira coletada nos jardins da UFSC e coletada na praia.

TABELA 2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) das frações dos extratos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* Spreng e os compostos puros (ácido caurenóico e luteolina) contra cepas padrão de bactérias Gram positivas.

Parte utilizada da planta	Fração	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
		Bc	Sa	Ssp	Stp
Flores	Hex	>1000	800	200	>1000
Flores	DCM	200	400	800	1000
Flores	AcEt	>1000	>1000	>1000	600
Flores	BuOH	>1000	>1000	>1000	>1000
Planta Inteira U*	Hex	200	600	200	600
Planta Inteira U*	DCM	200	600	200	1000
Planta Inteira U*	AcEt	>1000	>1000	>1000	>1000
Planta Inteira U*	MeOH/H ₂ O	>1000	>1000	>1000	>1000
Planta Inteira P*	Hex	200	600	200	>1000
Planta Inteira P*	DCM	800	800	1000	>1000
Planta Inteira P*	AcEt	>1000	>1000	>1000	>1000
Planta Inteira P*	MeOH/H ₂ O	>1000	>1000	>1000	>1000
Ác. Caurenóicos		200	200	200	400
Luteolina		800	500	800	>1000

Bacillus cereus (Bc); *Staphylococcus aureus* (Sa); *Staphylococcus saprophyticus* (Ssp); *Streptococcus agalactiae* (Stp); U*=coletadas nos jardins da UFSC; P*=coletadas em região de Praia; AcEt=fração acetato de etila; HEX=fração hexano; DCM=fração diclorometano; BuOH=fração butanol.

Segundo Bresciani *et al.* (2000), bem como Carvalho *et al.* (2001), solventes apolares como éter e hexano possibilitam a extração de grupos esteróides (estimagmasterol, sistosterol), cumarínicos, ésteres do ácido oleanóico, lactonas sesquiterpênicas, terpenóides (ácidos caurânicos).

Tem sido demonstrado que os terpenos são ativos contra diversos microrganismos. Seu mecanismo de ação não está completamente elucidado, porém acredita-se que envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos (COWAN, 1999; DORMAN e DEANS, 2000; WILKENS, 2002).

No fracionamento de extratos de plantas, a utilização do diclorometano (DCM) possibilita a extração de compostos apolares fenólicos como flavonóides, cumarinas, cromenos, benzofuranos, xantonas, quinonas e taninos (CECHINEL e YUNES, 1998; YUNES e CALIXTO, 2001).

Os flavonóides são substâncias hidroxiladas fenólicas conhecidas por serem sintetizadas pelas plantas em resposta a infecções microbianas e não é surpresa seu efeito antimicrobiano *in vitro* contra diversas bactérias. Esta atividade é provavelmente devida a sua habilidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, ou ainda o caráter lipofílico dos flavonóides ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microrganismos (TSUCHIYA *et al.*, 1996; COWAN, 1999). O grupo hidroxil ligado ao anel β são ativos contra microrganismos que aqueles com grupos $-OH$, podendo-se supor que este seria um alvo na membrana celular, juntamente com o caráter lipofílico do composto (COWAN, 1999).

A fração DCM obtida do extrato bruto das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng apresentou atividade antibacteriana moderada para *Bacillus cereus* (CIM = 200 $\mu\text{g/mL}$) e *Staphylococcus aureus* (CIM = 400 $\mu\text{g/mL}$). Para as bactérias *Staphylococcus saprophyticus* (CIM = 800 $\mu\text{g/mL}$) e *Streptococcus agalactiae* (CIM = 1000 $\mu\text{g/mL}$) a atividade foi considerada fraca, como pode ser observado na TABELA 2.

Estes resultados confirmam estudos anteriores (SCHLEMPER *et al.*, 1998), onde os extratos DCM mostraram atividade contra bactérias Gram positivas. Rauha *et al.* (2000) sugerem que os compostos mais apolares como a luteolina - flavonóide extraído pela fração DCM e presente na planta - possa ser o responsável pelos efeitos antibacterianos.

Com relação às frações DCM das plantas inteiras, foi verificado que a planta coletada nos jardins da UFSC apresentou atividade antimicrobiana mais pronunciada quando comparada com a planta coletada na praia. Enquanto a planta coletada na UFSC apresentou atividade moderada contra *Bacillus cereus* (CIM = 200 $\mu\text{g/mL}$) e *Staphylococcus saprophyticus* (CIM = 200 $\mu\text{g/mL}$) e atividade fraca contra *Staphylococcus aureus* (CIM = 800 $\mu\text{g/mL}$) a planta coletada na praia foi considerada pouco ativa contra as mesmas bactérias bem como para *Staphylococcus aureus* e foi inativa contra *Streptococcus agalactiae*.

A fração HEX obtida do extrato bruto das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng apresentou atividade antibacteriana moderada para *Staphylococcus saprophyticus* (CIM = 200 $\mu\text{g/mL}$) e fraca para *Staphylococcus aureus* (CIM = 800 $\mu\text{g/mL}$). As frações HEX dos extratos brutos das plantas inteiras coletadas na UFSC e na praia apresentaram atividades

moderadas contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus* (CIM = 200 µg/mL para ambos) e atividade fraca contra *Staphylococcus aureus*, como observado na TABELA 2.

Com relação às frações mais polares (acetato de etila, butanol e metanol/água), obtidas dos extratos bruto das flores e planta inteira (jardins da UFSC e praia) observamos que os mesmos praticamente não apresentaram atividade antimicrobiana. Somente a fração acetato de etila do extrato das flores é que apresentou pequena atividade.

Vários estudos mostram que o ácido caurenóico apresenta moderada atividade antibacteriana para bactérias Gram positivas (GIESHRECHT, 1987; VELIKOVA *et al.*, 2000; WILKENS *et al.*, 2002). A parede celular bacteriana dos Gram positivos é menos complexa e apresenta maior permeabilidade quando comparada aos Gram negativos (RANG, 1997; TRABULSI, 1999).

O composto puro ácido caurenóico apresentou atividade inibitória específica contra bactérias Gram positivas. A atividade antibacteriana foi moderada para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus* (CIM = 200 µg/mL). Contra *Streptococcus agalactie* a atividade foi menor (CIM = 400 µg/mL).

O mesmo perfil de atividade antibacteriana para estes compostos contra bactérias Gram positivas também foi encontrado por estudos anteriores (GIESHRECHT, 1987; DAVINO *et al.*, 1989; SCHLEMPER *et al.*, 1998; BLOCK *et al.*, 1997; VELIKOVA *et al.*, 2000; WILKENS, 2002).

