

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COORDENAÇÃO DE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E
IN VIVO DE *Croton urucurana* BAILLON
(SANGRA D'ÁGUA)**

Íris Santana de Oliveira

CUIABÁ – MT

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COORDENAÇÃO DE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*
E *IN VIVO* DE *Croton urucurana* BAILLON
(SANGRA D'ÁGUA)**

Íris Santana de Oliveira

**Dissertação submetida à Coordenação de
Programas de Pós-Graduação em Medicina, da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Federal de Mato Grosso, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde - Área de Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins

Co-Orientadora: Profa. Dra. Regilane Matos da Silva

Área de Concentração: Farmacologia

Cuiabá – MT

2007

Esta dissertação foi submetida como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde, outorgado pela Universidade Federal de Mato Grosso e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central.

A citação de qualquer trecho dessa Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética.

Íris Santana de Oliveira

Dissertação aprovada em: 01 / 06 / 2007

**Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins
(Orientador)**

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Profa. Dra. Nair Honda Kawashita

À Deus pela vida, força e garra para a realização deste trabalho.

Aos meus pais: Romualdo Batista de Oliveira e Josefina Santana pelo amor, dedicação, educação, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, pois o que sou devo a eles.

A minha irmã Iara pelo carinho, apoio e companheirismo a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins, meu especial agradecimento pela oportunidade, orientação e dedicação para elaboração desse trabalho, pela aprendizagem e postura diante da ciência.

À Profa. Dra. Regilane Matos da Silva, meus agradecimentos pela amizade, co-orientação e dedicação para a realização desse trabalho.

Ao MSc. Joaquim Corsino da Silva Lima pela amizade e colaboração nesse trabalho.

Ao Prof. Msc. Harry Lorenzi do Instituto *Plantarum* para Estudos da Flora em Nova Odessa – SP, pela ratificação taxonômica da planta utilizada nesse estudo.

Ao Técnico em Botânica, Libério de Amorim Neto, do Instituto de Biociências da UFMT, pela presteza e auxílio na coleta do material botânico utilizado nesse estudo.

À Dra. Ilza Martha de Souza Diretora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Cuiabá - UNIC por conceder a utilização do Laboratório de Farmacognosia para realização de parte dos experimentos desse trabalho.

Ao Prof. MSc. Rogério Alexandre Nunes Santos do Curso de Farmácia da UNIC, pela amizade, orientação e dedicação concedida quando da realização da abordagem fitoquímica preliminar e bioautografia.

À Coordenação de Programas de Pós-graduação em Medicina pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Ciências da Saúde e pelo apoio financeiro.

Às amigas do mestrado, Neyres Zínia Taveira de Jesus, Ângela Márcia Selhorsts e Silva Beserra e Maria do Carmo Souza pela ajuda prestada na realização dos experimentos e a boa convivência.

Aos alunos de iniciação científica João Paulo, Kleber José Campos Prado e Nicolay Kircov pela ajuda prestada na coleta da planta.

Ao amigo MSc. Iberê Ferreira da Silva Júnior pelo incentivo em fazer o mestrado e pela ajuda prestada na execução desse trabalho.

À amiga Ana Paula Muller.

Aos funcionários do Biotério Central, em especial aos Senhores Francisco Barros Pereira e Jorge Domiciano, pelos cuidados dispensados aos animais e pelo bom tratamento a mim direcionado, todas as vezes que precisei.

À todos que de forma direta ou indireta me ajudaram e colaboraram para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

CAPÍTULO	PG
Lista de Abreviaturas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Generalidades.....	01
1.2. Bactérias.....	02
1.2.1. Bactérias Gram-positivas.....	04
1.2.2. Bactérias Gram-negativas.....	07
1.3. Antimicrobianos.....	10
1.3.1. Classificação dos Antimicrobianos.....	12
1.4. Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana.....	17
1.5. <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	22
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS.....	28
3.1. Material Botânico.....	28
3.1.1. Coleta da Planta.....	28
3.1.2. Coleta e Armazenamento do Material Botânico.....	28
3.1.3. Identificação Botânica.....	31
3.2. Animais Experimentais.....	32
3.3. Microorganismos.....	32
3.4. Drogas e Reagentes.....	33
3.5. Equipamentos e Utensílios.....	36
4. MÉTODOS.....	39

4.1. Obtenção dos Extratos Brutos.....	39
4.2. Determinação do Peso Seco.....	39
4.3. Determinação do Rendimento.....	40
4.4. Ensaio Microbiológicos <i>in vitro</i>	40
4.4.1. Ensaio de Difusão em Disco.....	40
4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42
4.5. Estudo Fitoquímico.....	44
4.5.1. Abordagem Fitoquímica Preliminar.....	44
4.5.2. Estudo Analítico - Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	46
4.6. Bioautografia.....	47
4.7. Infecção Sistêmica em Camundongos.....	49
4.8. Análise dos Dados.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Determinação do Peso Seco e Rendimento dos Látex, dos Extratos das Folhas e dos Extratos da Entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon..	50
5.2. Ensaio de Difusão em Disco.....	51
5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	55
5.4. Estudo Fitoquímico.....	58
5.4.1. Abordagem Fitoquímica Preliminar.....	58
5.4.2. Estudo Analítico - Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	59
5.5. Bioautografia.....	61
5.6. Infecção Sistêmica em Camundongos.....	64
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Broth Heart Infusion
BOTECO	Departamento de Botânica e Ecologia
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
DE₅₀	Dose efetiva mediana 50 %
D.P.	Desvio padrão
FeCl₃	Cloreto férrico III
HCl	Ácido clorídrico
MTT	Cloridrato de metiltiazolotetrazólico
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
NH₄OH	Hidróxido de amônia
P.A.	Pureza analítica
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
R	Rendimento
Rf	Fator de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
U.V.	Luz Ultra Violeta
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PG
1 -	Diferenças estruturais entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	04
2 -	<i>Croton urucurana</i> Baillon (Euphorbiaceae).....	24
3 -	Coleta do látex de <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	29
4 -	Folhas coletadas de <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	30
5 -	Entrecasca coletadas de <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	30
6 -	Exsicata de <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	31
7 -	Fluxograma do protocolo experimental.....	38
8 -	Triagem da atividade antibacteriana dos látex e extratos das folhas e entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon e do cloranfenicol (droga padrão) pelo ensaio de difusão em disco.....	41
9 -	Preenchimento da microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos látex e extratos da entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon e do cloranfenicol (droga padrão). CE: controle de esterelidade; CC: controle de crescimento.....	43
10 -	Placas bioautográficas do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon (A) e do cloranfenicol (B), droga padrão, em câmara úmida.....	48
11 -	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos látex e extratos	56

da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon (A) e cloranfenicol (B), droga padrão, pelo método de diluição em microplaca.....

12 - Perfil cromatográfico do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon. Rf: fator de retenção..... 60

13 - Atividade antibacteriana do látex seco (A), extrato etanólico 75 % da entrecasca (B) de *Croton urucurana* Baillon e cloranfenicol, droga padrão (C) pelo método de bioautografia..... 62

LISTA DE TABELAS

TABELA	PG
1 - Classificação dos antibióticos segundo o seu efeito sobre as bactérias.....	12
2 - Relação das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios antimicrobianos.....	33
3 - Relação das drogas, reagentes e corantes utilizados nos ensaios microbiológicos e abordagem fitoquímica.....	34
4 - Utensílios e equipamentos utilizados nos ensaios microbiológicos e abordagem fitoquímica.....	36
5 - Pesos secos e rendimento dos látex, extratos das folhas e entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	50
6 - Triagem da atividade antibacteriana dos látex <i>in natura</i> e seco de <i>Croton urucurana</i> Baillon pelo método de difusão em disco.....	52
7 - Triagem da atividade antibacteriana dos extratos das folhas de <i>Croton urucurana</i> Baillon pelo método de difusão em disco.....	53
8 - Triagem da atividade antibacteriana dos extratos da entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon pelo método de difusão em disco.....	54
9 - Atividade antibacteriana dos látex <i>in natura</i> e seco e dos extratos etanólico 75 % e clorofórmico da entrecasca do <i>Croton urucurana</i> Baillon no ensaio de microdiluição em caldo.....	57
10 - Análise fitoquímica preliminar do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de <i>Croton urucurana</i>	58

	Baillon.....	
11 -	Valores dos fatores de retenção do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	59
12 -	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de <i>Croton urucurana</i> Baillon pelo método de bioautografia.....	63
13 -	Atividade antibacteriana <i>in vivo</i> do látex seco de <i>Croton urucurana</i> Baillon no modelo de infecção sistêmica em camundongos induzido pela <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	65

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *CROTON URUCURANA* BAILLON (SANGRA D'ÁGUA). Oliveira, I. S. Dissertação submetida à Coordenação de Programas de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Orientador: Domingos Tabajara de Oliveira Martins. Co-Orientadora: Regilane Matos da Silva.

Nos últimos anos tem-se observado o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado. Diante desta problemática torna-se necessário o desenvolvimento de novos antibióticos farmacologicamente ativos. As plantas medicinais brasileiras representam uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, pois o Brasil é detentor de uma rica diversidade vegetal e étnico-cultural. *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae), conhecida popularmente por sangra d'água ou sangue de dragão, comumente encontrada no cerrado mato-grossense, é usada na medicina tradicional para tratar inflamações, infecções, câncer, diarreia e ferimentos. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do *Croton urucurana* frente às bactérias, gram-positivas e gram-negativas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. A atividade antibacteriana dos látex *in natura* e seco e dos extratos das folhas e entrecasca de *C. urucurana* foram avaliadas pelo método de difusão em disco. Os látex *in natura* e seco e os extratos clorofórmico e etanólico da entrecasca foram selecionados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A partir da determinação da CIM, foi realizada a abordagem fitoquímica preliminar e a bioautografia do látex seco e do extrato etanólico da entrecasca. A atividade *in vivo* do látex seco foi avaliada pelo modelo de infecção sistêmica em camundongos induzida por *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Os látex *in natura* e látex seco apresentaram melhor atividade antibacteriana quando comparados aos extratos das folhas e entrecasca nos ensaios de difusão em disco e microdiluição em caldo. A abordagem fitoquímica preliminar do látex seco e do extrato etanólico da entrecasca revelou as presenças de alcalóides, antocianidinas,

antocianinas, catequinas, esteróides, fenóis hidrolizáveis, flavonas, isoflavonas, quinonas, saponinas, os quais segundo a literatura são dotados de atividade antimicrobiana. O ensaio de bioautografia revelou que o látex seco e o extrato etanólico apresentam substâncias de natureza e polaridades distintas capazes de inibir o crescimento bacteriano. O látex seco apresentou atividade antibacteriana *in vivo* prevenindo a morte dos animais infectados. Os resultados apresentados demonstram que *C. urucurana* apresenta atividade antibacteriana de baixa potência farmacológica, validando seu uso popular em certos processos infecciosos.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN VITRO AND IN VIVO OF CROTON URUCURANA BAILLON (SANGRA D'ÁGUA). Oliveira, I. S. Dissertation submitted to coordination of the course of Pos-Graduation in Sciences of the Health, the Department of Basic Sciences in Health of the College of Medical Sciences of the Federal University of Mato Grosso, as partial requisite for obtaining of the degree Master in Sciences of the Health. Advisor: Domingos Tabajara de Oliveira Martins. Co-advisor: Regilane Matos da Silva.

In the last years, the increase of the bacterial resistance to antibiotics availables in the market has been observed. Ahead of this problematic, the development of new active antibiotic becomes necessary. As alternative we have the medicinal plants for the development of these new agents antimicrobials. Beyond that the Brazil to be a detainer of a rich biodiversity. *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae), known popularly for sangra d`água or dragon blood, commonly found in the Mato-grosso`s savanna, is used in traditional medicines for to treat inflammations, infections, cancer, diarrhoea and wounds. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of *Croton urucurana* against the strains positive-gram and negative-gram in antimicrobial models *in vitro* and *in vivo*. The antibacterial activity of latex *in nature* and dry and extracts from leaves and stem-bark, were evaluated with disk-diffusion method. The latex *in nature* and dry latex and chloroformic and ethanolic extracts from stem-bark were selected for the minimal inhibitory concentration (MIC) determination. After the determination of MIC, it was carried the preliminary phytochemistry assays and bioautographic of the dry latex and ethanolic extract from stem-bark. The *in vivo* activity of dry latex was evaluated by the systemic infection model in mice *for S. aureus* and *K. pneumoniae*. The *in nature* latex and dry latex had better presented when comparative the activity to extracts of leaves and stem-bark in both assays (disk-diffusion and determination of MIC). In phytochemistry assays, the dry latex and ethanolic extract from stem-bark showed the presence of secondary metabolic, that according to literature are in relation to

antimicrobial activity. The bioautographic assay disclosed that these tests drugs present substances possess of nature and polarities distinct capable to inhibit the bacterial growth. The dry latex presented *in vivo* antibacterial activity in to prevent the death of infected animals. Ours results showed that *C. urucurana* presents antibacterial activity, confirming its popular use certain as antiinfectious process.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

A época áurea da terapia antimicrobiana iniciou-se em 1941 e desde então inúmeros pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais, usando-se um ou mais esquemas terapêuticos com os antibióticos (Falcão et al., 2002).

O uso indiscriminado de antibióticos contribuiu para o crescente surgimento de patógenos multirresistentes, iniciando com as sulfanamidas, drogas utilizadas no tratamento de infecções meningocócicas e gonocócicas na década de trinta. Desde então, as bactérias desenvolveram capacidade de adaptação de distintos mecanismos de resistência frente ao enorme arsenal de antibióticos disponíveis (Falcão et al., 2002; Patiño, 2003).

A evolução e disseminação dos microorganismos resistentes aos antibióticos resultaram de várias combinações, como o uso inadequado e irracional dessas drogas, desperdícios de restos de antimicrobianos no meio ambiente, seus empregos industrial (conservação de alimentos) e comercial (engorda de animais) e a versatilidade genética dos microorganismos, como as mutações genéticas, síntese de enzimas que inativam a droga e prevenção de acesso ao sítio de ação (inibição da absorção ou aumento da excreção) ou modificação do sítio alvo (Freitas et al., 2004; Tavares, 2000).

Associado à resistência antimicrobiana, houve um aumento dramático de infecções, principalmente fúngicas, como resultado das imunodeficiências associadas Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), quimioterapia anticancerígena, transplantes, aos idosos e neonatos (Schaechter et al., 2002; Zacchino et al., 2003).

Os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais nos Estados Unidos. Isso gera dispêndios de 15% dos 100 bilhões de dólares gastos anualmente com medicamentos, existindo cerca de 4.000 antibióticos conhecidos, dentre eles os de última geração (Patiño, 2003).

Apesar do crescimento considerável na produção dos antimicrobianos, é observado que o aumento da resistência bacteriana é mais rápida que a capacidade da indústria em produzir novos antibióticos.

Com base no exposto, torna-se necessário medidas para assegurar o uso racional dos antibióticos, a implementação de pesquisas visando a compreensão do mecanismo genético da resistência, bem como o desenvolvimento de novas drogas, particularmente de fontes naturais.

1.2. Bactérias

As bactérias são seres procariontes (células destituídas de núcleo), simples, encontrados na maioria dos ambientes naturais, capazes de causarem mais doenças infecciosas do que qualquer outro parasita (Rang et al., 2007).

São células esféricas ou em forma de bastonetes curtos com tamanhos variados, alcançando micrômetros, procarióticas uni ou pluricelular, com organização relativamente simples e características. Apresentam várias estruturas, algumas das quais estão presentes apenas em determinadas espécies, enquanto outras são essenciais, e, portanto encontradas em todas as bactérias (Schaechter et al., 2002; Trabulsi et al.; 2002; Murray et al., 2004; Mims et al.; 2005).

A citologia bacteriana, estrutura interna e algumas externas dão idéia do funcionamento das bactérias. Podem apresentar estruturas como flagelos, fimbrias, cápsulas, esporos, estruturas estas que estão envolvidas com a virulência e patogenicidade da bactéria.

As invaginações presentes na membrana citoplasmática (mesossomos) estão envolvidas com a duplicação do DNA (Murray et al., 2004; Mims et al., 2005).

Uma das estruturas essenciais da bactéria é a membrana citoplasmática, estrutura que mede aproximadamente 8 μm de espessura, responsável pela separação do citoplasma com o meio externo, composta por 60% de proteínas imersas em uma camada fosfolipídica, variando entre diferentes espécies bacterianas e condições de cultivo (Sartori, 2005). Essa camada lipídica é semelhante aos dos eucariontes, mas não contém esteróides (por exemplo, colesterol), sendo os micoplasmas uma exceção (Schaechter et al., 2002; Murray et al., 2004).

A parede celular é uma estrutura rígida que é responsável pela forma bacteriana e desempenha papel na divisão celular, como *primer* para sua biossíntese. É constituída por ácido diaminopimérico, ácido murânico e ácido teicóico e também aminoácidos, carboidratos e lipídios. O principal componente da parede celular dos procariontes é o peptidoglicano (mucopéptideo ou mucerina) que é responsável pela sua rigidez. A parede celular tem como função proteger a célula bacteriana e manter a pressão osmótica intrabacteriana, além de funcionar como suporte de antígenos somáticos bacterianos.

Com base nas características da parede celular, as bactérias podem ser classificadas em gram-positivas e gram-negativas, baseando-se na coloração ou não destes microorganismos pelo método de Gram. (Schaechter et al., 2002). A parede celular de bactérias gram-positivas difere-se das bactérias gram-negativas pela presença de uma espessa camada de peptidoglicano e pela ausência de uma membrana externa. Esta diferença de constituição da parede celular é a base da coloração de Gram, uma técnica primordial no diagnóstico microbiológico, visto que através dela se definem características morfológicas e tintoriais da bactéria em pesquisa (**Figura 1**).

Porém o significado desta coloração ultrapassa de longe o conceito de uma simples reação de cor empírica. Os microorganismos gram-positivos e gram-negativos diferem em

vários aspectos, e não apenas na estrutura de parede celular, o que implica na ação dos antibióticos (Rang et al., 2007).

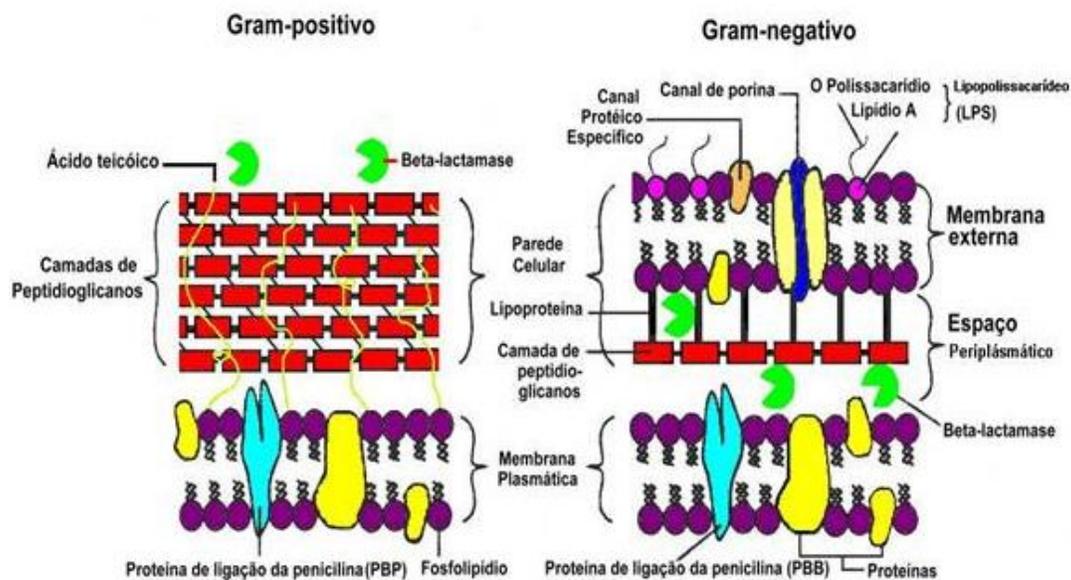


Figura 1. Diferenças estruturais entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

1.2.1. Bactérias Gram-positivas

A parede celular dos microrganismos gram positivos é uma estrutura relativamente simples, com uma camada de peptidoglicano mais espessa (15-50 nm) do que nas bactérias gram-negativas e, desta forma mais rígida. Consiste em cerca de 50% de peptidoglicano, de 40-45% de polímeros ácidos (responsáveis pela elevada polaridade da superfície celular e que

apresentam carga negativa) e de 5-10% de proteínas e polissacarídeos. A camada de polímeros fortemente polares influencia a penetração celular de compostos com carga positiva, como a estreptomicina (Rang et al., 2007).

As bactérias gram-positivas são sensíveis à lisozima e sua parede celular constitui alvo de ação de alguns antibióticos, bem como apresenta elementos básicos para a identificação sorológica da espécie.

Enterococcus faecalis

São cocos gram-positivos entéricos, classificados como *Streptococcus* do grupo D, apresentam antígeno D na superfície de sua parede celular. São microorganismos comensais com limitado potencial de produzir doença, pois suas toxinas são de baixa virulência. São causa de doenças comensais (adquiridas em hospitais), sendo responsável por 10% das infecções em pacientes que fazem uso de catéteres urinários ou intravasculares ou naqueles hospitalizados por um longo período e que receberam antibióticos de amplo espectro de ação. Assim sendo, podem ser as causas de bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário (ITU) e infecções em ferimentos (Murray et al., 2004).

Staphylococcus aureus

São cocos gram-positivos, catalase positivos, residentes da microbiota da pele e mucosa.

O *Staphylococcus aureus* é comumente envolvido em infecções piogênicas humanas tanto de origem comunitária como hospitalar, localizadas na pele (foliculites, furunculose) ou em regiões mais profundas (osteomielite, bacteremias, pneumonia, endocardites). Atualmente, espécies coagulase-negativas podem ser responsáveis por

infecções graves em pacientes imunocomprometidos ou aqueles submetidos a implantes de próteses nos ambientes hospitalares (Schaechter et al., 2002; Sartori, 2005).

Staphylococcus epidermidis

São cocos gram-positivos, coagulase negativos que fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa (Trabulsi et al., 2002).

O *S. epidermidis* é um patógeno oportunista associado à sepse, endocardite pós prótese de válvulas e em infecções por drenos. A produção extracelular de muco é um marcador de virulência e contribui para colonizar os implantes plásticos (próteses e catéteres endovenosos) (Mims et al., 2005).

Pesquisas recentes mostram esse patógeno é uma das principais causas de oftalmite após o procedimento cirúrgico de implantação de lentes intra-oculares, especialmente em pacientes imunodeprimidos, como no caso dos portadores HIV-positivos (Gus et al., 2006).

Streptococcus pyogenes

São cocos gram-positivos em cadeia, catalase-negativos, pertencentes ao grupo A, β -hemolíticos.

Possuem a capacidade de aderirem à superfície das células do hospedeiro, de invadirem células epiteliais, de apresentarem formas de escape da fagocitose e capacidade de elaborarem enzimas (estreptocinases A e B, desoxirribonucleases, hialuronidases) e exotoxinas (estreptolisinas O e S eritrogênicas), desta forma contribuindo para sua virulência. Produzem infecções das vias respiratórias superiores, pele e tecidos moles, ou seja, faringite e erisipela (Murray et al., 2004; Mims et al., 2005).

1.2.2. Bactérias Gram-negativas

Apresentam um espaço periplasmático, que contém enzimas como as proteases, nucleases, lípases e β -lactamases e proteínas transportadoras (Trabulsi et al., 2002).

A parede celular das gram-negativas apresentam uma camada mais delgada (2 nm), com composição mais complexa. É superposta por uma membrana externa, ancorada por fosfolípidos, lipopolissacarídeos (LPS) e lipoproteínas no peptidoglicano, sendo as duas últimas as mais importantes (Murray et al, 2004; Mins et al., 2005).

A membrana externa distingue as bactérias gram-negativas das gram-positivas, servindo como barreira seletiva aos xenobióticos. Os polissacarídeos complexos presentes na camada externa constituem as endotoxinas que *in vivo* desencadeiam vários aspectos da reação inflamatória, como a ativação do sistema complemento.

O LPS presente na membrana externa atua como fator de virulência, causando febre, diarreia, hemólise, podendo levar ao choque potencialmente fatal (Murray et al, 2004; Mins et al., 2005).

Apresentam proteínas de membrana que formam canais transmembrânicos repletos de água, denominados porinas, através dos quais os antibióticos hidrofílicos podem deslocar-se livremente.

A barreira representada pela camada externa contribui para a resistência das bactérias gram-negativas a vários antibióticos, incluindo a benzilpenicilina, metilicina, macrolídeos, bacitracina (Rang et al., 2007).

Escherichia coli

São bacilos gram-negativos, móveis ou não, pertencentes à flora intestinal, capazes de sintetizarem os aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e carboidratos necessários para o seu crescimento (Murray et al., 2004).

A *E. coli* é uma bactéria comum e clinicamente importante, está associada a uma variedade de doenças como a sepse, as ITU, meningites e gastroenterites. Apresenta os antígenos O, H e K relacionados com sua patogenicidade e também úteis para sua identificação. Possui ampla variedade de fatores de virulência, como as adesinas e as exotoxinas. As infecções causadas por essa bactéria, com exceção da meningite neonatal e das gastroenterites, são de natureza endógena, manifestando-se em pacientes com as defesas comprometidas (Murray et al., 2004).

Klebsiella pneumoniae

São bacilos gram-negativos, sem exigências de crescimento. Possuem endotoxinas, fímbrias e outras adesinas, apresentam cápsulas que dão aspecto mucóide às colônias e contribuem para sua virulência.

A *Klebsiella pneumoniae* está relacionada com infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, como infecções do trato respiratório e urinário. Pode causar pneumonia lombar primária adquirida em locais de aglomerados comunitários, sendo os alcoólatras os mais propensos a desenvolverem este tipo de enfermidade. Mostra resistência a vários antibióticos, geralmente mediada por plasmídeos (Murray et al., 2004; Mims et al., 2005).

Pseudomonas aeruginosa

É encontrado no ambiente hospitalar, em reservatórios úmidos, como alimentos, pias, sanitários, equipamentos de tratamento respiratório e diálise (Murray et al., 2004).

O gênero compreende grande número de espécie sendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas malthophilia* e *Pseudomonas cepacia* as de interesse clínico (Trabulsi et al, 2002).

A *Pseudomonas aeruginosa* possui vários fatores de virulência, tais como as adesinas, cápsulas, toxinas e enzimas (Murray et al., 2004). É causa de infecções oportunistas em processos cirúrgicos, queimaduras e pneumonia após procedimentos de intubação, podendo resultar em bacteremias severas.

Salmonella typhimurium

São bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores de glicose.

A sua infecção se dá pela ingestão de produtos alimentares contaminados (aves, ovos, laticínios). Pacientes imunocomprometidos e aqueles com acidez gástrica diminuída são os grupos de maior incidência de infecção por esta bactéria. Podem desenvolver bacteremias e enterites caracterizadas por febre, náusea, diarreia e vômito sanguinolentos e cólicas abdominais (Murray et al., 2004).

Shigella flexneri

A *S. flexneri* não pertence a microbiota normal do intestino humano. São responsáveis por diarreia, muitas vezes graves, causam doenças por invadirem e replicarem nas células que revestem a mucosa gástrica. É causa comum de Shigellose, sendo uma das principais doenças infantis (Murray et al., 2004; Mims et al., 2005).

1.3. Antimicrobianos

O termo antimicrobiano é comumente usado para designar um antibiótico. Agente antimicrobiano pode ser definido como entidades químicas que matam ou inibem o crescimento de microorganismos.

Os antibióticos, em geral, são produtos metabólicos naturais produzidos por várias espécies de microorganismos (particularmente fungos) ou derivados semi-sintéticos destes, ou mesmo de origem sintética, capazes de impedirem o crescimento ou destruir microorganismos (fungos, bactérias, vírus) (Patiño, 2003; Mims et al., 2005).

Os preparados a base de casca de soja já eram utilizados pelos chineses para o tratamento de furúnculos a pelo menos 2500 anos atrás (Patiño, 2003).

A partir de 1877, Pauster e Joubert relatam o potencial dos microorganismos como agentes terapêuticos. Foi Erlich (1900) o primeiro a formular os princípios de toxicidade seletiva apresentada pelos antimicrobianos, a determinar as relações químicas entre os parasitas e os antimicrobianos, a descrever o mecanismo da resistência antibacteriana e o papel da terapêutica combinada no combate à esta resistência.

No século XX, surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. As descobertas de Paul Erlich revolucionaram a terapêutica e impulsionaram o desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica de síntese. Em 1905, Paul Ehrlich utilizou o termo “Quimioterapia” para descrever o uso de substâncias químicas sintéticas destinadas a destruir agentes infecciosos (De Souza et al., 2003). Em 1908, Gemo sintetizou a primeira sulfá, a sulfanilamida (Patiño 2003).

No ano de 1928, com a descoberta da penicilina isolada do fungo *Penicillium*, primeiro antibiótico de utilidade clínica, Alexander Fleming deu início a era da antibioticoterapia. Porém a penicilina da forma obtida, o primeiro antibiótico natural, tinha

fraca atividade. A purificação e avaliação antibacteriana dessa substância foram realizados por Florey e colaboradores (1939) em Oxford marcando o seu uso terapêutico (Sartori, 2005).

Na década de 30 iniciou-se a era da sulfa com Domak, sendo o primeiro a demonstrar um agente quimioterápico capaz de influenciar a evolução de uma infecção bacteriana. Descreveu a efetividade das sulfas, o Protonsil[®], um corante que demonstrou ser um pró-fármaco *in vitro*, exigindo o seu metabolismo *in vivo*, para produzir um produto ativo (sulfanilamida) (Rang et al, 2007). E em 1940, Woods descobre o mecanismo de ação das sulfonamidas durante a idade de ouro da síntese dos quimioterápicos. E desde então foram desenvolvidas numerosas sulfonamidas que continuam sendo úteis (Patiño, 2003).

A partir de 1941 começa a produção em grande escala e a utilização da penicilina com bons resultados na clínica (Patiño, 2003). O resultado final desse progresso científico refletiu na mudança da expectativa de vida para pacientes portadores de várias doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e alta mortalidade (Schaechter et al., 2002).

Por volta de 1944, Waksman inicia uma busca de microorganismos produtores de substâncias com atividades antibacterianas, descobrindo a estreptomicina iniciando a era dos quimioterápicos naturais, descobrindo também novos antibióticos originados de fungos e de outras bactérias. Nas décadas de 40 e 50 foram desenvolvidas também a tetraciclina, o cloranfenicol, a eritromicina e as penicilinas semi-sintéticas (Patiño, 2003; Rang et al., 2007).