Wilkens *et al.* (2002), em estudo sobre a atividade bactericida do ácido caurenóico (FIGURA 8), sugere que a membrana externa pode atuar como barreira evitando a aproximação do ácido caurenóico da membrana citoplasmática. Entretanto a ação sobre a síntese dos peptidoglicanos não deve ser descartada, pois estudos preliminares do mesmo autor, mostraram que protoplastos de *Bacillus cereus* são lisados em meio iso-osmótico depois de expostos ao ácido caurenóico e perdem a capacidade de reter a coloração Gram.

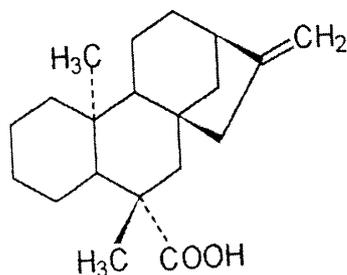


FIGURA 8 - Estrutura molecular do ácido caurenóico (1)

Considerando-se ainda, o ácido caurenóico como um ácido fraco, e sabendo-se que ácidos fracos fazem transporte de prótons através da membrana, um possível mecanismo de ação do ácido caurenóico seria a alteração no transporte de elétrons e subseqüentemente a fosforilação oxidativa na membrana citoplasmática. Outro possível mecanismo a considerar seria o rompimento da membrana citoplasmática por interação física. Estruturalmente, a presença do ácido carboxílico na posição 19 parece ser importante na ação antibacteriana, porque derivados sintéticos e naturais com este grupo bloqueado ou interagindo com hidrogênio, apresentam nenhuma ou menor atividade (WILKENS *et al.*, 2002). De acordo com Mendoza *et al.* (1997), a adição de grupamentos metil à diterpenos caurenóicos acarretam a redução de sua atividade antibacteriana (COWAN, 1999).

O composto luteolina (FIGURA 9) em estudos previamente realizados apresentou atividade inibitória contra MRSA (XU e LEE, 2001) e ação inibitória no crescimento e na enzima arilamine N-acetiltransferase de cepas de *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica (CHUNG *et al.*, 2001). Este composto apresenta forte efeito antimicrobiano contra estreptococo cariogênico e periodontopatia por *Porphyromonas gingivalis* (YAMAMOTTO e OGAWA, 2002).

O resultado da atividade antibacteriana observado na TABELA 2 com o composto flavonóide luteolina foi de 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e de 800 µg/mL para *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus*.

A luteolina, presente nas flores e planta inteira em estudo apresenta dois anéis aromáticos (A e B) e um heterocíclico oxigenado (anel C). A hidroxilação dos anéis afeta a hidrofobicidade da molécula. Como produto secundário do metabolismo das plantas, os flavonóides reduzem parcialmente o oxigênio sendo, e são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), possuindo reatividade química mais marcante que o oxigênio molecular. Este radical hidroxil (-OH) produz um processo de lipoperoxidação, atuando como oxiradicaís

de reatividade química capazes de proporcionar reações de iniciação e alta capacidade oxidante (WILHELM FILHO *et al.*, 2001; SILVA, 2002). A membrana citoplasmática e as enzimas que ocupam o citoplasma bacteriano ao passar para o meio externo podem estar sofrendo uma oxidação pelas ERO sendo complexadas ou inibidas, e assim provocando injúria na célula microbiana (WILHELM FILHO *et al.*, 2001).

A luteolina apresenta várias propriedades farmacológicas, mas pouco se conhece sobre seu alvo bioquímico, e um estudo mostra que a luteolina inibe completamente o processo catalítico da DNA topoisomerase I dos eucariontes na concentração de 40 mM com uma IC50 de 5 mM (ROYCHOWDHURY *et al.*, 2002), e inibe a proliferação e expressão do colágeno das células hepáticas *in vitro*, e podem ter função preventiva ou terapêutica na fibrose hepática (ZHAO *et al.*, 2002).

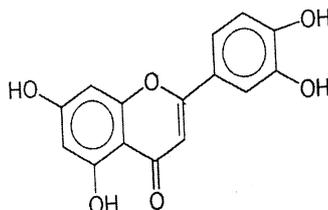


FIGURA 9 - Estrutura molecular da luteolina (2)

Os compostos fenólicos hidroxilados atuam possivelmente por inibição de enzimas através de reações com grupos sulfidrilas e por interações inespecíficas com proteínas, embora não tenha sido comprovada uma relação entre o grau de hidroxilação e a atividade tóxica (WALSH, 1992; ZACCHINO, 1998).

As frações e extratos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* Spreng e compostos puros (ácido caurenóico e luteolina) testados contra Gram negativos não apresentaram atividade antimicrobiana, confirmando resultados previamente obtidos (BLOCK *et al.*, 1998 a,b; SCHLEMPER *et al.*, 1998). Wilkens (2002) relata que como o ácido caurenóico não é ativo contra as bactérias Gram negativa, há possibilidade de uma resistência natural da membrana externa ao diterpeno.

Os resultados indicam que as bactérias Gram positivas são relativamente inibidas pelos componentes da *Acmela brasiliensis*. O perfil químico de seletividade contra Gram positivos não é restrito a composto de plantas, mas é um fenômeno geral observado entre muitos antibióticos (SCHAECHTER *et al.*, 1999; BASILE *et al.*, 2000).

Nenhuma atividade foi observada contra bactérias Gram negativas (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*). Isto pode ser explicado porque a membrana externa das bactérias Gram negativas é conhecida por apresentar uma barreira a penetração de numerosas moléculas de antibióticos, e o espaço periplasmático contém enzimas, as quais são capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas neste espaço (SCHAECHTER *et al.*, 1999; DUFFY e POWER, 2001; SARTORI *et al.*, 2003).

Muitos microrganismos Gram negativos também exibem alto nível de resistência intrínseca à grande número de agentes antimicrobianos e reforça a hipótese sobre a membrana externa e atividade de bomba de efluxo como barreira aos antibióticos (NIKAIDO, 1989; VAN KÖEHLER, 1999; BAMBEKE *et al.*, 2003).

Considerando-se que pacientes imunocomprometidos necessitam da ação bactericida de antimicrobianos, procedeu-se a determinação da concentração bactericida mínima (CBI) das frações dos extratos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* Spreng para bactérias Gram positivas.