Na década de 70, foi a vez da descoberta da trimetropima e sua eficácia quando associada ao sulfametoxazol (co-trimoxazol). Mais recentemente foram introduzidos na clínica antibióticos de última geração, como os carbapenens, quinolonas, assim como avançam-se as pesquisas para o desenvolvimento de novos antibióticos (Patiño, 2003; Rang et al., 2007).

1.3.1. Classificação dos Antimicrobianos

As ações dos antibióticos se refletem em termos de espectro bacteriano. Alguns antibióticos atuam em grupos seletos de microorganismos, a estes são atribuídos como de espectro de ação pequeno ou seletivo, outros atuam sobre um grande número de microorganismos, então denominados de antibióticos de amplo espectro de ação (Rang et al., 2007).

Segundo os efeitos dos antibióticos sobre as bactérias, estes podem ser classificados em bacteriostáticos ou bactericidas (Tabela 1). Bacteriostáticos são aqueles que inibem o crescimento bacteriano, o qual retorna a multiplicar-se com o inter rompimento do tratamento e bactericidas os que possuem capacidade de destruir as bactérias, sua ação terapêutica é irreversível (Penildon, 2002; Patiño, 2003; Rang et al., 2007).

Tabela 1. Classificação dos antibióticos segundo o seu efeito sobre as bactérias.

BACTERICIDAS	BACTERIOSTÁTICOS
Penicilinas	Tetraciclina
Cefalosporinas	Sulfonamida
Aminoglicosídeos	Novobiocina
Rifampicina	Cloranfenicol
Quinolonas	Macrolídeos
Monobactâmicos	Isoniazida
Polimixina B	Trimetoprima
Cefamicinas	Cicloserina
Bacitracina	Dapsona
Carbapenens	---
Colistina	---
Teicoplanina	---

Os antimicrobianos também podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, tendo como alvo de ação as estruturas da célula bacteriana, conforme se segue:

a) Inibidores da Síntese da Parede Celular

A parede celular das bactérias é um envoltório de proteção. O principal constituinte é o peptidoglicano, cuja síntese consiste de três etapas principais, cada uma destas afetada por diferentes grupos de antibiótico.

A inibição da síntese da parede celular exerce um efeito bactericida. Os fármacos pertencentes a este grupo são denominados de antibióticos β -lactâmicos, compreendendo:

- Penicilinas: benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, pivampicilina, carbenicilina, ticarcilina, azilocilina.
- Cefalosporinas: cefalexina, cefaclor, ceftriaxona, cefadroxil, cefalotina, cefazolina, cefproxil, cefoxitina.
- Cefamicinas: cefuroxima, cefixima, cefotaxima, cefpima, cefipiroma.
- Carbapenens: imipenem, meropenem.
- Monobactâmicos: aztreonam.
- Bacitracina, fosfomicina, tercoplamina.

b) Inibidores da Síntese dos Ácidos Nucléicos

São antibióticos que impedem que a bactéria seja capaz de produzir componentes fundamentais do seu material genético como o ácido desoxirribonucléico (DNA) que são genes empregados de transmitir as características próprias de cada espécie.

- Sulfonamidas: sulfadiazina, sulfadimidina, sulfametoxazol, sulfassalazina, sulfametopirazina.

- Trimetoprima

Essas duas classes de fármacos interferem inibindo a síntese ou a ação do folato.

- Fluoroquinolonas e quinolonas: ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, pefloxacina, ácido nalidixico (quinolona). Essa classe inibe a atividade da topoisomerase II.

c) Inibidores da Síntese de Proteínas

Estes antibióticos impedem a síntese de proteínas bacterianas indispensáveis à sobrevivência dos microorganismos, por interferirem na formação do RNAm, na fixação do RNAm ao ribossoma, por alteração no ribossoma e na fixação do RNAt ao ribossoma.

- Tetraciclina: tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, minociclina.

- Aminoglicosídeos: gentamicina, estreptomicina, ampicacina, tobramicina, netilmicina, neomicina, canamicina.

- Macrolídeos: eritromicina, claritromicina, azitromicina.

- Estreptograminas: quinopristina, dalfopristina.

- Lincosamidas: clindamicina.

- Cloranfenicol, ácido fusídico, linezolida.

d) Fármacos antimicobacterianos

São fármacos que atuam frente às infecções micobacterianas – tuberculose e hanseníase – ambas tipicamente infecções crônicas, causadas, respectivamente, por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*.

Fármacos utilizados no tratamento da tuberculose

- Isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazenamida, capriomicina, ciclosserina.

Fármaco utilizado no tratamento da hanseníase

- Dapsona, rifampicina e clofazimina.

e) Diversos

- Vancomicina: principal antibiótico glicopeptídico, apresenta efeito bactericida e atua inibindo a síntese da parede celular.
- Teicoplanina: semelhante à vancomicina, porém com ação mais prolongada.
- Nitrofurantoína: composto sintético de amplo espectro de ação, porém seu mecanismo de ação permanece desconhecido.
- Polimixina B e colistina: exibem propriedades catiônicas, interagem com o fosfolípídeo de membrana celular e a desagregação de sua estrutura.
- Metronidazol: é um agente antiprotozoário que apresenta atividade sobre bactérias anaeróbicas (*Bacteróides*). Acredita-se que seu mecanismo de ação seja devido a modificação no DNA do trofozoíta por produtos tóxicos de oxigênio formados pelo parasita a partir do fármaco.

f) Antibióticos em estudo

- Everninomicina: oligossacarídeo com atividade contra *S. aureus* resistente, em estudo clínico de fase III.

- Cetolídicos: derivados macrolídeos eficazes contra microorganismos resistentes a múltiplos fármacos, em estudos de fase III.

- Gemifloxanona, moxifloxacilina, gatifloxacina: novas fluoroquinolonas eficazes contra *S. pneumoniae* resistente a múltiplos fármacos.

1.4. Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana

As plantas medicinais fazem parte da história da humanidade, tendo sido empregadas na alimentação, em práticas religiosas, no folclore, na medicina e nas lendas (Cowan, 1999).

Os chineses já utilizavam as plantas medicinais desde 3700 a.C. e acreditavam que havia uma planta apropriada para o tratamento de cada doença (Cowan, 1999).

A utilização das plantas é baseada na crença popular e apesar do emprego empírico, muitas delas são utilizadas até hoje e ainda não foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (De Souza et al., 2003; Niero et al., 2003).

O amplo uso das plantas medicinais, muitas vezes substituindo a prescrição médica, pode ser justificado em parte, pelo alto grau de aceitabilidade, bem como, a grande disponibilidade destes recursos, diferente do que ocorre com os medicamentos industrializados, que dependem da tecnologia e matéria-prima externas e apresentam custos elevados (Amorim et al., 2003).

Entre as principais ferramentas na busca de novos modelos moleculares estão informações de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo farmacológico das preparações utilizadas, abordadas, respectivamente no âmbito da etnobotânica e da etnofarmacologia (Rates, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais tem sido a melhor escolha para o desenvolvimento de novos agentes farmacologicamente ativos, permitido a descoberta de fármacos clinicamente úteis para tratamento de diversas doenças (Joyce, 1994; Nascimento et al., 2000).

A quantidade de plantas existentes no planeta, reconhecida sob o ponto de vista científico, situa-se entre 250 a 500 mil espécies, contendo uma grande diversidade de

compostos químicos, superiores à diversidade derivada dos processos de síntese (Simões et al., 2000).

O valor da magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies vegetais superiores catalogadas de um total estimado entre 350.000 à 550.000 (Simões et al., 2000). No entanto, apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas na busca de novos compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais.

Atualmente observa-se o crescente interesse das indústrias farmacêuticas, no âmbito de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, dentre elas os antimicrobianos. As fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos, como também podem ser protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas com novos mecanismos de ação (Robbers et al., 1996; Biavatti, 2001; Newman et al., 2003; Amorim et al., 2003).

A OMS considera como essenciais, cerca de 250 medicamentos, sendo que 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais ou a partir de fonte natural (Niero et al., 2003). Somente 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (Simões et al., 2000).

As plantas produzem cerca de 100.000 produtos naturais de baixo peso molecular, também conhecidos como metabólitos secundários, que se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida das plantas, porém são dotadas de atividade farmacológica (Domingo & López-Brea, 2003).

Os metabólitos secundários das plantas podem ser divididas em dois grandes grupos: as fitoanticipinas, que estão presentes de forma constitutiva nas plantas e as fitoalexinas, cuja presença aumenta de forma considerável em resposta a invasão microbiana (Domingo & López-Brea, 2003). 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 (Simões et al., 2000).

Os extratos naturais de misturas herbáceas têm sido usados empiricamente há milhares de anos no tratamento de processos infecciosos. Os estudos estão voltados para o potencial antimicrobiano das plantas levaram a descoberta de vários compostos químicos, o diterpeno biflorina (*Capraria biflora*), triterpeno maitenina (Velasteraceae e Hipocrateaceae), primina e miconidina (*Miconia* sp), alcalóides anonaína e isoboldina (*Annona sazmani*) (Lima, 2001) e filantimida (*Phyllanthus sellowianus*), flavonóides luteolina e xantoxilina constituinte da *Sebastiania shottiana* (Schelemper et al., 1998; Sartori et al., 2003). A correlação entre o uso popular dessas plantas medicinais e a atividade farmacológica positiva para agentes antimicrobianos é de 55,2% (Sartori, 2005; Lima, 2001).

Devido à diversidade biológica brasileira, muitas plantas são utilizadas na forma de extrato bruto, infusões ou emplasto no tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica. Recentemente, vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de validar as propriedades antimicrobianas de uso popular de determinada região (Ríos & Recio, 2005).

Em estudos sobre plantas medicinais utilizadas pela população para tratamentos de doenças ou reações infecciosas, foram analisadas 13 plantas medicinais, selecionadas pela sua atividade antimicrobiana. Foram analisadas a *Arcitum lappa* (bardana, orelha-de-gigante), *Tanacetum vulgare* L. (tanaceto, erva dos vermes), *Psidium guajava* (gioabeira), *Mikania*

glomerata Spreng (guaco), *Spilanthes acmella* Mart (agrião do Brasil), *Lippia alba* (erva-cidreira), *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), *Piper regnellii* Miq. (paraipoba, capeva) *Eugenia uniflora* L. (pitanga), *Sambucus canadensis* L., *Plantago major* (tanchagem), *Erythina speciosa* Andrews (mulungu) e *Punica granatum* L. (romã) e apenas a *S. acmella* não apresentou atividade antimicrobiana (Holetz et al., 2002).

O potencial de extratos de plantas e fitofármacos em modelos de linhagem de microorganismos multirresistente a drogas, o efeito antimicrobiano sinérgico da associação dos extratos com antibióticos da flora brasileira também já foram avaliados. Avaliaram a *Achillea millefolium* (mil-folhas), *Caryophyllus aromaticus* (cravo da índia), *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Ocimum basilicum* (alfavaca), *Psidium guajava* (goiabeira), *Punica granatum* (romã), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Savia officinalis* (salvia), *Syzygium jambolanum* (jambolão) e *Thymus vulgaris* (tomilho). E os fitofármacos ácido benzóico, ácido cinâmico, eugenol e farnesol. Destas o cravo-da-índia, romã, jambolão e tomilho apresentaram melhores sobre microorganismos resistentes a antibióticos, agindo isoladamente ou associados a antibióticos, devido ao seu efeito sinérgico (Nascimento et al., 2000).

A partir de estudos etnofarmacológicos em comunidades de Porto Alegre revelaram 149 espécies de uso popular, sendo 20 plantas foram selecionadas para estudos antimicrobiano. Dessas apenas 12 plantas, a *Chapatalia mutans*, *Cordia monosperma*, *Echinodorus glandiflorus*, *Eugenia uniflora*, *Lonurus sibiricus*, *Luhea divaricata*, *Malva sylvestris*, *Ocotea odorifera*, *Parapiptadenia rigida*, *Pluchea sagitalis*, *Psidium catleyanum* e *Senna. neglecta* apresentaram atividade antimicrobiana (Coelho de Souza et al., 2004).

Numa triagem biológica de 60 plantas medicinais do cerrado de Belo Horizonte - MG, quanto ao seu potencial antimicrobiano, apresentaram destacando-se a *Brosimum gaudichaudi*, *Byrsonima coccolobifolia*, *Byrsonima intermedia*, *Byrsonima verboscifolia*,

Darla rugosa, *Emmatum nitens*, *Eugenia dysenterica*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Plathymania foliolosa*, *Qualea paviflorea*, *Styrax camporium* (Alves et al., 2000).

Como já foi mencionado, o Brasil detém uma rica biodiversidade, de tal forma que a floresta amazônica e a floresta atlântica, tem sido alvo de pesquisas de plantas com propriedades antimicrobianas. Sendo estudadas 705 plantas onde os melhores resultados foram atribuídas às famílias Anonaceae, Apocynaceae, Aquifoliaceae, Bignoaceae, Clusivaceae, Connaraceae, Euphorbiaceae, Flacouvitaceae, Lauraceae, Leguminosaceae, Malpipighiaceae, Milostamaceae, Miliaceae, Memecilaceae, Myristaceae, Myrsinaceae, Myrtaceae, Ochnaceae, Polygonaceae, Rabdodendraceae, Rubiaceae, Rutaceae, Sapindaceae, Samaroubaceae, Similacaceae (Suffredini et al., 2004).

Estudos com as plantas, *Hyptis ovalifolia* e *Eugenia uniflora*, nativas do cerrado brasileiro, revelaram atividade antifúngicas promissoras (Souza et al., 2002).

A avaliação de plantas medicinais concentra-se apenas na aplicação de ensaios *in vitro*, como métodos de difusão em disco ou ágar, determinação da concentração inibitória mínima, bioautografia entre outros. O fato é que as plantas exibem atividade antimicrobiana de interesse, pois aqui foram citados alguns exemplos. Mas os dados obtidos são apenas preliminares, informações prévias que devem ser melhoradas, na busca da identificação de compostos ativos por meios de ensaios bioguiados (Ríos & Recio, 2005).

Com base no exposto, faz-se necessário pesquisas que levem a descoberta do potencial da atividade apresentada pelas plantas, incluindo estudos de toxicidade sobre as células animais e humanas, mecanismo de ação *in vivo*, interações positivas e negativas com antibióticos comuns ou os mais potentes (Ríos & Recio, 2005). Desta forma, as plantas medicinais são alvos de estudos de pesquisas e avaliação, que contribuirão para obtenção de fármacos seguros, estáveis, padronizados e eficientes contra bactérias, fungos, vírus, helmintos, protozoários ou mesmo antitumorais.

1.5. *Croton urucurana* Baillon

A família Euphorbiaceae que é constituída aproximadamente de 300 gêneros e 7500 espécies, de distribuição cosmopolita, mas com desenvolvimento mais acentuado nas regiões tropicas e subtropicais. O gênero *Croton* pertencente a esta família é contituída de aproximadamente 750 espécies dentre elas a espécie *Croton urucurana* Baillon (Mattos, 2001).