Na TABELA 3 são apresentados os resultados da determinação de atividade antimicrobiana de extratos frações e compostos de *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) contra cepas de bactérias Gram positivas. Observa-se que a fração hexânica das flores, da planta inteira coletada nos jardins da UFSC e planta inteira coletada na praia apresenta atividade bactericida contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Para a fração HEX da planta inteira coletada nos jardins da UFSC, foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) em triplicata, contra *Staphylococcus aureus* como pode ser observado na TABELA 3. Observa-se que dentre as frações HEX coletadas e testadas foram obtidos resultados de maior atividade bactericida da planta inteira coletada na UFSC (700 µg/mL). O ácido caurenóico apresentou maior atividade bactericida contra bactérias Gram positivas do que a luteolina. Condições ambientais pouco favoráveis, condição de estresse, ou exposição à agentes patogênicos podem propiciar que as plantas tenham seu padrão de metabolismo alterado ou exacerbado, produzindo fitoalexinas ou metabólitos secundários para sua defesa e adequação as condições que o meio lhe oferece (MORRISSEY, 1999; SELINTRENNIKOFF, 2001; BRESCIANI *et al.*, 2004).

TABELA 3 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) das frações dos extratos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* Spreng contra cepas padrão de bactérias Gram positivas.

Parte utilizada da planta	Fração	Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
		Bc	Sa	Ssp	Stp
Flores	Hex	1000	900	>1000	>1000
Flores	DCM	700	700	>1000	>1000
Planta Inteira U*	Hex	800	700	>1000	>1000
Planta Inteira U*	DCM	1000	1000	>1000	>1000
Planta Inteira P*	Hex	1000	1000	>1000	>1000
Planta Inteira P*	DCM	1000	1000	>1000	>1000
Ác. Caurenóicos		200	400	200	>1000
Luteolina		1000	800	1000	>1000

Bacillus cereus (Bc); *Staphylococcus aureus* (Sa); *Staphylococcus saprophyticus* (Ssp); *Streptococcus agalactiae* (Stp); U*= coletadas nos jardins da UFSC; P*= coletadas em região de Praia; HEX= fração hexano; DCM= fração diclorometano.

5.3 RESULTADOS CONTRA FUNGOS

Os fungos são organismos interessantes, pois são capazes de se desenvolver em diferentes superfícies e colonizar ambientes, plantas, animais e o homem. Nas últimas décadas a incidência de infecções fúngicas humanas, especialmente envolvendo pacientes imunocomprometidos tem aumentado dramaticamente (SELINTRENNIKOFF, 2001).

Infecções fúngicas superficiais, apesar de não apresentarem risco de vida potencial para indivíduos saudáveis, tem efeitos debilitantes sobre a qualidade de vida das pessoas, limitando tanto suas atividades diárias, como relacionamentos interpessoais, já que podem desfigurar a pele e serem transmitidos por contato direto. Os grupos de fungos que caracteristicamente infectam as partes queratinizadas do corpo são *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. e *Epidermophyton* sp. (GROLL, 1998; GARBER, 2001).

Um recurso promissor para o desenvolvimento e descoberta de novos agentes antifúngicos são as plantas usadas na medicina popular para tratamento de feridas infectadas, pés de atleta e outras patologias cutâneas.

As frações e compostos da *Acmela brasiliensis* Spreng foram testados frente a fungos dermatófitos, filamentosos e leveduras. A composição química provável destas frações mostradas em estudos anteriores, às quais podemos atribuir sua atividade antifúngica são: ácido caurenóico (ROQUE, 1987; BRESCIANI *et al.*, 2000), terpenos (CRAVEIRO, 1993;

VIEIRA, 2001), eudesmololide lactonas (FERREIRA, 1994; CARVALHO, 2001) e flavonóides (BLOCK *et al.*, 1998).

Os resultados da TABELA 4 mostram que nenhum extrato testado possui atividade contra as leveduras *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; *Cryptococcus neoformans*; *Saccharomyces cerevisiae*, nem para os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus niger* e *Microsporium gypseum*. As determinações foram realizadas em triplicata.

TABELA 4 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) para fungos contra frações dos extratos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng e de dois compostos puros (ácido caurenóico e luteolina).

Fração / Composto	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$)											
	Fungo filamentosos								Fungo leveduriforme			
	Afl	Afu	An	Ef	Mc	Mg	Tm	Tr	Ca	Ct	Cn	Sc
HEX	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
DCM	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	250	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
AcEt	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
BuOH	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	500	250	>1000	>1000	>1000	>1000
1	>250	>250	>250	50	>250	>250	100	100	>250	>250	>250	>250
2	>250	>250	>250	250	>250	>250	125	>250	>250	>250	>250	>250

Aspergillus flavus (Afl); *Aspergillus fumigatus* (Afu); *Aspergillus niger* (An); *Epidermophyton floccosum* (Ef); *Microsporium canis* (Mc); *Microsporium gypseum* (Mg); *Trichophyton mentagrophytes* (Tm); *Trichophyton rubrum* (Tr); *Candida albicans* (Ca); *Candida tropicalis*; *Cryptococcus neoformans* (Cn); *Saccharomyces cerevisiae* (Sc); HEX= fração hexano; DCM= fração diclorometano; AcEt= fração acetato de etila; BuOH= fração butanol; 1 = Ácido caurenóico; 2 = Luteolina.

Os resultados mostram espectro de atividade, exclusivamente para os dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*), quando testados os extratos hidroalcoólico das flores e particionado com, hexano (HEX), diclorometano (DCM), butanol (BuOH) da *Acmela brasiliensis* Spreng com CIM compreendidas entre 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. A fração de acetato de etila (AcEt) não mostrou atividade antifúngica ou apresentou CIM muito alta (1000 $\mu\text{g/mL}$), e foram desconsideradas neste estudo (SARTORI *et al.*, 2003). As frações estudadas tiveram atividade contra fungos dermatófitos, e devem-se também considerar as propriedades antioxidativas dos flavonóides (SILVA *et al.*, 2002).

Dos compostos puros testados, o Ácido caurenóico (1), mostrou atividade para *Epidermophyton floccosum* (CIM 50 $\mu\text{g/mL}$); *Trichophyton rubrum* (CIM 100 $\mu\text{g/mL}$) e *Trichophyton mentagrophytes* (CIM 100 $\mu\text{g/mL}$). Estudos mostram atividade antibacteriana e antifúngica do ácido caurenóico e derivados substituídos no carbono-15 (DAVINO,

GIESBRECHT e ROQUE, 1989) Em estudos de mecanismo de ação de compostos diterpenóides demonstraram que o ácido careunóico produziria permeabilização da parede celular fúngica (COTORAS, 2004).