A árvore mede aproximadamente de 6 a 8 metros de altura, de copa aberta e tronco claro com até 20 cm de diâmetro. Folha em forma de coração, que adquirem a coloração vermelha-amarelada quando estão pra cair, principalmente no outono. Flores pequenas e esbranquiçadas, dispostas em inflorescência espigadas terminais. Quando seu tronco é cortado ou ferido, libera uma seiva que, em contato com ar, se torna resinosa e toma cor vermelha como sangue, daí a razão de alguns nomes populares atribuídos a esta planta. É nativa de terrenos úmidos e pantanosos de quase todo o Brasil, especialmente Amazônia (**Figura 2**) (Lorenzi & Matos, 2002).

É uma planta de ocorrência na Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Comumente encontrada no cerrado Matogrossense as proximidades de córregos, riachos e rios. *Croton urucurana* recebe algumas denominações populares, como drago, sangue-de-drago, sangue-da-água, sangra d'água, urucurana, lucurana, capixingui (SC), tapexingui, tapixingui. Existem várias espécies deste gênero com características semelhantes, destacando-se entre elas o *Croton salutaris*, *Croton lecheri*, *Croton planostigma* (Lorenzi & Matos, 2002).

Croton urucurana é uma das espécies selecionadas como típica de regeneração de mata ciliar. É uma espécie resistente às inundações e geadas com bom índice de pegamento,

usada no melhoramento das condições do solo, para que outras espécies possam colonizar este ambiente (Pires et al., 2004).

Os primeiros escritos sobre seu emprego medicinal datam do século XVII quando um naturalista espanhol descobriu que os poderes curativos de sua resina já eram amplamente conhecidos pelas populações nativas das Américas, desde o México até o Peru e Equador, cujo emprego tanto da resina quanto da casca era usado como remédio natural pelos índios da Amazônia. Usavam a seiva pra curar ferimentos e estancar sangramentos, de forma que acelerava a cicatrização e evitando uma posterior infecção, devido a formação de uma barreira de proteção sobre o ferimento (Lorenzi & Matos, 2002).

Embora a sua eficácia e segurança não tenham sido comprovadas cientificamente sua utilização vem sendo feita de acordo com a tradição popular. A esta planta são atribuídas diversas propriedades terapêuticas como: antiulcerogênico, cicatrizante, antiinflamatória, antitumoral, antimicrobiana, anti-diarréica, hemostática, anti-séptica, antiviral e outras, e de acordo com a sua indicação ela pode ser usada via oral ou topicamente (Lorenzi & Matos, 2002; Mattos, 2001).



Figura 2. *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae).

Tanto a resina (látex) como a casca é exportada da América do Sul para uma indústria farmacêutica nos Estados Unidos, tendo patente sobre duas substâncias isoladas desta planta. Uma é de uso oral indicada para o tratamento de doenças respiratórias causadas

por vírus e a outra por aplicação local para Herpes. Como a maioria dos estudos clínicos são conduzidos por laboratórios farmacêuticos em seus países de origem, seu resultado raramente vem a público (Lorenzi & Matos, 2002).

Dos principais constituintes químicos isolados do gênero *Croton* presentes no látex temos os alcalóides (taspina), compostos fenólicos (lignanas, taninos, proantocianidinas, flavonóis), galocatequina, galoepicatequina, catequina, compostos terpenóides (diterpenos e esteróides), sendo as procianidinas e alcalóides considerados os constituintes ativos presentes no látex (Jones, 2003); das folhas foram isoladas a taspina, magnoflorine, isoboldina, norisoboldina, glaucina, taliporfina, terpenos (1,8 cineol, β -felandreno) (Jones, 2003; Santos, 2005); da entrecasca as catequina, galocatequina, esteróis (sitosterol, estigmasterol e campesterol), diterpenos (sonderianina, crotonina), triterpenos (ácido acetilaleuritólico) (Hiruma-Lima et al., 2002; Peres et al., 1997).

Os principais constituintes químicos desta planta presentes no látex são taninos, lignanas e um alcalóide denominado de taspina apresentando propriedades antiinflamatórias, além de alguns antioxidantes. A maioria dos estudos publicados concentra-se na elucidação das suas propriedades cicatrizantes atribuídas a dimetilcedrusina (lignana) e a taspina (alcalóide) (Lorenzi & Matos, 2002). Segundo Milo (2002), a fucoarabinogalactona, é o principal polissacarídeo, presente no exsudato gomoso de *C. urucurana*.

Da entrecasca de *C. urucurana* foram isolados o ácido acetilaleuritólico e catequinas ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus typhimurium* (Peres et al., 1997). São referidos também os isolamentos de esteróis (sitosterol, estigmasterol e campesterol), diterpenos (sonderianina), compostos fenólicos da entrecasca, estes com propriedades analgésicas, sendo a sonderianina também dotada de atividade específica para *Mycobacterium smigmatis* e *S. aureus* (Peres et al., 1997; Peres et al., 1998; Craveiro et al., 1982).

Trabalhos publicados mostram que o látex de *Croton urucurana* apresenta atividade antifúngica contra dermatófitos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* (Gurgel, 2005). Também foram relatadas propriedades antimicrobianas atribuídas a outras plantas do gênero *Croton*, para o *C. cajucara* Benth (avaliado o óleo essencial e o isolado linalol), *C. lecheri* (avaliado o látex), *C. pseudopulchellus* (atividade antibacteriana), *C. sonderianus* (avaliada as folhas) e o *C. hutchinsonianus* (avaliado a entrecasca) (Alviano et al., 2005; Jones, 2003; Lall & Meyer, 1999; Santos et al., 2005; Athikomkulchai et al., 2006).

Assim como a sua atividade antidiarréica em ratos, mostrando que o látex é eficaz nos casos de diarreia secretória associada a patologias (Gurgel et al., 2001). O látex também apresenta atividade antagonizantes para o veneno da *Bothrops jararaca*, inibindo as metaloproteinases envolvidadas no processo hemorrágico induzido, sendo a proantocianidinas a substância responsável por esta atividade (Esmeraldino et al., 2005). De acordo com os estudos realizados com *C. urucurana* podemos dizer que esta planta apresenta grande potencial terapêutico, com diversas propriedades farmacológicas apresentadas.

Neste trabalho foi avaliada a atividade antibacteriana do látex, das folhas e entrecasca de *C. urucurana*. Sendo que para o látex e a entrecasca temos publicações relatando a avaliação da atividade antimicrobiana, para as folhas nenhum trabalho foi realizado. Porém, alguns trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana das folhas de outras espécies do gênero *Croton*. Desta forma os trabalhos anteriores nos direcionaram a pesquisa da atividade antibacteriana das diferentes partes da planta.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os poucos estudos farmacológicos envolvendo a espécie *Croton urucurana* Baillon principalmente à sua atividade antimicrobiana, o presente trabalho teve por objetivo geral avaliar a atividade antibacteriana do látex, das folhas e da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) em diferentes modelos antimicrobianos *in vitro* e *in vivo*.

Como objetivos específicos foram:

- ❖ Realizar uma triagem da atividade antibacteriana do látex, dos extratos das folhas e da entrecasca de *Croton urucurana* pelo método de difusão em disco;
- ❖ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de diluição em microplaca do látex seco e *in natura* e dos extratos clorofórmico e etanólico 75% da entrecasca de *Croton urucurana*;
- ❖ Determinar o perfil fitoquímico e cromatográfico do látex seco e do extrato etanólico 75% da entrecasca de *Croton urucurana*;
- ❖ Realizar a bioautografia com o látex seco e extrato etanólico 75% da entrecasca de *Croton urucurana* contra bactérias gram-negativas e gram-positivas;
- ❖ Avaliar o látex seco de *Croton urucurana* em modelo *in vivo* de infecção sistêmica em camundongos induzidos por *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

3. MATERIAIS

3.1. Material Botânico

3.1.1. Coleta da Planta

O *Croton urucurana* Baillon foi coletado pela aluna de mestrado em Ciências da Saúde (Área de Farmacologia) Íris Santana de Oliveira, pelos alunos de iniciação científica Kleber José do Prado Campos e Nicolay Kircov do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, pelo técnico Libério Amorim Neto do Departamento de Botânica e Ecologia (BOTECO) do Instituto de Biociências (IB) e MSc. Joaquim Corsino da Silva Lima do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Médicas, todos da Universidade Federal de Mato Grosso.

O látex, as folhas e entrecasca de *C. urucurana* foram coletados no município de Barão de Melgaço na BR 364 nas proximidades do Córrego Areia, à 75 Km de Cuiabá (elevação 187, 15° 47' 866''S e 55° 36' 356''W) em 18 de novembro de 2005.

3.1.2. Coleta e Armazenamento do Material Botânico

• Látex do *Croton urucurana* Baillon

Para a coleta do látex foi desenvolvida uma adaptação do método de seringueiro de coleta em “V”, consistindo em realizar uma série de cortes no tronco da árvore, iniciando a 50 cm acima da altura do peito do coletador, com o cuidado de não atingir o lenho do tronco. Os cortes foram realizados em ângulo de 40 a 50° e culminaram um pouco antes do lado oposto, permitindo que o látex que exsuda do corte superior escorresse para o corte inferior e assim

sucessivamente, de maneira que todo o exsudato fosse direcionado verticalmente, pela força da gravidade, para um só ponto ao final dos cortes, onde foi fixada uma bica de seringueiro (Mattos, 2001).

Os cortes obedeceram a uma seqüência imediata, iniciados da parte inferior do tronco, a aproximadamente 30 cm de sua base, sendo a bica inserida na casca do caule. O látex coletado foi recolhido em recipientes de vidro previamente esterilizados e ao final transferidos para um frasco de maior capacidade volumétrica, obtendo-se 180 mL de látex. O látex coletado foi filtrado e parte seco em estufa à 40⁰ C (150 mL) e outra mantida em seu estado *in natura* (30 mL), ambos armazenados sob refrigeração à ± 4 °C (**Figura 3**).



Figura 3. Coleta do látex de *Croton urucurana* Baillon.

• Folhas do *Croton urucurana* Baillon

As folhas foram coletadas cortando o pecíolo das mesmas, limpas e secas à temperatura ambiente, sendo posteriormente trituradas em moinho elétrico (Tamis 5mm), obtendo-se o pó das folhas o qual foi utilizado para o preparo dos extratos (**Figura 4**).



Figura 4. Folhas coletadas de *Croton urucurana* Baillon.

• **Entrecasca do *Croton urucurana* Baillon**

A entrecasca foi obtida através de cortes horizontais no tronco da árvore, as quais foram limpas, fragmentadas e secas à temperatura ambiente. Foram trituradas em moinho elétrico (Tamis 5 mm), obtendo-se o pó da entrecasca o qual foi utilizado para o preparo dos extratos (**Figura 5**).



Figura 5. Entrecasca coletadas de *Croton urucurana* Baillon.

3.1.3. Identificação Botânica

Para identificação botânica, uma amostra testemunha do material florífero da planta foi depositada no Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso com o número de exsicata 35.011 (**Figura 6**). Essa identificação foi posteriormente realizada pelo Prof. Dr. Harry Lorenzi, do Instituto *Plantarum* para Estudo da Flora, Nova Odessa – SP e confirmando sua identificação como *Croton urucurana* Baillon.



Nome científico: *Croton urucurana* Baillon

Família: Euphorbiaceae

Nome popular: Sangra d`Água

Local coleta: Barão de Melgaço – MT

Coletador responsável: Íris Santana de Oliveira

Data da coleta: 18/11/2005

Partes coletadas: látex, folhas e entrecasca

Exsicata nº: 35.011

Herbário Central da UFMT

Identificação: Prof. Dr. Harry Lorenzi

Figura 6. Exsicata de *Croton urucurana* Baillon.

3.2. Animais Experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss Webster, adultos, machos, pesando entre 25-30g variando não mais que 5 g para cada teste microbiológico, provenientes do Biotério Central/PROPEQ da Universidade Federal de Mato Grosso. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, à 22 ± 1 °C, com ciclos de claro/escuro de 12 h, recebendo ração padrão Purina® (Labina) e água *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos de 24 h antes da realização do experimento, mantidos em gaiolas contendo telas de arame para evitar coprofagia, com livre acesso à água até 1h antes do ensaio.

3.3. Microorganismos

Todas as cepas bacterianas utilizadas nos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* foram cepas padronizadas, do tipo ATCC, adquiridas comercialmente, da marca Newprov® (Tabela 2).

Estas bactérias foram selecionadas, por se tratarem de microorganismos envolvidos em infecções oportunistas, hospitalares e alguns deles apresentarem resistência intrínscica.

Para a realização dos experimentos, todas as bactérias foram repicadas em ágar apropriado 24 h antes dos ensaios, para se tornarem viáveis e o experimento reprodutível.

Tabela 2. Relação das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios antimicrobianos.

Modelos <i>in vitro</i>		Modelos <i>in vivo</i>	
Cepas	ATCC	Cepas	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853		
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028		
<i>Shigella flexneri</i>	12022		
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615		

3.4. Drogas e Reagentes

As drogas, reagentes e corantes utilizados durante a realização dos ensaios microbiológicos e abordagem fitoquímica estão relacionados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Relação das drogas, reagentes e corantes utilizados nos ensaios microbiológicos e abordagem fitoquímica.

Drogas / Reagentes / corantes	Marca
Ácido clorídrico	Synth [®]
Ácido picrico saturado	Quimis [®]
Acetato de Etila	Synth [®]
Acetona	Dinâmica [®]
Ácido sulfúrico N	Dinâmica [®]
Agar BHI	Biobrás [®]
Agar Muller Hinton	Oxoid [®]
Ágar Muller Hinton com 5% sangue	Oxoid [®]
Agar nutritivo	Biobrás [®]
Água destilada	---
Água oxigenada volume 10	Miyako [®]
Alcool 70%	---
Álcool acetona	Newprov [®]
Álcool etílico P.A.	Synth [®]
Álcool metílico P.A.	Synth [®]
Benzeno	Vetec [®]
Caldo BHI	Biobrás [®]
Caldo Muller Hinton	Oxoid [®]
Carbonato de sódio 2,5%	Isofar [®]
Cloreto férrico III	Vetec [®]
Cloreto de sódio	Index [®]
Clorofórmio P. A.	Quimis [®]
Cristal violeta	Newprov [®]
Discos para antibiograma – cloranfenicol 30 µg	Cecon [®]
Eosina	Merck [®]
Éter etílico P.A.	Cromoline [®]
Fucsina fenicada	Newprov [®]
Hexano	Vetec [®]

Hidróxido de alumínio	Synth [®]
Hidróxido de amônia	Vetec [®]
Hidróxido de potássio	Vetec [®]
Isopropanol	Synth [®]
Lugol	Newprov [®]
Magnésio granulado	Sigma – Aldrich [®]
Meropenem 500mg	Biochimico [®]
Óleo de imersão	Newprov [®]
Reagente de Hager	---
Reagente de Dragendorff	---
Reagente Mayer	---
Reagente de Nesler	---
Sulfato de sódio anidro	Vetec [®]
Tolueno	Vetec [®]
Tween 80	Synth [®]
Cloridrato de metiltiazolotetrazólico (MTT)	Sigma-Aldrich [®]

3.5. Equipamentos e Utensílios

Os equipamentos e utensílios utilizados durante a realização dos experimentos estão relacionados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Utensílios e equipamentos utilizados nos ensaios microbiológicos e abordagem fitoquímica.