Algumas hipóteses quanto ao mecanismo de ação destas frações foram avaliadas. Na fração hexano encontra-se em maior concentração, compostos como ácido caurenóico (diterpeno), estigmasterol (esterol) e ácido oleanólico (triterpeno), sendo que o diterpeno citado apresenta atividade antimicrobiana (ZACCHINO *et al.*, 2001). O caráter lipossolúvel do diterpeno favorece sua passagem através das membranas celulares, as quais tem natureza protéica e lipídica e esta passagem é grandemente determinada pela sua maior ou menor lipossolubilidade. Os compostos lipossolúveis atravessam rapidamente as barreiras da membrana por um processo de difusão passiva, sendo este transporte diretamente proporcional ao gradiente de concentração e ao coeficiente de partição lipídio/água da substância (RANG *et al.*, 1997).

O grau de ionização de compostos ácidos (fracos) ou bases (fracas) dependem de grupos funcionais capazes de se ionizarem. O grau de ionização depende do pK do composto, bem como do pH da solução (fluido biológico). Outro aspecto a ser avaliado, é que o ácido caurenóico é um ácido fraco havendo uma predominância da forma ionizada e com maior hidrossolubilidade em pH 7,4 (plasma) (RANG *et al.*, 1997). Também, o meio de cultivo utilizado para o estudo *in vitro* possui pH próximo ao neutro. Considerando o ácido caurenóico um ácido fraco, e como tal transportaria prótons através da membrana, sendo que um possível mecanismo de ação poderia ser através da alteração do transporte de eletrons e subsequente a fosforilação oxidativa na membrana citoplasmática. Outro possível mecanismo, seria o rompimento da membrana citoplasmática por interação física (WILKENS *et al.*, 2002).

A luteolina (2) apresentou atividade com CIM igual ou superior a 250 µg/mL para todos os fungos testados inclusive para as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, e atividade antifúngica na concentração de 125 µg/mL para *Trichophyton mentagrophytes*.

Considerando que os dermatófitos são um grupo de fungos altamente especializados, que caracteristicamente infectam as áreas queratinizadas do corpo e levando-se em consideração que as dermatomicoses são muito difíceis de erradicar, é interessante notar que tantos os extratos da *Acmela brasiliensis* Spreng, como os compostos ácido caurenóico e luteolina, são ativos frente à dermatófitos e não a outros tipos de fungos testados. Esta característica pode ser atribuída à diferenças na membrana externa destas espécies, visto que estudos demonstram que o ácido caurenóico é um ácido fraco com constante de dissociação

fraca (10^{-5} a 10^{-6}) e a membrana externa celular pode atuar como barreira prevenindo a penetração do ácido caurenóico (WILKENS *et al.*, 2002), ou ainda apresentar resistência a permeabilidade da membrana ao flavonóide luteolina. Esta capacidade antifúngica torna estes compostos promissores para o desenvolvimento de antifúngicos mais potentes e talvez, mais seguros que aqueles usados atualmente para tratar as micoses resistentes da pele, produzidas por fungos oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (LACAZ *et al.*, 2002; ZACCHINO, 2003).

5.4 ENSAIO DA *Neurospora crassa*

O bioensaio da *Neurospora crassa* é preditivo na maioria dos casos podendo fornecer indicação quanto ao mecanismo de ação de compostos ativos, através da inibição da síntese da parede celular fúngica como também indicar uma possível inibição da síntese de polímeros e enzimas envolvidas na síntese dos demais polímeros da parede como, por exemplo, 1,6- β glicanos ou manoproteínas, além daquelas que intervêm na sua organização (SELITRENNIKOFF, 1992; ZACCHINO, 2001).

Na avaliação *in vitro* dos extratos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng e do composto puro - luteolina - pelo bioensaio da *Neurospora crassa* que detectam inibidores da parede celular fúngica, a atividade apresentada pelas frações e compostos obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng, no método de diluição em agar e no ensaio da *Neurospora crassa*, verificou-se que estes extratos provavelmente atuam por outro(s) mecanismo(s) de ação sobre a célula fúngica que não a inibição da parede celular da *Neurospora crassa*, pois não foi observado halo de inibição em torno do disco de papel (SELITRENNIKOFF, 1983; ZACCHINO *et al.*, 1998; 2003). Foram testados frações Hex, DCM, BuOH e os compostos puros Luteolina e Ácido caurenóico sendo que nenhum dos extratos testados da *Acmela brasiliensis* Spreng apresentaram inibição contra a *Neurospora crassa*. Segundo técnica utilizada por Zacchino *et al.* (1998), é recomendado o uso como controle positivo do Cetoconazol, que apresentou halo claro mostrando inibição do crescimento fúngico.

A interpretação do resultado foi realizada sob microscopia para verificar a aparência do fungo observando-se halos de má formação de hifas com aspecto enevoadado.

5.5 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *Artemia salina*

Para a realização do ensaio de toxicidade, selecionou-se um composto isolado de cada parte da planta. e nenhum dos compostos testados apresentou atividade tóxica frente a *Artemia salina*.

Conforme demonstrado na TABELA 5 observam-se as frações hexano e diclorometano do extrato das flores e da planta inteira coletadas nos jardins da UFSC da *Acmela brasiliensis* não apresentaram toxicidade no bioensaio em microplaca para *Artemia salina*. A concentração final do extrato ficou entre 8 a 500 µg/mL. Os resultados do cálculo da porcentagem de mortalidade (%M) dos compostos testados foram semelhantes ao do controle, mostrando a não inibição das larvas.

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras (SOLIS *et al.*, 1993; SIQUEIRA *et al.*, 1998; PAYROL *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2001; KANEGUSUKU *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2003). Parra *et al.* (2001) utilizou o teste com *Artemia salina* como um teste preliminar para avaliar a toxicidade do composto.

Foram testados apenas as frações hexano e diclorometano para o bioensaio de toxicidade com *Artemia salina*, pois estas foram as frações que apresentaram maior atividade antibacteriana e antifúngica. Não foram realizados os testes com os compostos puros ácido caurenóico e luteolina, por não termos quantidade de material suficiente para realização deste ensaio.

Estudos de citotoxicidade realizados com extratos de plantas do mesmo gênero e do ácido caurenóico isolado mostraram resultados semelhantes (MOTTAKINA, 2004). Interessante ressaltar que o composto ácido caurenóico puro não mostrou citotoxicidade quando testado contra células tumorais humanas (HUI, 1989).

TABELA 5 – Atividade tóxica de frações hexânicas e diclorometano dos extratos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* Spreng contra larvas de *Artemia salina*.

Fração	Atividade tóxica CL₅₀ (µg/mL)
Fração hexânica das flores	>1000
Fração diclorometano das flores	>1000
Fração hexânica planta inteira U*	>1000
Fração diclorometano planta inteira U*	>1000

U* = coletadas nos jardins da UFSC

Estudos posteriores com as frações citadas na TABELA 5 poderão ser realizados identificando o(s) componente(s) das frações e realizando-se modificações estruturais na molécula, conduzindo a produtos com atividade mais significativa como sugeridos por Siqueira *et al.*(2001).

Os resultados encontrados no estudo estabeleceram correlação entre a letalidade das frações de flores e planta inteira de *Acmela brasiliensis* Spreng sobre as larvas de *Artemia salina*, demonstrando que os compostos não possuem ação tóxica, o que é indispensável no caso de um tratamento seguro. Este teste também pode ser utilizado em países em desenvolvimento, onde 85 % da população fazem uso de plantas medicinais na terapêutica alternativa (PARRA *et al.*, 2001; MOTTAKINA, 2004).

Estudos de toxicidade auxiliam na triagem de uma grande variedade de compostos com atividade biológica para definir seu potencial de aplicação terapêutica mensurando a toxicidade apresentada dos possíveis futuros fármacos (CARBALLO *et al.*, 2002).

Inúmeros fitoterápicos utilizados por prescrição ou por automedicação, carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas plantas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (NOLDIN *et al.*, 2003).

Esperamos que compostos isolados da *Acmela brasiliensis* Spreng possam futuramente fazer parte do arsenal terapêutico para tratamento das inúmeras patologias que acometem o homem, a flora e a fauna, visto que, há vários estudos, muitos deles realizados nesta Universidade, que validam o uso popular desta planta pelas suas propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antimicrobianas entre outras.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho permitiram concluir que:

1. A planta *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram positivas testadas *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae* e contra os fungos dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.
2. Os extratos, frações e compostos puros (ácido caurenóico e luteolina) não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium* e os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Neorospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*.
3. As frações hexano e DCM das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng apresentaram atividade antibacteriana principalmente contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus* (CIM entre 200 e 1000 µg/mL). Foi verificado semelhante perfil de CIM contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus saprophyticus* para as mesmas frações da planta inteira coletada nos jardins da UFSC e da planta inteira coletada na praia. A Concentração Bactericida Mínima das frações hexano e DCM foram consideradas com fraca atividade bactericida (entre 500 a 1000 µg/mL) para as bactérias Gram positivas testadas.
4. Os compostos puros ácido caurenóico e luteolina, quando testados contra bactérias Gram positivas apresentaram atividade antimicrobiana, sugerindo que esses compostos isoladamente ou em conjunto com outros compostos sejam os responsáveis pela atividade antibacteriana da planta em estudo.
5. As flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) apresentaram atividade antifúngica contra dermatófitos, contribuindo para a validação do uso desta parte da planta na medicina popular para o tratamento de infecções dérmicas pelos dermatófitos *Epidermophyton floccosum* (CIM 50 µg/mL); *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton*

rubrum (CIM 100 µg/mL). Porém não apresentaram atividade contra leveduras e fungos filamentosos causadores de micoses sistêmicas.

6. A luteolina e principalmente o ácido caurenóico parecem ser os constituintes de maior atividade detectados nesta planta. Sua seletividade contra dois gêneros de dermatófitos (*Epidermophyton* sp. e *Trichophyton* sp.) é particularmente promissora.

7. Os extratos das flores e planta inteira da *Acmela brasiliensis* Spreng e do composto puro luteolina, quando testados para avaliar mecanismo de ação pelo método de *Neorospira crassa*, não apresentaram atividade.

8. As frações hexano e diclorometano tanto das flores como da planta inteira de *Acmela brasiliensis* não apresentaram toxicidade frente o ensaio com *Artemia salina*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Levantamento da flora medicinal da Paraíba e triagem fitoquímica. **Rev. Bras. Farm.**, v.71, n.3, p.72-76, 1990.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p. 367-373, 2000.
- AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINO, J.S.; SILVA, L.R.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v.15, n.1-3, p.66-69, 2003.
- ANDRADE NETO, M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas de Nordeste, *Pilocarpus sp.*** Fortaleza, 1989. Dissertação (Mestrado Química). Departamento de Química, Universidade do Ceará.
- ANWAR, M.S; BOKHARI S.R. Antimicrobial resistance of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* isolates to oxacillin and glycopeptides. **J. Coll. Physic. Surg. Pak.**, v.13, n 1, p. 3-6, 2003.
- BAMBEKE, F.V.; MICHOT, J.M.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps in eukariotic cells: occurrence and impacto on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p.1067-1077, 2003.
- BARON, E.J.; FINEGOLD. S.M. **Bailey & Scott' s – Diagnostic microbiology**, 8 ed. The C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.
- BARON, S. **Medical microbiology textbook**. Disponível em: <http://gsbs.utmb.edu/microbook.htm>. Acesso em: junho de 2005.
- BARREIRO, E.J. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais. In:YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 237-296. 2001.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed Ed., 2001. 243p.
- BARRETT-BEE, K., RYDER, N. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition. In: SUTCLIFFE, J., GEORGOPAPADAKOU, N. (Eds), **Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy**. Chapman and Hall, New York, p. 411-435, 1992.
- BASILE A.; GIORDANO, S.; LOPEZ-SAEZ J. A.; COBIANCHI. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1479-82, dec 1999.
- BASILE A.; SORBO S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; MONTESANO D.; COBIANCHI, C.R.; VUOTTO, M.L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p.110-116, 2000.
- BATISTA, R.; CHIAN, E.; OLIVEIRA, A.B. Trypanosomicidal kaurene diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta Med.**, v 65. p. 283-274, 1999.
- BELEM, L.F. Study of the chemistry and antimicrobial activity of *Chaetocarpus blanchetii* (Euphorbiaceae). In: SIMPÓSIO BRASIL-CHINA DE QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS, 1990, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: 1990. p. 162.

BIAVATTI, M.W. **Química e bioatividade da *Raulinoa echinata*, espécie endêmica do Vale do Itajaí - SC.** 2001. 248p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BLOCK, L.C. **Determinação dos princípios ativos de *Wedelia paludosa* D.C. (Compositae).** Monografia de conclusão de Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC, 1997.