Equipamentos/ utensílios	Marca
Alças bacteriológicas plásticas descartáveis	Pleion [®]
Alças descartáveis de platina	Newprov [®]
Algodão	Cremer [®]
Agulhas descartáveis (20x5,5 mm; 10x13,5 mm)	BD [®]
Autoclave	Phoenix [®]
Balança capacidade 500 gramas	Giro`s [®]
Balança pesar animal	Digital Scale LE 2066 [®]
Balão volumétrico fundo chato 500 mL	Vidrolabor [®]
Banho-maria	Tecnal [®]
Bastão de vidro	Pyrex [®]
Bico de mamadeiras para ratos/camundongos	---
Béckers vidro 25 mL	Vidrolabor [®]
Béckers vidro 500 mL	Vidrolabor [®]
Câmara de UV	Prodicil ^{1®}
Capela de fluxo laminar	Labconco [®]
Capela de exaustão	Quimis [®]
Capilar	Perfecta [®]
Cromatofolhas de Sílicagel 60 F254	Merck [®]
Cronômetro digital	Technos [®]
Discos estéreis brancos para antibiograma	Cecon [®]
Eppendorf	---

Erlemeyer	Vidrolabor [®]
Escala de MacFarland	Probac do Brasil [®]
Estufa	Marconi ⁱ [®]
Funil de vidro	Pyrex [®]
Gaiolas polietileno	---
Geladeira	Cônsul [®]
Grades para tubos de ensaio	---
Jarra anaeróbica	Probac do Brasil [®]
Lâminas para microscopia	Formarios [®]
Mamadeira para ratos/camundongos	---
Microplaca de 96 cavidades	TPP [®]
Microscópio	Oleman [®]
Papel de filtro	Qualy [®]
Pipetas automáticas	Pipetman [®]
Pipetas de vidro	Poliglass [®]
Placas de petri pequenas e grandes	Pyrex [®]
Placa quente de areia	Quimis [®]
Ponteiras descartáveis	Plastibrand [®]
Proveta	Vidrolabor [®]
Rotaevaporador	Marconi [®]
Suporte para ponteiras	Physiocare [®]
Swabbs descartáveis estéreis	Newprov [®]
Tampas para gaiola	---
Termômetro digital	Termomed [®]
Tubos de ensaio de vidro	Pyrex, Vidrolabor [®]
Vidro borel	Vidrolabor [®]
Vortéx	Phoenix [®]

Croton urucurana

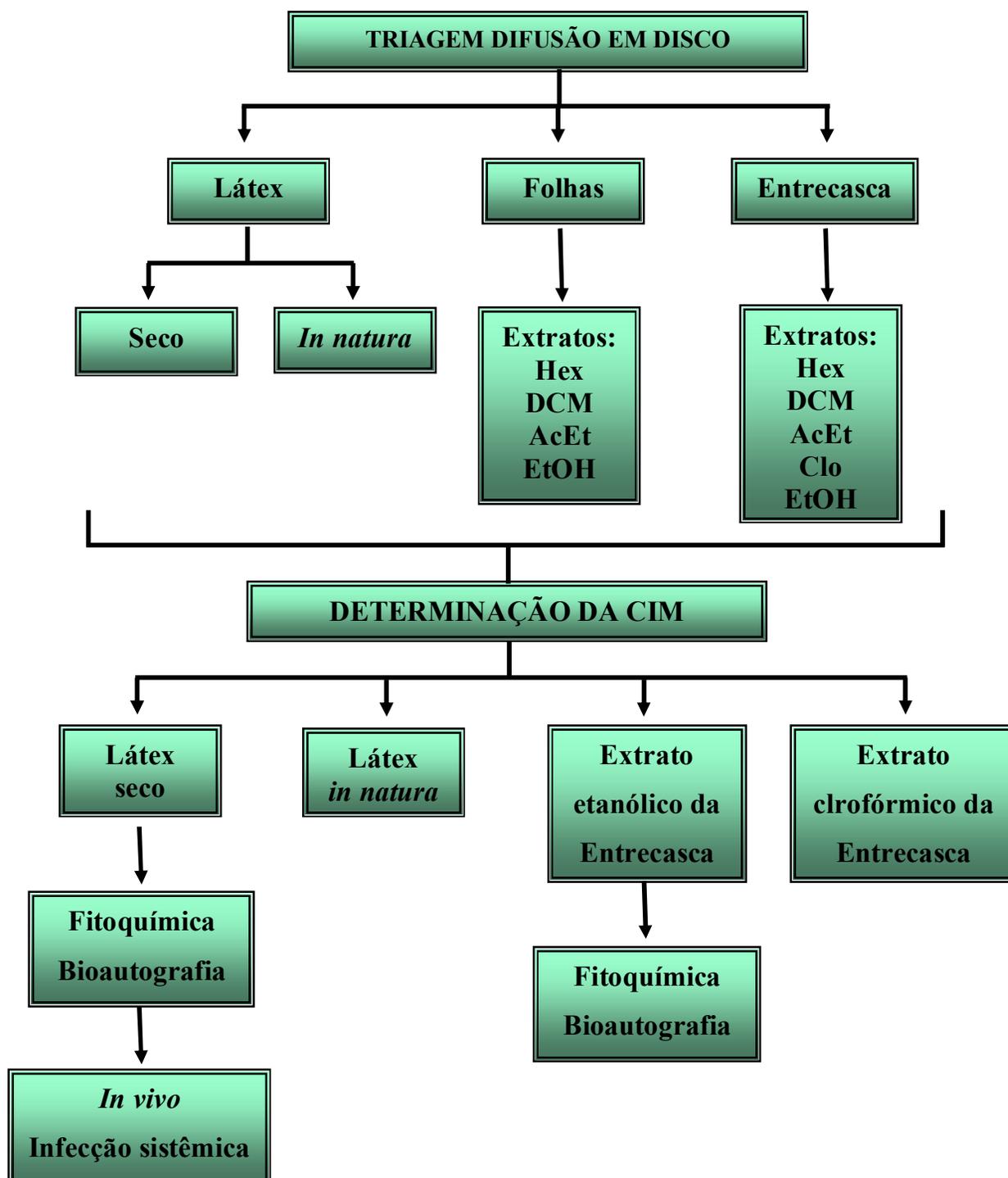


Figura 7. Fluxograma do protocolo experimental

4. MÉTODOS

4.1. Obtenção dos Extratos Brutos

Os extratos brutos da planta foram preparados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UFMT, sob a supervisão do prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins.

Os extratos brutos das folhas e entrecasca foram obtidos pelo processo de maceração seqüencial a frio, a partir do pó de cada parte da planta em solventes orgânicos, como hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e etanol 75% (1:3 p/v), de acordo com o grau de polaridade dos solventes, por sete dias a 25 °C. O clorofórmio foi utilizado apenas para a entrecasca. Os extratos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador a vácuo e o solvente residual eliminado em estufa a 45 °C, obtendo-se assim quatro extratos brutos das folhas e cinco extratos brutos da entrecasca. No momento de uso os extratos foram dissolvidos em água destilada estéril ou em Tween 80 (Synth[®]).

Parte do látex coletado e filtrado foi seco em estufa a 40^o C (150 mL) e o restante no seu estado *in natura* (30 mL). No momento de uso os látex foram dissolvidos em água destilada estéril.

4.2. Determinação do Peso Seco

Três alíquotas de 100 mg de cada extrato bruto foram acondicionados em frascos-ampola previamente tarados, secas em estufa a 60 °C e pesadas sucessivamente em balança analítica até obtenção de peso constante e as concentrações expressas em mg %, foram

obtidas pela média aritmética dos três últimos pesos. Para o látex *in natura* foram três alíquotas de 1 mL e determinou-se apenas o peso seco.

4.3. Determinação do Rendimento

A determinação do rendimento (R%) de cada extrato foi feita utilizando-se a fórmula:

$$R (\%) = \frac{\text{Peso seco (g/g)} \times \text{quantidade de extrato obtido (g)} \times 100}{\text{quantidade de pó utilizado (g)}}$$

4.4. Ensaio Microbiológicos *in vitro*

4.4.1. Ensaio de Difusão em Disco

No método de difusão, o extrato é colocado num reservatório, neste caso o disco de papel, em contato com um meio de cultura sólido inoculado com um determinado microorganismo. Após o tempo de incubação mede-se o halo de inibição, zona clara onde não houve o crescimento bacteriano, ao redor do disco onde está depositada a substância em pesquisa. Neste método a informação é apenas qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microorganismo à droga teste (Zacchino et al., 2001).

Para triagem da atividade antibacteriana de ambos os látex (*in natura* e seco) e os extratos das folhas e da entrecasca de *C. urucurana*, foi realizado o ensaio de difusão em disco em ágar Muller-Hinton (Oxoid[®]), segundo o método de Bauer et al (1966), frente a um painel de nove bactérias (5 gram-negativas e 4 gram-positivas), todas ATCC. As placas testes foram preparadas com ágar Muller Hinton e inoculadas na sua superfície com a respectiva

suspensão bacteriana, preparada em salina 0,9% estéril. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada a escala 1 de Mac Farland (1×10^7 UFC/mL). Os látex e os extratos das folhas e entrecasca foram testados em diferentes doses (62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$) utilizando-se como droga padrão, o cloranfenicol (Cecon[®], 30 $\mu\text{g}/\text{disco}$). Foram usados como controles negativos, água destilada estéril para os extratos aquosos do látex e Tween 80 em água destilada (3-5 %) para os extratos em hexano e diclorometano (folhas e entrecasca) e extrato em clorofórmio (entrecasca). Os discos de papéis estéreis (Cecon[®]) foram impregnados com o extrato teste (20 μL) nas diferentes doses e depositados sobre a superfície das placas e estas acondicionadas em geladeira por 4 horas, com a finalidade da droga teste difundir-se ao meio. Após esse período, as placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas e, logo após, procedeu-se a mensuração das zonas de inibição de crescimento bacteriano, considerando-se ativos os halos de inibição de crescimento bacteriano \geq à 10 mm (**Figura 8**). A triagem antibacteriana foi realizada em duplicata (Bauer et al., 1966; Barry et al., 1979).

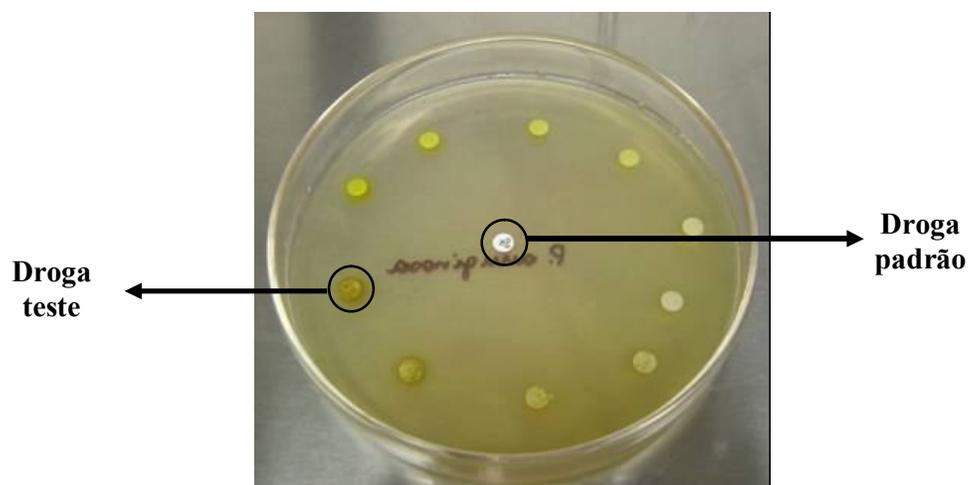


Figura 8. Triagem da atividade antibacteriana dos látex e extratos das folhas e entrecasca de *Croton urucurana* Baillon e do cloranfenicol (droga padrão) pelo ensaio de difusão em disco.

4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os métodos de diluição *in vitro* detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico (Sartori, 2005). A técnica de microdiluição consiste em dissolver a substância em um meio líquido conveniente. Possui a vantagem de ser quantitativo, ou seja, é possível a determinação da quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de um microorganismo específico. Para este ensaio foram selecionados o látex *in natura* e seco e os extratos clorofômico e etanólico 75 % da entrecasca e a concentração inibitória mínima (CIM) obtida através da metodologia de microdiluição em caldo, contra nove bactérias (5 gram-negativas e 4 gram-positivas), todas ATCC.

Para determinar os valores da CIM foram usadas microplacas de 96 cavidades. Da solução mãe (1000 µg/mL) dos látex ou de cada extrato foi feita a diluição seriada (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL) e adicionados 100 µL de cada diluição ao meio de Muller-Hinton (100 µL). Em seguida, as microplacas foram inoculadas com 100 µL de cada bactéria, ajustadas a escala 1 de MacFarland (1×10^7 UFC/mL), incubadas a 37 °C por 24 horas e realizada a leitura das microplacas. O preenchimento das microplacas de microdiluição procedeu-se da seguinte forma, na coluna 1 e linhas de A a H foram adicionados 200 µL de meio de cultura como controle de esterilidade (CE). Nas colunas de 2 a 6 e linhas de A à H foram adicionados 100 µL do meio de cultura, 100 µL da droga teste e 100 µL do inóculo bacteriano, da solução mãe foram feitas diluições seriadas na própria microplaca. E na coluna 12 adicionados 100 µL do meio de cultura e 100 µL do inóculo como controle de crescimento (CC). Para cada microplaca foi possível testar um extrato frente a 9 diferentes bactérias. Para este ensaio, também foi utilizado como droga padrão o cloranfenicol nas concentrações de 50;

25; 12,5; 6,25 e 3,1 $\mu\text{g/mL}$. A leitura das microplacas foi realizada visualmente e confirmada pela microscopia (**Figura 9**).

A CIM representa a menor concentração da droga teste capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano no meio. O critério utilizado para classificação da atividade dos extratos foi: a CIM menor que 100 $\mu\text{g/mL}$ considerado como boa atividade antimicrobiana; quando a CIM entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ foi considerado moderadamente ativo; a CIM acima de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ considerado pouco ativo e CIM maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$ inativo. Os testes foram realizados em duplicata (Holetz et al., 2002; NCCLS, Documento M7-A6, 2003; Pretto et al., 2004).

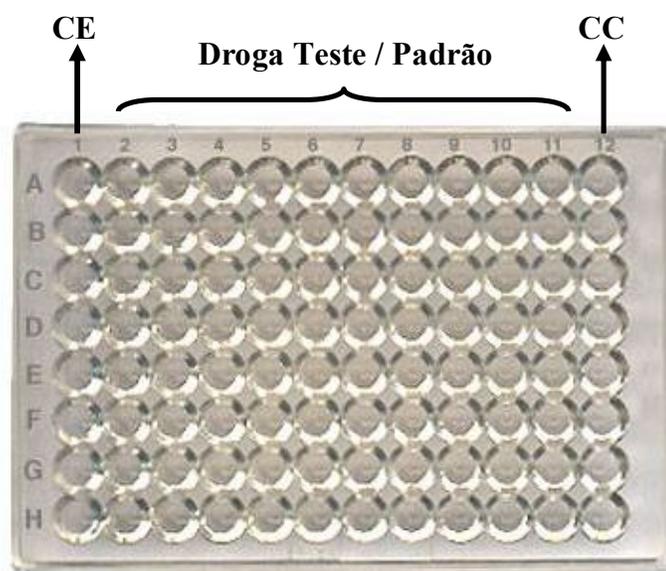


Figura 9. Preenchimento da microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos látex e extratos da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon e do cloranfenicol (droga padrão). CE: controle de esterilidade; CC: controle de crescimento.

4.5. Estudo Fitoquímico

A abordagem fitoquímica do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *C. urucurana* foram realizados para que se pudesse estabelecer uma comparação quanto os componentes presentes.