BLOCK, L.C.; SCHEIDT, C.; SANTOS, A.R.S.; YUNES, R.A.; SOUZA, M.M.; DELLE MONCHE, F. e CECHINEL FILHO, V. Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paudosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v.61, p. 85-89, 1998a

BLOCK, L.C.; SCHEIDT, C.; QUINTÃO, N.L.M.; SANTOS, A.R.S. e CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paudosa* D.C. (Compositae). **Pharmazie**, v. 53, n.10, p. 716-718, 1998b.

BONTEMPO, M. **Medicina natural.** São Paulo: Nova Cultural, 1990.

BOVERIS, A.; ALVAREZ S.; ARNAIZ, S.A.; VALDEZ, L. **Handbook antioxidants.** Cadenas: Packer, L. Eds., 2000, 351 p.

BRESCIANI, L.F.V. *et al.* Comparative study of different parts of *Wedelia paludosa* by gas chromatography. **Nat. Prod. Lett.**, v. 14, n. 4, p. 247-254, 2000.

BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Seasonal variation of kaurenoic acid *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*). **Z. Naturforsch. [C]**, v. 59, n. 3/4, p. 229-232, 2004.

BRESCIANI, L.F.V. Análise quantitativa dos princípios ativos de algumas plantas medicinais da flora catarinense. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis-SC, 2003.

CALIXTO J.B.; SANTOS A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES R.A. A review of the plants of genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potencial. **Med. Chem. Res.**, n.18, p. 225-258, 1998.

CALIXTO, J.B; BEIRITH, A.; FERREIRA, J. SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.**, v.14, p. 401-418, 2000.

CANTRELL, C.L.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**, v. 67, p. 685-694, 2001.

CAPRA, F. **Ponto de mutação.** São Paulo: Editora Cultrix, 1997 trad.: Cabral, A.

CARDENAS, M.; CRUZ, C.; DEL POETA, M.; CHUNG, N.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. **Clin. Microb. Rev.**, v.12, p. 583, 1999.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INCA, S.L.; PÉREZ, P.; GARCIA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.**, v.2, n.1, p.17, 2002.

CARDOSO, H.T.; SANTOS, M.L. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Bras. Med.**, São Paulo, v. 62, p. 67-70, 1948.

CARVALHO, G.J.A.; CARVALHO, M.E. Diterpenos, triterpenos e esteroides das flores da *Wedelia paludosa*. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 24-26, 2001.

CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre Modificação estrutural para otimização de atividade. **Quim. Nova**, São Paulo. v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI **Quim. Nova**, São Paulo, v.23, n. 5, p.680-685, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicianis orientado para análise bilógica. obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 47-75, 2001.

CHATONET, J. **As plantas medicinais: preparo e utilização**. Rio de Janeiro: Martins Fontes, 1979, 175p.

CHAUÍ, M. **Convite a Filosofia**. 8ed. São Paulo: Ed. Ática, 1997, 440p.

CHOWDHURY A.R.; SHARMA S.; MANDAL S.; GOSWAMI A.; MUKHOPADHYAY S.; MAJUMDER H.K. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. **Biochem J.**, n.366, p. 653 – 661, 2002.

CHUNG, J.G.; HSIA, T.C.; KUO, H.M.; LI, Y.C.; LEE, Y.M.; LIN, S.S.; HUNG, C.F. Inhibitory actions of luteolin on the growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer patients. **Toxicol. In Vitro**, v 15, n. 3, p.191-8, 2001.

CLARKE, J.M.; GILLINGS, M.R.; ALTAVILLA, N.; BEALE, A.J. Testing natural products for antimicrobial activity – potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability **J. Microbiol. Meth.**, v. 46, n.3, p.261, 2001.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p.135-143, 2004.

CORREIA, P.M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, p.137, 1984.

CORDEIRO, F. **Atividade antimicrobiana de frações semi-purificadas e compostos puros de *Wedelia paludosa* D.C. (Compositae)**. Itajaí, 1998. Monografia (Graduação Curso de Farmácia). Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on Botrytis cinerea of natural diterpenoids kaurenoic acid and 2 beta-hidroxy-kaurenoic acid. **J. Agric Food Chem.**, v. 52, n. 10, p. 2821- 2826, 2004.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

DAVINO S.C.; GIESBRUCHT A.M.; ROQUE N.F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. **Braz. J. Med. Res.**, v. 22, p.9, p. 1127-9, 1989.

DAJAS, F.; RIVERA, F.; BLASINA F.; ARREDONDO, F. ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; MORQUIO, A.; HEIZEN, H. Cell culture protection and *in vivo* neuroprotective capacity of flavonoids. **Neurotox. Res.**, v.5 n.6, p. 425-32, 2003.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. **J. Appl. Microbiol.**, v.88, p.308-316, 2000.

DAS DORES, R.G.R.; VIANA, L.O.; PEREIRA, L.E.; PEDROSA, C.D.; SILVA, R.R.; PINHEIRO, A.C.N.; NASCIMENTO, C.B.; SILVA, D.C.O.; CAMPOS, G.B.W.; BORGES, J.; ALMEIDA, J.C.S.; FREITAS, L.S.; SILVA, L.C.; FONTES, S.D.; PEREIRA, T.M.C.; MIRANDA, T.M. Fitoterapia e alopatia: a atenção farmacêutica “verde”. **Infarma**, v.15 n.3, p.62-65, 2003.

DOS SANTOS, D.R., DE SOUZA, R.S.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações das plantas *Bauhinia forficata*, *Calophyllum brasiliense*, *Epidendrum mosenii* e *Rubus imperialis***. Monografia de conclusão de Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2000.

DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. **Int. J. Antimicrobiol. Agents**, v. 17, p.527-529, 2001.

FARNSWORTH N.R., BINGEL A.S. In: **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Springer: New York; p. 61-73, 1997.

FERREIRA, D.T.; LEVORATO, A.R.; FARIA, T. J. *et al.* Eudesmadolide lactones from *Wedelia paludosa*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 4, n.1, p. 1-7, 1994.

FERREIRA J.; FLORIANI A.E.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive proprieties of methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orhidaceae). **Life Sci.**, v. 66, p. 791-802, 2000.

FISHER, F.; COOK, N.B. **Micologia: Fundamentos e diagnóstico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

FREITAS, L.S.; SILVA, L.C.; FONTES, S.D.; PEREIRA, T.M.C.; MIRANDA, T.M. Fitoterapia e alopatia: a atenção farmacêutica “verde”. **Infarma**, v.15, p.62-65, 2003.

GAERTNER, M.; MÜLLER, L.; ROOS, J.F. *et al.* Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, v. 61, p. 41-44, 1999.

GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurenes diterpenes. **Fitoterapia**, v.68, p. 303-325, 1997.

GNANAMANICKAM, S.S.; MANSFIELD, J.W. Selective toxicity of wyrone and other phytoalexins to Gram positive bacteria. **Phytochemistry**, v. 20, n.5, p.997-100, 1981.

GRIFO, F. e ROSENTHAL, J. **Biodiversity and human health**. Washington: Island Press, 1997, 379 p.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability o results and assay choice **Phytochem. Anal.**, v.11, p.137-147, 2000.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI S. Free Radical. **Biol. Med.**, v. 16, p. 845, 1994.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

ORWITZ, S.B. How to make taxol from strack. **Nature**, n. 367, p. 593-594, 1994.

HUI, Y., RUPPRECHT, J.; LUI, Y.; ANDERSON, J.; SMITH, D.; CHANG, C.; Mc LAUGHLIN, J. Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. **J. Nat. Prod.**, v. 52 p.463-467, 1989.

IKRAM, M.; HAQ, I. Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part I. **Fitoterapia**, v. 51, p. 231- 235, 1980.

JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; SVENDSEN, A.B. Antimicrobial activities of essential oils: a 1976 – 1986 literature review on possible applications. **Pharm. Week Sci.**, p. 193-197, 1987.

JOYCE, C. **Earthly goods: medicine hunting in the rainforest**. New York. Ed. Little, Brown and Company, 1994, 304p.

KINGSTON, D. I. The chemistry of taxol. **Pharm. Ther.**, n. 52, p. 1-34, 1991.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Medsi: Rio de Janeiro, p.796-809, 2001.

KÖEHLER T.; PECHÈRE, J.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.56, p. 771-778, 1999.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; DE MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. Sarvier: São Paulo, 2002, 1104p.

LI, E.; CLARK, A. e HUFFORD, C.: Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 57-67, 1995.

LIMA, E.O. **Estudo das dermatofitoses em João Pessoa – Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados**. São Paulo, 1996. 180p. Dissertação (Doutorado área de análises clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos, Chapecó, p. 479-499, 2001.

LÓPEZ, S.N.; CASTELLI, M.V.; ZACCHINO, S.A.; DOMINGUEZ, G.L.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTÉS, J.C.G.; RIBAS, J.C.; DEVIA, C.; RODRIGUEZ, A.M. e ENRIZ, R.D. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of fungal cell wall. **Bioorg. Med. Chem.**, p. 1999-2013, 2001.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA J.R. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim.Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALHEIROS, A.; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações química entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 504-523.

MENDOZA, I; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some chilcan *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.58, p.85-88, 1997.

MATOS, F.J. As. Plantas medicinais brasileiras – um desafio para os nossos químicos. **Desafio** (Revista de Extensão – Fortaleza), v. 3, n. 1, p. 5-13, 1990.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E. JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.J.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHALAK, E. **Apontamentos fitoterápicos da Irmã Eva Michalak**, Florianópolis: Epagri, p. 95, 1996.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. 2 ed. Manole: São Paulo, 1999, 584p.

MITSCHER, L.A.; LEV, L. P.; BATHOLA, M.S.; WU, W. N.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v. 35, p.157-166, 1972.

MITSCHER, L.A.; DRAKE S.; GOLLAPUDI, S.R. e OKUNTE, K. A modern look at folkloric use of antiinfective agentes. **J. Nat. Prod.**, v. 50, p. 1025 – 40, 1987.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Quím. Nova**, v.26, n.3, p. 309-311, 2003.

MORRISSEY, J.P.; OSBOURN, A.E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiol. Env. Microbiology**, v. 67, n. 7, p.708-724, 2001.

MOTTAKINA, A.K.M.; CHOWDHURYB, R..; HAIDERA, M.S.; HASANB, C.M.; RASHID, M.A. Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*. **Fitoterapia**, v. 75, n 3-4, p. 355-359, 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved standard M7-A3**. NCCLS: Vilanova, 1993.

NEU, H.C.; GOOTZ, T.D. Antimicrobial Chemotherapy. In: BARON, S. **Medical microbiology textbook**. Disponível em: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch011.htm>. Acesso em: junho de 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIERO, R. **Obtenção de Novas Moléculas com atividade analgésica e antiinflamatória a partir de plantas medicinais brasileiras**. 2000, Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Curso de Pós Graduação em Química. UFSC, Florianópolis, SC.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Editora UNIVALI, 239, 2003.

NIKAIDO,H. Outer membrane barrier as mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.33, p.1831-1836, 1989.

- OLIVEIRA, B.H.; SANT'ANA, A.E.G.; BASTOS, D.Z.L. Determination of the dipertenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochemistry. Anal.**, v. 13, p. 368-371, 2002.
- OSBORN, E.M. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. **Br. J. Exp. Pathol.**, London, v. 24, n. 6, p. 227-231, 1993.
- PAYROL, J.A.; MARTINEZ, M.M.; CARRABEO, G.T.; GARCIA, O.C. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). **Rev. Cubana Farm.**, v. 35, n.1, p. 56-60, 2001.
- PEDERSON, C.S.; FISHER, P. Bactericidal activity of vegetable juice. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 47, p. 421-422, 1984.
- PERZ-GARCIA, F.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. **Free Radic Res.**, v. 33, n. 5, p. 661-65, 2000.
- PHILLIPS, P.; STEVENS, D.A.A.; VIVIANI, M. Managing Fungal Infection in the 21st century: Focus on itraconazole. In: Stevens D.A. **Drugs Supplement**, v. 61, n. 1, 2001.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p.237-243, 2001.
- PRETTO, J.B.; CECHINEL FILHO, V.; NULDIN, V.F.; SARTORI, M.R.K.; ISAISAS, E.B.; BELLA CRUZ, A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense*. **Z. Naturforsch.**, 59c, p. 657-662, 2004.
- RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; FRENK, E. A bioautographic agar overlay methods for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochem. Anal.**, v. 2, p. 199-203, 1991.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997, 692p.
- RAUHA, J.P.; REMES, S.; HEIMONEN, M.; HOPIA, A.; KAHKONEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenoli compounds. **Int J Food Microbiol.**, n.25 v. 56 p. 3-12, 2000.
- RECIO, M.C.; RÍOS, J.L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature between 1978 – 1988. **Phytother. Res.**, v. 3, p. 117-125, 1989.
- REZEND, M.C.; URZUA, A.; BORTOLUZZI, A.J.; VÁSQUEZ, L. Variation of the antimicrobial activity of *Pseudoganaphalium vira vira* (Asteraceae): isolation and X-ray structure of ent-3 β -hidroxy-16-kauren-19-oic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 459-464, 2000.
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 23, p. 127-149, 1988.
- RIPPPON, J.W. **Medical mycology**. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1988.
- RODRIGUES, C. A.; SAVI, A.O.; SCHLEMPER, V.; REYNAUD, F.; CECHINEL FILHO, V. An Improved Extration of marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Chromatographia**, v. 47, n. 7/8, p. 449-50, 1998.
- ROQUE, N.F.; GIANELLA, T.L.; GIESBRECHT, A.M.; BARBOSA, R. DE C.S.B.C. Kaurene diterpene from *Wedelia paludosa*. **Rev. Latinoamer. Quim.**, v. 18, p.110, 1997.