4.5.1. Abordagem Fitoquímica Preliminar

Procedeu-se a análise fitoquímica por via úmida, no estudo fitoquímico de compostos quimicamente ativos do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *C. urucurana*, realizou-se alguns testes preliminares para evidenciar classes de compostos orgânicos específicos, no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Cuiabá (UNIC) sob orientação do prof. MSc. Rogério Alexandre Nunes dos Santos, segundo a metodologia adotada por Matos (1997) e Costa (1982). Foram realizados os seguintes testes, para:

✓ **Heterosídeos cianogénico:** caracterizado pela presença da cor vermelho-castanha no papel de picrato.

✓ **Fenóis e taninos:** a solução alcoólica quando em contato com FeCl_3 , os fenóis são caracterizados pela cor entre o azul e o vermelho e os taninos pirrogálicos (ou hidrolizáveis) por precipitado azul escuro e o precipitado verde que indica a presença de taninos condensados ou catéquicos.

✓ **Antocianinas, antocinidinas e flavonóides:** a acidificação da solução alcoólica à pH 3 e o aparecimento de cor vermelha indica a presença de antocianidinas, antocianinas, chalconas e auronas; quando alcalinizado a cor lilás indica a presença de antocianidinas e antocianinas e a pH 11 o surgimento da cor azul-púrpura indica antocianidinas e antocianinas,

a cor amarela as flavonas, flavonóis e xantonas a cor vermelho-púrpura chalconas e auronas e vermelho-laranja indica presença de flavonóis.

✓ **Leucoantocianidina, catequinas e flavonas:** a acidificação do meio à pH 1-3 com o surgimento da cor vermelha caracteriza leucoantocianidinas e a cor pardo-amarelada para catequinas e em meio alcalino em pH 11 com o surgimento da coloração vermelho-laranja indica a presença de flavonas.

✓ **Catequinas:** a solução metanólica do extrato após tratamento com vanilina 1 % e HCl concentrado e o surgimento da cor vermelha intensa indica a presença de catequinas.

✓ **Esteróides e triterpenóides:** esteróides caracterizados por uma coloração azul esverdeada e triterpenos por uma cor vermelha quando uma solução clorofórmica do extrato é tratada com anidro acético e gotas de ácido sulfúrico.

✓ **Flavonas e isoflavonas:** a dissolução dos extratos em álcool e adição de 1 gota de FeCl_3 à 4,5 % e o surgimento de coloração verde musgo indica a presença de flavonas e isoflavonas.

✓ **Saponinas:** produção de espuma abundante e persistente por agitação da solução aquosa.

✓ **Resinas:** resíduo da solução etanólica quando adicionado água e agitado, a presença de precipitado floculoso que se aglomera por agitação ou aquecimento caracteriza a presença de resinas.

✓ **Alcalóides:** caracterizados pela formação de precipitado floculoso em contato com o reagente de Dragendorff (iodo bismutato de potássio).

✓ **Cumarinas:** a presença de fluorescência em manchas feitas em papel de filtro da solução alcalinizada indica presença de cumarinas.

✓ **Quinonas:** coloração vermelha na fase aquosa quando a solução etérea é agitada com NH_4OH 6N.

4.5.2. Estudo Analítico - Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia é um método moderno e útil de análise que permite efetuar separação, identificação e quantificação das espécies químicas por si mesmas ou em conjunto a outras formas instrumentais de análise, que também permite um isolamento bioguiado de compostos ativos (Souza et al., 2004). A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (Collins, Braga & Bonato, 1997).

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 fluído elui através dela, chamada fase móvel. Utiliza-se para fase móvel solventes com polaridades crescentes (Cechinel Filho et al., 2001).

Para a realização da cromatografia em camada delgada foram utilizadas cromatoplasmas em alumínio sílicagel 60 F₂₅₄ (Merck®). Os compostos testes, látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca, foram dissolvidos em água destilada em concentração equivalente a 1000 µg/mL. As soluções testes foram aplicadas na placa de (CCD) com auxílio de uma micropipeta (20 µL) e em seguida submetidas à eluição em sistema de solvente apropriado, metanol/acetona (86:14 v/v).

Após a eluição, procedeu-se a revelação utilizando um revelador clássico, o iodo ressublimado, após observação sob luz U.V. em comprimento de onda 254 nm e 266 nm. As cromatoplasmas foram submetidas ao ensaio de bioautografia. Neste experimento foi utilizado como droga padrão o cloranfenicol (50 µg/mL), sendo a CCD desenvolvida com sistema eluente, clorofórmio/etanol (93:7 v/v) (Souza et al., 2004; Collins, Braga & Bonato, 1997; Cechinel Filho, 2001).

4.6. Bioautografia

A bioautografia é um método qualitativo útil para a localização de compostos com ação antimicrobiana em um cromatograma, de um extrato ou fração complexa de produtos naturais. Permite o isolamento bioguiado de compostos ativos. A técnica bioautográfica pode ser denominada bioautografia por imersão, onde um meio de cultura sólido fundido inoculado é aplicado sobre a placa cromatográfica na qual foi eluído o extrato ou fração. Durante a incubação das placas, os compostos deverão passar para o meio por um processo de difusão, formando zonas de inibição do crescimento bacteriano.

A atividade antibacteriana do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca e cloranfenicol (droga padrão) foram avaliadas pelo método bioautográfico. Para a realização da bioautografia utilizou como meio de cultura o ágar Muller-Hinton, sendo este inoculado com a bactéria teste, o qual foi aplicado sobre a cromatoplaça e desenvolvido com uma fase móvel adequada para a separação dos seus componentes, como descrito no item anterior. A suspensão bacteriana foi preparada em salina estéril ajustando a escala 1 de MacFarland (1x10 UFC/mL) e 200 µL do inóculo foi transferido para um recipiente contendo caldo Muller-Hinton (2 mL), em seguida 1 mL do preparado foi transferido para um balão volumétrico contendo 10 mL de agar Muller Hinton. O ágar foi mantido sob o estado líquido em banho-maria a 45 °C para proceder à inoculação bacteriana e homogeneizado. Em seguida, o ágar foi distribuído sobre as cromatoplaças acondicionadas em câmara úmida (conjunto de placa de petri estéreis e algodão umedecido com água destilada estéril).

Após a solidificação do ágar, as cromatoplaças foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Decorrido esse período procedeu-se a leitura. A inibição do crescimento bacteriano foi indicada pela zona clara no cromatograma, sobre as bandas formadas. Como um dos possíveis inconvenientes desta técnica é a dificuldade na visualização do halo de inibição por contraste,

usam-se reveladores como auxiliares na leitura dos resultados obtidos. Desta forma foi usado para a leitura da droga teste, quando necessário, o corante vital cloridrato de metiltiazolotetrazólico (MTT: 1 mg/mL). Sendo o corante aspergido sobre a superfície das placas bioautográficas e em seguida incubadas à 37 °C por mais 30 minutos e em seguida procedendo a leitura (**Figura 10**). Os resultados foram indicados como positivos ou negativos de acordo com a cor desenvolvida pelo corante. Resultado positivo (inibição de crescimento da bactéria) foi apresentado pela formação de halo claro de cor amarelo-acastanhada, o qual indica que o extrato inibiu o crescimento bacteriano, pois houve redução do corante (MTT). A observação da coloração azul-violeta à roxo indica ausência da inibição do crescimento bacteriano, ou seja, presença do metabolismo bacteriano (Rahalison et al., 1994; Saxena et al., 1995). As placas bioautográficas do cloranfenicol foram reveladas com a eosina (2 mg/mL), observando uma coloração amarelo a laranja e halo claro indicando inibição do crescimento bacteriano (Souza et al., 2004).

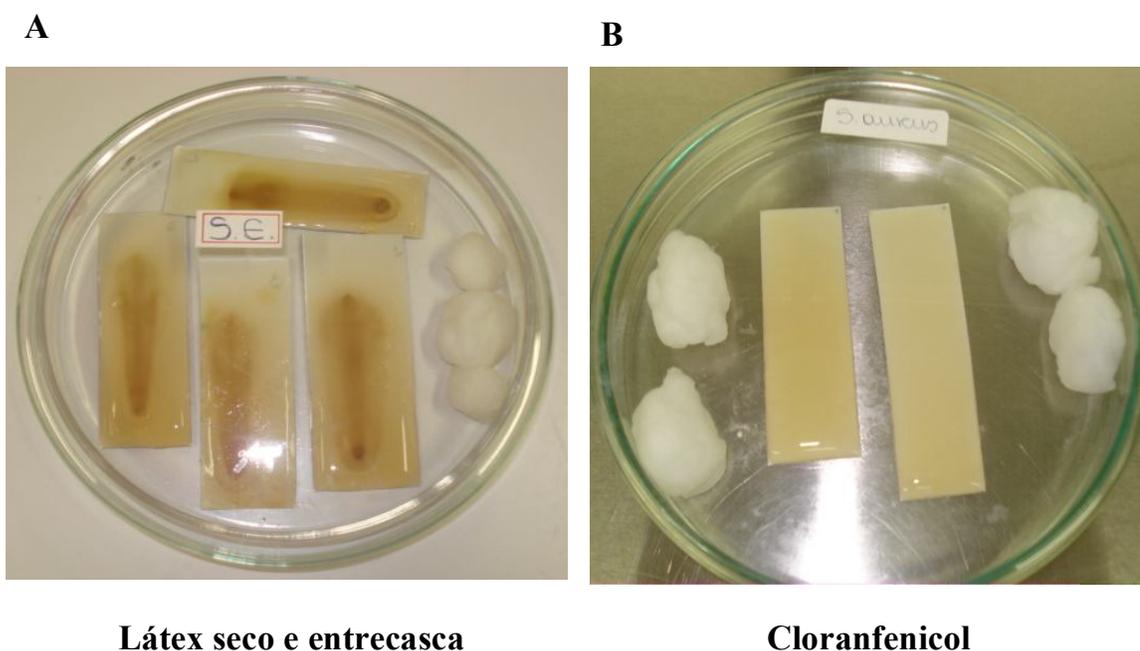


Figura 10. Placas bioautográficas do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon (A) e do cloranfenicol (B), droga padrão, em câmara úmida.

4.7. Infecção Sistêmica em Camundongos

Para a indução da infecção sistêmica foram usadas duas cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva) e *Klebsiella pneumoniae* (bactéria gram-negativa). Foram separados 10 grupos de 10 animais cada, utilizando como animais testes camundongos *Swiss* albinos machos, pesando entre 25-30 gramas. O grupo controle recebeu água destilada (veículo) via oral e o grupo padrão recebeu meropenem (Biochimico[®]) 20 mg/kg, via subcutânea como tratamento. Nos grupos testes, diferentes doses do látex seco foram testadas, 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 300; 500 e 1000 mg/kg via oral. As cepas bacterianas foram repicadas 24 horas antecedentes ao experimento em agar Nutritivo (Biobrás[®]).

O inóculo bacteriano da *S. aureus* foi ajustado à escala 6 (21×10^8 UFC/mL) e da *K. pneumoniae* à escala 3 (9×10^8 UFC/mL) de MacFarland, sendo estas as concentrações bacterianas capazes de induzir a infecção sistêmica nos animais. A infecção bacteriana foi induzida pela administração intraperitoneal (0,2 mL) da suspensão bacteriana em caldo BHI (Biobrás[®]). Os tratamentos dos animais foram feitos imediatamente e 4 horas após a inoculação dos animais. Os animais foram observados por 7 dias, verificando a porcentagem de mortalidade dos animais. Foi determinado a dose efetiva mediana 50% (DE₅₀), segundo o método de probitos e regressão linear para a razão de sobrevivência após os 7 dias de observação dos animais (Yamaguchi et al., 1998; Koga et al., 2005).

4.8. Análise dos Dados

Os valores experimentais obtidos no modelo de infecção sistêmica em camundongos foram expressos como média \pm desvio padrão da média (D.P.M.) segundo o método de probitos e regressão linear.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação do Peso Seco e Rendimento do Látex, dos Extratos das Folhas e dos Extratos da Entrecasca de *Croton urucurana*

Na **Tabela 5** são mostrados os pesos secos e rendimento do látex *in natura* e seco e dos extratos brutos das folhas e da entrecasca de *Croton urucurana*. Os pesos secos variaram entre 76,76 a 335 % com rendimento entre 0,32 a 33,07 %.

Tabela 5. Pesos secos e rendimento dos látex, extratos das folhas e entrecasca de *Croton urucurana* Baillon.

Espécie	Parte da planta	Extrato	Rendimento (%)	Peso seco (mg %)
<i>Croton urucurana</i>	Látex <i>in natura</i>	--	--	335
	Látex seco	--	33,07	91,86
	Folhas	Hexano	1,3	96,1
		Diclorometano	0,90	98,6
		Acetato de etila	0,32	86,66
		Etanol 75%	1,36	76,76
		Entrecasca	Hexano	0,56
	Entrecasca	Diclorometano	0,50	97,76
		Clorofórmio	1,3	96,21
		Acetato de etila*	--	--
Etanol 75%		11,7	94,73	

* não foi possível determinar o peso seco e rendimento devido à quantidade obtida do extrato ter sido mínima.

5.2. Ensaio de Difusão em Disco

Os resultados do ensaio de difusão em disco estão apresentados nas **Tabelas 6, 7 e 8**. O látex seco nas doses de 62,5 a 1000 µg/disco e o látex *in natura* nas doses de 250 a 1000 µg/disco exibiram zona de inibição que variou entre 10 a 18 mm, exceto para *E. coli*, para a qual ambos os extratos foram inativos (**Tabela 6**).

O extrato hexânico das folhas mostrou-se ativo para *S. pyogenes*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* formando zona de inibição de 10 à 13 mm nas doses de 500 a 1000 µg/disco, enquanto que o extrato diclorometano foi ativo apenas para *S. pyogenes* com halos de 10 à 12 mm nas mesmas doses testadas. O extrato etanólico 75% apresentou atividade para *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium* nas doses de 500 e 1000 µg/disco formando halos de 10 a 12 mm. O extrato acetato de etila foi inativo (**Tabela 7**).

Os extratos hexânico e diclorometano da entrecasca mostraram atividade contra as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* nas doses de 250 a 1000 µg/disco produzindo halos de inibição de 10 à 17 mm, enquanto o extrato clorofórmico só não foi ativo para *S. flexneri* e *S. typhimurium*, exibindo zona de inibição de crescimento de 10 a 18 mm nas doses de 250 a 1000 µg/disco. O extrato em acetato de etila teve atividade para *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* nas doses de 250 a 1000 µg/disco com halos de inibição de 10 a 20 mm. O extrato etanólico 75% apresentou atividade para *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* e *E. coli* nas doses de 250 a 1000 µg/disco formando zona de inibição de 10 a 18 mm (**Tabela 8**). O cloranfenicol (30 µg/disco), droga padrão utilizada como controle positivo, exibiu larga zona de inibição de crescimento (25 - 33 mm).

TABELA 6. Triagem da atividade antibacteriana dos látex *in natura* e seco de *Croton urucurana* Baillon pelo método de difusão em disco.