- ROQUE, N. F.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M. Antifungal sesquiterpenes from stem bark of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Rev. Latinoamer. Quim.**, v.30, n.1, p.12 - 16, 2002.
- ROQUE, N. F.; NUNEZ, C. V.; AMEENDOLA, M. C.; LAGO, J. H. G. Diterpenes acids from *Mikanis* sp. nov. (Asteraceae). **Biochem. Systemat. Ecol.**, v.32, n.1, p.233 - 237, 2004.
- SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V., Antifungal Activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (ASTERACEAE), **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-9, 2003.
- SCHLEMPER, S.R.M; CORDEIRO, F.; BLOCK, L. C.; CECHINEL FILHO, V. Atividade antibacteriana de frações semipurificadas e compostos puros de *Wedelia paludosa* (Compositae). **Alcance** (Itajaí), v.5, n. 2, p.14-18, 1998.
- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, 642p.
- SCHRODER-VAN DER ELST, J.P.; SMIT, J.W.; ROMIJN, H.A.; VAN DER HEIDE, D. Dietary flavonoids and iodine metabolism. **Biofactors**, v. 19, n. 3-4, p. 171-6, 2003.
- SELITRENNIKOFF, C.P. Use of a temperature -sensitive protoplast forming *Neurospora crassa* strain for the detection of antifungal antibiotics, **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 23, p. 757-765, 1983.
- SELITRENNIKOFF, C. Screening for antifungal drugs. In: FINKEELSTEIN. D.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi**. Technology and Products. Butterworth Heinemann, Boston. p. 189-217, 1992.
- SELITRENNIKOFF, C. In: **Antifungal drugs: (1,3) - β - glucan synthase inhibitors**. Germany: Springer-Verlag, ed., p. 91-132,1995.
- SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal Proteins. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p. 2883-2894, 2001.
- SILVA, M.M.; SANTOS M.R.; CAROCO, G.; ROCHA R.; JUSTINO, G. MIRA L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Res.**, v. 36, n. 11 p. 1219-1227, 2002.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed., 2003, 1102p.
- SIQUEIRA, F.S.A. Mecanismos de resistência a Beta-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista do Biomédico**, v. 24, 2002.
- SIQUEIRA, J.M.; ZIMINIANI, M.G.; RESENDE, U.M.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo Fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Quím. Nova**, v. 24, n. 2, p.185-187, 2001.
- SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico da *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Quím. Nova**, n. 21, n. 5, p.557-559, 1998.

- SIQUEIRA, J.M.; MULLER, L.; CAROLLO, C.A. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil leaves of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 28, n.4, p.89-93, 2003.
- SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v.15, n.3, p.70-73, 2002.
- SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Med.**, v. 59, n. 3, p. 250-252, 1993.
- SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KRUEGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Ed Univali; 2003, 239p.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1984, 374 p.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUYIWARA, S.; OHYAMA, M.; TAKASA, T.; LINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.**, v.50, p.27-34, 1996.
- UEDA, H.; YAMAZAKI, C. e YAMAZAKI, M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity inhibition of systemic tumor necrosis factor- α production. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n.1, p. 119-25, 2004.
- UGAZ, O.L. **Investigación fitoquímica**. 2ed. Lima: Fondo Editorial, Pontificia Universidad del Peru: 1994.
- URBINA, J.M.; CORTES, J.C.G.; PALMA, A.; LÓPEZ, S. N.; ZACCHINO, S.A.; ENRIZ, R.D.; RIBAS, J.C.; KOUZNETSOV, V.V. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamino-1-butenes and related compounds with inhibitory activities of (1-3) β glucan and chitin synthases. **Bioorg. Med. Chem.** 8:591-598, 2000.
- VAN BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PÈCHERE, J.C.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **J. Antimicrob. Chemother.** v.51, p.1055-1065, 2003.
- WRIGTH, L.; SCOTT, E.; GORMAN, S. The sensitive of mycelium, arthrospores and microconidia of *Trichophyton metagrophytes* to imidazoles determined by *in vitro* tests. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, p. 317-323, 1983.
- WILKENS, M.; ALARCON C.; URZUA. A.; MENDOZA, L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta Med.**, v.68 n. 5, p. 452-454, 2002.
- WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p318-334, 2001.
- XU, H.X.; LEE, S.F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phyther. Res.**, v. 15, n. 1. p.39-43, 2001.
- YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 4, p. 921-4, 2002.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova.** v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** Chapecó: Argos, 2001, 500p.

YUNES, R.A., CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química das plantas medicinais. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** Chapecó: Argos, p.18-42, 2001.

ZACCHINO, S.; SANTECCHIA, C.; LÓPEZ, S.; GATTUSO, S.; MUNOZ, J.; CRUANES, A.; VIVOT, E.; CRUANES M.; SALINAS, A.; RUIZ, R.; RUIZ, S. *In vitro* antifungal evaluation and studies on the mode of action of eight selected from the argentine flora. **Phytomedicine**, v. 5, p. 389-395, 1998.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifungicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** Chapecó: Argos, p. 47-75, 2001.

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. **Plant derived antimycotics: current trends and future prospects.** The Haworth Press, 1-41, 2003.

ZHAO, W.X., LIANG, C.L., CHEN, Z.M., PANG, R.Q., ZHAO, B., CHEN, Z.L. Luteolin inhibits proliferation and collagen synthesis of hepatic stellate cells. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 10, n. 3, p. 204-6, 2002.

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](#)