<i>Croton urucurana</i>	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Dose (µg/disco)	Bactérias								
		<i>Ef</i>	<i>Sa</i>	<i>Se</i>	<i>Sp</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Sf</i>
Látex <i>in natura</i>	1000	12 ^a	14	14	14	-- ^b	18	18	12	14
	500	10	12	12	12	--	14	14	10	12
	250	--	10	10	10	--	12	12	8	10
	125	--	-	-	--	--	--	8	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Látex seco	1000	10	12	12	14	--	18	18	12	12
	500	--	8	10	12	--	10	15	10	10
	250	--	--	8	10	--	8	13	8	--
	125	--	--	--	--	--	--	12	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	10	--	--
Cloranfenicol	30	30	30	30	30	28	25	25	33	30

Legenda: *Ef* = *Enterococcus faecalis*; *Sa* = *Staphylococcus aureus*; *Se* = *Staphylococcus epidermidis*; *Sp* = *Streptococcus pyogenes*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*; *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Sf* = *Shigella flexneri*; a = zona de inibição do crescimento bacteriano em mm; b = ausência de inibição do crescimento bacteriano.

TABELA 7. Triagem da atividade antibacteriana dos extratos das folhas de *Croton urucurana* Baillon pelo método de difusão em disco.

<i>Croton urucurana</i>	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Dose (µg/disco)	Bactérias								
		<i>Ef</i>	<i>Sa</i>	<i>Se</i>	<i>Sp</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Sf</i>
EH	1000	-- ^b	--	--	10 ^a	--	12	13	10	--
	500	--	--	--	--	--	10	10	--	--
	250	--	--	--	--	--	8	8	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EDCM	1000	--	--	--	12	--	--	--	--	--
	500	--	--	--	10	--	--	--	--	--
	250	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EA	1000	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	500	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	250	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EE	1000	--	10	10	10	--	--	--	12	--
	500	--	8	--	--	--	--	--	10	--
	250	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Cloranfenicol	30	30	30	30	30	28	25	25	33	30

EH = extrato hexano; EDCM = extrato diclorometano; EA = extrato acetato de etila; EE = extrato etanólico 75%; *Ef* = *Enterococcus faecalis*; *Sa* = *Staphylococcus aureus*; *Se* = *Staphylococcus epidermidis*; *Sp* = *Streptococcus pyogenes*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*; *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Sf* = *Shigella flexneri*; a=zona de inibição do crescimento bacteriano em mm; b = ausência de inibição do crescimento bacteriano.

TABELA 8. Triagem da atividade antibacteriana dos extratos da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon pelo método de difusão em disco.

<i>Croton urucurana</i>	Diâmetro dos halos de inibição (mm)									
	Dose (µg/disco)	Bactérias								
		<i>Ef</i>	<i>Sa</i>	<i>Se</i>	<i>Sp</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Sf</i>
EH	1000	-- ^b	12 ^a	10	--	--	--	17	--	--
	500	--	8	8	--	--	--	14	--	--
	250	--	--	--	--	--	--	12	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EDCM	1000	--	12	10	--	--	--	13	--	--
	500	--	8	--	--	--	--	10	--	--
	250	--	--	--	--	--	--	8	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EC	1000	14	14	12	18	12	14	15	--	--
	500	12	12	8	15	8	12	12	--	--
	250	--	10	--	12	--	10	10	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	8	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EA	1000	--	8	10	8	--	20	--	--	--
	500	--	--	--	--	--	16	--	--	--
	250	--	--	--	--	--	12	--	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
EE	1000	12	12	--	18	12	--	15	10	--
	500	10	--	--	14	8	--	13	--	--
	250	--	--	--	12	--	--	10	--	--
	125	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	62,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Cloranfenicol	30	30	30	30	30	28	25	25	33	30

EH = extrato hexano; EDCM = extrato diclorometano; EC = extrato clorofórmico; EA = extrato em acetato de etila; EE = extrato etanólico 75%; *Ef* = *Enterococcus faecalis*; *Sa* = *Staphylococcus aureus*; *Se* = *Staphylococcus epidermidis*; *Sp* = *Streptococcus pyogenes*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*; *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Sf* = *Shigella flexneri*; a = zona de inibição do crescimento bacteriano em mm; b = ausência de inibição do crescimento bacteriano.

5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este ensaio avaliou a capacidade das drogas testes em inibir o desenvolvimento microbiano *in vitro* (**Figura 11**). Na **Tabela 9** são apresentados os resultados da determinação da atividade antibacteriana do látex *in natura*, látex seco, extrato clorofórmico e etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* e do cloranfenicol usado como droga padrão neste ensaio antimicrobiano, contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A partir dos resultados apresentados pelo látex *in natura*, este mostrou atividade antibacteriana moderada para *P. aeruginosa* (CIM= 125 µg/mL) e para as demais bactérias testadas (CIM=250 µg/mL). O látex seco também apresentou atividade moderada para *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* com a CIM=125 µg/mL, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *S. flexneri* (CIM=250 µg/mL) e também para *S. pyogenes* (CIM=500 µg/mL).

Para os resultados apresentados pelos extratos da entrecasca, o clorofórmico apresentou atividade moderada para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri* (CIM=250 µg/mL) e também para *E. faecalis* e *S. pyogenes* (CIM=500 µg/mL). Apresentou fraca atividade frente a *S. aureus* e *S. epidermidis* (CIM=1000 µg/mL). Enquanto o extrato etanólico 75 % apresentou atividade moderada para *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* (CIM=250 µg/mL) e para *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae* e *S. flexneri* (500 µg/mL).

O cloranfenicol apresentou boa atividade para todas as bactérias testadas com a CIM variando entre 25 e < que 3,1 µg/mL. A partir dos resultados apresentados, tanto o látex *in natura* e seco como os extratos clorofórmico e etanólico 75% da entrecasca apresentaram atividade antibacteriana neste modelo experimental.

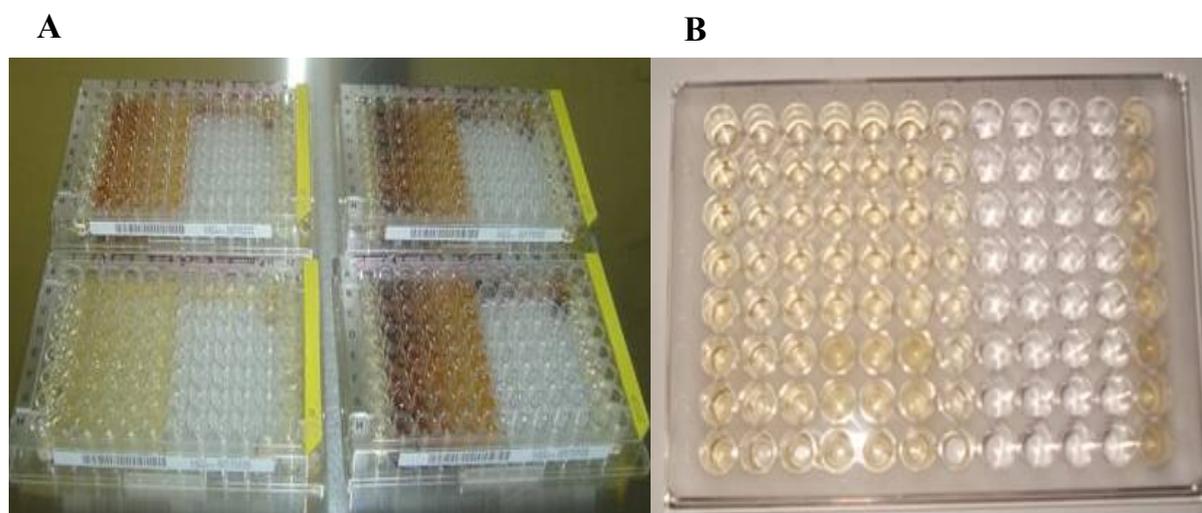


Figura 11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos látex e extratos da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon (A) e do Cloranfenicol (B), droga padrão, pelo método de diluição em microplaca.

Tabela 9. Atividade antibacteriana dos látex *in natura* e seco e dos extratos etanólico 75 % e clorofórmico da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon no ensaio de microdiluição em caldo.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				Cloranfenicol
	Látex		Extratos		
	<i>In natura</i>	Seco	Etanólico	Clorofórmico	
<i>E. faecalis</i>	250	125	500	500	< 3,1
<i>S. aureus</i>	250	250	500	1000	< 3,1
<i>S. epidermidis</i>	250	250	250	1000	< 3,1
<i>S. pyogenes</i>	250	500	500	500	25
<i>E. coli</i>	250	125	250	250	3,1
<i>K. pneumoniae</i>	250	250	500	250	< 3,1
<i>P. aeruginosa</i>	125	125	250	250	50
<i>S. typhimurium</i>	250	250	250	250	< 3,1
<i>S. flexneri</i>	250	250	500	250	25

^aCIM = Concentração Inibitória Mínima

5.4. Estudo Fitoquímico

5.4.1. Abordagem Fitoquímica Preliminar

A análise fitoquímica realizada com látex seco e extrato etanólico 75 %, revelou a presença de alcalóides, antocianidinas, antocianinas, catequinas, esteróides, fenóis hidrolisáveis, flavonas, isoflavonas, quinonas e saponinas (**Tabela 10**).

Tabela 10. Análise fitoquímica preliminar do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon.

Grupos de metabólitos secundários	Resultados
Alcalóides	Positivo ++
Antocianidinas	Positivo +
Antocianinas	Positivo +
Catequinas	Positivo ++
Cumarinas	Negativo
Esteróides	Positivo ++
Fenóis hidrolizáveis	Positivo ++
Flavonas	Positivo ++
Flavonanóis	Negativo
Flavononas	Negativo
Heterosídeos cianogénicos	Negativo
Isoflavonas	Positivo ++
Leucoantocianidinas	Negativo
Quinonas	Positivo ++
Resinas	Negativo
Saponinas	Positivo +++
Taninos	Negativo
Triterpenóides	Negativo
Xantonas	Negativo

+++ intensa; ++ moderada; + fraca

5.4.2. Estudo Analítico - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatoplaça desenvolvida do látex com metanol/acetona (86:14 v/v) apresentaram a separação de duas bandas para o látex seco com Rfs (fator de retenção) de 0,53 e 0,78. Enquanto nas cromatoplaças do extrato etanólico 75% da entrecasca usando o mesmo sistema eluente apresentou a separação de três bandas com Rfs de 0,08; 0,65 e 0,81 (**Figura 12**). De acordo com os resultados obtidos referentes às bandas separadas em conjunto aos valores de Rf indicam que o látex e o extrato etanólico apresentam compostos de natureza e polaridades diferentes (**Tabela 11**).

Tabela 11. Valores dos fatores de retenção do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon.

<i>Croton urucurana</i>		Valores de Rf's	
Látex seco	--	0,53	0,78
Extrato etanólico	0,08	0,65	0,81

Rf: Fator de retenção

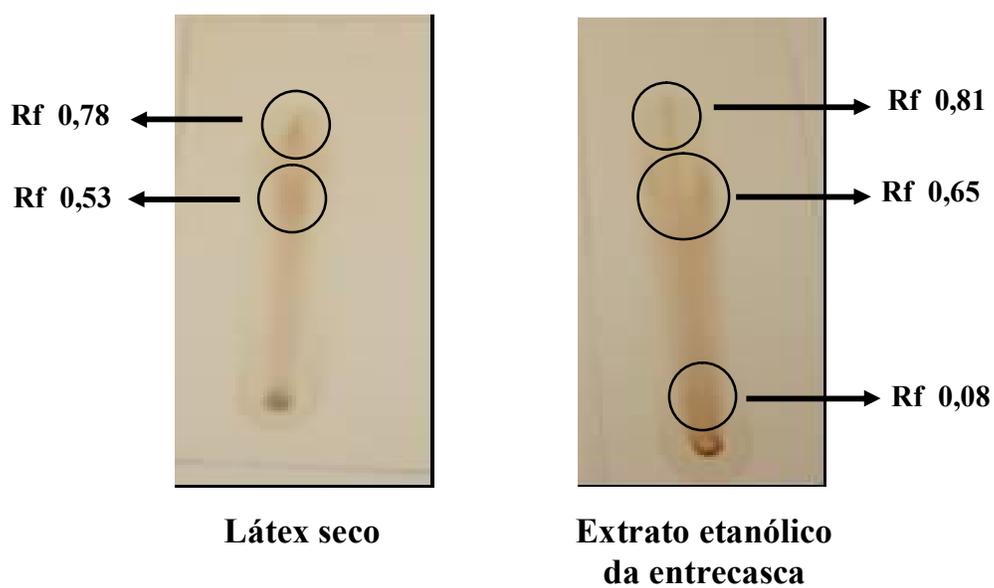


Figura 12. Perfil cromatográfico do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon. Rf: fator de retenção.

5.5. Bioautografia

A CCD do látex seco apresentou a separação de duas bandas com Rfs 0,53 e 0,78 (**Figura 13**). A banda com Rf 0,53 mostrou atividade frente às bactérias *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. Enquanto a banda com o Rf 0,78 foi ativo para *E. coli*, *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. A cromatoplaça desenvolvida do extrato etanólico 75 % da entrecasca apresentou a separação de três bandas (**Figura 13**). A banda com Rf 0,08 apresentou atividade para as bactérias *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*. Já a banda com Rf 0,65 foi ativa para *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *S. aureus*. Enquanto a banda com Rf 0,81 ativa frente a *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. A bactéria *P. aeruginosa* apresentou resistência bactéria as drogas testes. Quanto a *S. pyogenes* não foi possível avaliar, pois se trata de uma bactéria fastidiosa, a qual não apresentou crescimento bacteriano. Para este bioensaio utilizou-se o cloranfenicol como droga padrão, o qual mostrou atividade frente às bactérias testadas. Os halos apresentados tanto pelas drogas testes quanto pelo cloranfenicol foram de tamanhos variados (**Tabela 12**).

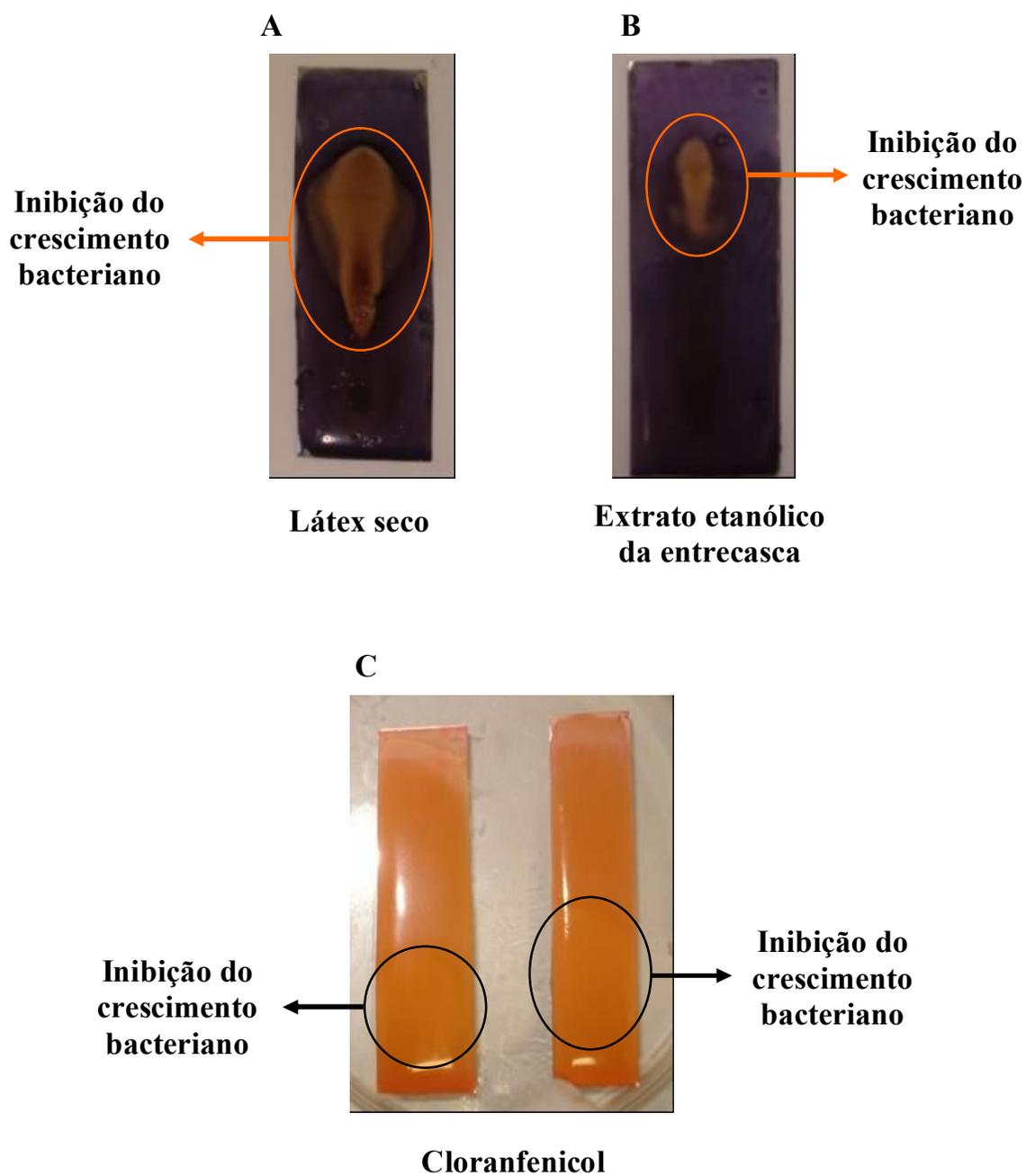


Figura 13. Atividade antibacteriana do látex seco (A), extrato etanólico 75 % da entrecasca (B) de *Croton urucurana* Baillon e cloranfenicol, droga padrão (C) pelo método de bioautografia.

Tabela 12. Atividade antibacteriana *in vitro* do látex seco e extrato etanólico 75 % da entrecasca de *Croton urucurana* Baillon pelo método de bioautografia.

<i>C. urucurana</i>	Rf's	Bactérias								
		<i>Ef</i>	<i>Sa</i>	<i>Se</i>	<i>Sp</i>	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Sf</i>
Látex seco	0,53	-	+	+	--	-	+	-	+	+
	0,78	+	+	+	--	+	-	-	+	+
Extrato etanólico da entrecasca	0,08	-	-	-	--	-	+	-	+	+
	0,65	-	+	-	--	-	-	-	+	+
	0,81	+	+	+	--	-	-	-	+	-
Cloranfenicol	--	+	+	+	--	+	+	+	+	+

Rf = fator de retenção; *Ef* = *Enterococcus faecalis*; *Sa* = *Staphylococcus aureus*; *Se* = *Staphylococcus epidermidis*; *Sp* = *Streptococcus pyogenes*; *Ec* = *Escherichia coli*; *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*; *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *St* = *Salmonella typhimurium*; *Sf* = *Shigella flexneri*.

5.6. Infecção Sistêmica em Camundongos

A eficácia do látex seco na proteção dos animais quanto à morte causada pela infecção bacteriana induzida pelas bactérias gram-positiva e gram-negativa é mostrada na **Tabela 13**. Nas doses de 0,01 e 0,1 mg/kg para infecção causada pelo *S. aureus*, o látex seco não apresentou eficácia na prevenção da morte dos animais. As doses de 1,0 – 10,0 e 100,0 mg/kg preveniram a morte dos animais em 10 – 20 e 30 %, respectivamente. A proteção de 50% dos animais se deu na dose de 300 mg/kg. As doses de 500 e 1000 mg/kg protegeram 60 e 70 % dos animais da morte, respectivamente. A dose mediana efetiva (DE₅₀) apresentada pelo látex seco foi de 358 ± 131 mg/kg. Meroponem, droga padrão (20 mg/kg) protegeu 100 % dos animais.

Na infecção sistêmica induzida pela *K. pneumoniae* os resultados apresentados foram os seguintes. Nas menores doses, 0,01 e 0,1 mg/kg não foi observada atividade antibacteriana, ou seja, não apresentou atividade profilática em relação à morte causada pela infecção. Já nas doses de 1,0 – 10,0 e 100,0 mg/kg o látex seco conseguiu prevenir a morte dos animais em 20 – 30 e 40 %, respectivamente. Com a dose de 300 mg/kg houve proteção de 50 % dos animais. Nas doses de 500 e 1000 mg/kg a eficácia apresentada foi à mesma, conseguindo a prevenção da morte em 60 % dos animais. A DE₅₀ apresentada pelo látex seco para *K. pneumoniae* foi de 347 ± 127 mg/kg. A droga padrão mostrou total eficácia profilática para os animais infectados tanto pela *S. aureus* quanto pela *K. pneumoniae*, apresentando a DE₅₀ de 7,1 ± 0,7 e 5,2 ± 1,1 mg/kg, respectivamente.

Tabela 13. Atividade antibacteriana *in vivo* do látex seco de *Croton urucurana* Baillon no modelo de infecção sistêmica em camundongos induzido pela *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

<i>Croton urucurana</i>	Doses (mg/kg v.o.)	Sobrevida (%)		DE ₅₀ ± D.P.M. (mg/kg)	
		<i>Sa</i>	<i>Kp</i>	<i>Sa</i>	<i>Kp</i>
Látex seco	0,01	0,4	0,4		
	0,1	0,4	0,4		
	1	10	20		
	10	20	30		
	100	20	40		
	300	50	50	358,8 ± 131	347 ± 127
	500	60	60		
1000	70	60			
Meropenem	20	100	100	7,3 ± 0,7	5,2 ± 1,1

DE₅₀ = dose mediana efetiva 50 %; D.P.M. = desvio padrão da média.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se observado o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, tornando-se necessário que novas drogas com propriedades antibióticas sejam desenvolvidas com o objetivo de reverter esta situação. Dentre as alternativas para o desenvolvimento de novos antibióticos, os derivados das plantas medicinais, são as melhores escolhas. Há muito tempo, elas tem sido base para diversas aplicações na medicina popular e atualmente com o ressurgimento do interesse nas terapias naturais e o crescimento do consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem mais dados sobre os extratos de plantas (Nascimento et al., 2007).

Devido aos poucos trabalhos realizados quanto à avaliação antibacteriana de *Croton urucurana* Baillon, os quais trazem poucas informações, e de acordo com seu uso popular em ferimentos e infecções, esta planta foi selecionada como objeto de estudo deste trabalho.

Os ensaios usados para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* muitas metodologias tem sido proposta. Os métodos comumente usados são os de difusão em disco e em ágar, diluição em ágar e em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores variáveis entre os testes, como o crescimento microbiano, microorganismos testados, exposição do microorganismo ao extrato teste, a sua solubilidade, a concentração testada e o agente solubilizante (Nascimento et al., 2007; Ríos & Recio, 2005; Cos et al., 2006; Arikian et al., 2002).

Neste trabalho, foi inicialmente realizada uma triagem da atividade antibacteriana de *C. urucurana* pelo método de difusão em disco, sendo avaliadas o látex *in natura* e seco e os extratos obtidos das folhas e entrecasca desta planta. Neste ensaio antimicrobiano os látex

apresentaram espectro de ação semelhante, mas com potência para a *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Para os extratos obtidos das folhas, o extrato hexano apresentou maior espectro de ação para as bactérias gram-negativas e potente ação contra *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, formando zonas de inibição de 10-13 mm (500 e 1000 µg/disco), enquanto que o extrato diclorometano foi ativo apenas para *S. pyogenes* com halos de 10-12 mm nas mesmas doses. Já o extrato etanólico 75% apresentou maior espectro de ação para bactérias gram-positivas e potente ação contra *S. typhimurium* (500 e 1000 µg/disco) com halos de 10-12 mm. Para os extratos obtidos da entrecasca, os preparados em hexano e diclorometano da entrecasca, apresentaram pequeno espectro de ação, porém com potente ação contra *P. aeruginosa* (500 e 1000 µg/disco). O extrato clorofórmico apresentou amplo espectro de ação, sendo o mais potente dos extratos contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, não sendo ativo apenas para *S. flexneri* e *S. typhimurium*. O extrato acetato de etila apresentou pequeno espectro de ação, sendo ativo apenas para *K. pneumoniae* e *S. epidermidis* (10-20 mm). O extrato etanólico 75% mostrou amplo espectro de ação e potente ação antibacteriana contra *E. faecalis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*.

O látex seco e *in natura* apresentaram atividade antibacteriana semelhantes, com espectro de ação e potência maiores que a atividade apresentada pelos extratos obtidos das folhas e entrecasca.

No entanto, em estudos realizados por Gurgel (2005), o látex de *Croton urucurana* não apresentou atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco frente à bactéria *S. aureus*, pois no presente trabalho obtivemos resultados positivos frente à mesma bactéria. Em contrapartida, quando avaliada a atividade antifúngica pelo mesmo método, o látex apresentou atividade frente aos dermatófitos *Trichophyton tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* (Gurgel, 2005; Gurgel et al., 2005). Como foi mostrado os resultados apresentados neste trabalho divergem dos resultados obtidos por

Gurgel (2005) frente à bactéria *S. aureus*, isto pode ser explicado por fatores relacionados ao material botânico, possivelmente a coleta do material tenha sido de local e em época diferente, em estágios de desenvolvimento diferente, devendo considerar o estado de conservação do habitat, fatores estes que interferem no teor dos fitoconstituíntes presentes no látex (Mattos, 2001) e considerando também que as linhagens de microorganismos testados não foram as mesmas.

A sonderianina isolada da entrecasca de *C. urucurana* apresentou atividade contra *E. coli*, resultado este que mostra conformidade com os resultados obtidos pelos extratos clorofórmico e etanólico 75% da entrecasca (Craveiro et al., 1982).

No ensaio de difusão em disco, os resultados apresentados pelo látex seco e *in natura* indicam que os compostos polares presentes nos látex sejam os responsáveis pela atividade antibacteriana. Com base nos resultados apresentados pelos extratos preparados a partir das folhas, sugere-se que os princípios ativos presentes nas folhas tenham baixa polaridade e possivelmente não se tratam de flavonóides. Já no caso dos resultados com os extratos da entrecasca, os preparados com solventes de baixa polaridade (clorofórmio) quanto de alta polaridade (etanol 75%) apresentaram atividade antibacteriana significativa. Sendo estes solventes bons extratores de substâncias ativas como flavonóides, alcalóides e terpenos (Cowan, 1999).

Na avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco ocorreu variação da zona de inibição formada, pois o tamanho da zona de inibição de crescimento é influenciado pela velocidade de difusão das substâncias no ágar (Virtuoso et al., 2005); tendo os extratos apolares maiores dificuldades de difusão no ágar. Podendo explicar, em parte, a menor atividade verificada para os extratos em hexano e diclorometano comparada com os látex e extratos polares.

Geralmente, a atividade antimicrobiana de produtos naturais, é estudada, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos *in vitro* em testes de susceptibilidade ou sensibilidade, como foi realizado neste presente trabalho (Souza et al., 2003). Neste estudo os extratos do látex seco e *in natura* e os extratos clorofórmico e etanólico 75% da entrecasca apresentaram melhor atividade no ensaio de difusão em disco, e por isso selecionados para determinação da CIM.

Os látex (seco e *in natura*) e extratos não apresentaram diferenças quanto ao espectro de ação, porém o látex seco mostrou maior potência antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (CIM=125 µg/mL). Os extratos etanólico 75% e clorofórmico da entrecasca apresentaram atividade moderada, sendo que o clorofórmico apresentou fraca atividade para *S.aureus* e *S. epidermidis* (CIM=1000 µg/mL). Esses extratos da entrecasca apresentaram maior potência para as bactérias gram-negativas.

Em estudos anteriormente realizados com o látex de *C. urucurana*, este também apresentou atividade antifúngica avaliado pelo método de macrodiluição em caldo (CIM) contra os dermatófitos *Trichophyton tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. Sendo os mesmos testados pelo método de difusão em disco, neste caso, mostrando uma correlação positiva entre os dois métodos avaliados (Gurgel, 2005; Gurgel et al., 2005).

Os resultados obtidos pelos extratos da entrecasca estão de acordo com os de Peres et al (1997), quando determinado a CIM, onde foi testado os isolados catequina e ácido acetilauritólico e ativos pra *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Os extratos obtidos do látex seco e *in natura* e os extratos da entrecasca clorofórmico e etanólico 75% foram ativos frente a todas as bactérias testadas, mesmo para aquelas que mostraram resistentes no método de difusão em disco. É reconhecido que o método de microdiluição em caldo apresenta maior sensibilidade às drogas do que o método

de difusão em disco, pois o primeiro permite um contato direto entre a droga, o meio de cultura e as bactérias, que são incubadas sob agitação contínua (Hadacek & Greger, 2000; Ríos & Recio, 2005; Cos et al, 2006).

O látex seco e *in natura* não apresentaram diferenças marcantes quanto à potência e ao espectro de ação antibacteriano nos ensaios de difusão em disco e para a determinação da CIM, porém apresentaram melhor atividade antibacteriana quando comparada aos extratos obtidos de outros farmacógenos (folhas e entrecasca).

Muitos estudos estão focados na determinação da atividade antimicrobiana de plantas associadas à medicina popular, assim como é de interesse identificar as substâncias responsáveis por esta atividade. E muitos deles direcionados à identificação de compostos como os alcalóides, flavonóides, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, triterpenos ou naftoquinonas. Muitos destes compostos podem ser isolados ou obtidos por ensaio bioguiado após detecção prévia da atividade antimicrobiana da planta em estudo (Ríos e Recio, 2005).

A fitoquímica realizada do látex seco e do extrato etanólico 75 % da entrecasca revelou a presença de classes químicas que são dotadas de atividade antimicrobiana. Metabólitos secundários como os alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados e esteróides (Rauha et al., 2000; Simões et al., 2000).

Os resultados obtidos na abordagem fitoquímica do látex seco estão de acordo com os resultados obtidos por Mattos (2001) para o látex de *C. urucurana* e do extrato etanólico 75% da entrecasca também concordam com os de Peres et al (1997) quanto à presença de catequina, e este ativo para *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Na bioautografia realizada para o látex seco, o sistema eluente (fase móvel) foi capaz de separar duas bandas, as quais apresentaram atividade antibacteriana, indicando que as substâncias ativas sejam de dois grupos químicos distintos e polaridade semelhante. Já com relação ao extrato etanólico 75%, ocorreu a separação de três bandas que indicaram a

presença de grupos químicos de polaridades distintas, que também apresentaram atividade antibacteriana. E esses resultados podem estar relacionados com os grupos de metabólitos secundários identificados na abordagem fitoquímica. Foram observados halos de inibição de crescimento de tamanhos variados para os diferentes R_f 's. A partir desta bioautografia, pode-se direcionar um isolamento bioguiado das plantas aqui testadas e de acordo com os R_f 's apresentados pelas drogas testes, mostram que as mesmas podem ser posteriormente isoladas, exceto para a banda que apresentou um curto valor de R_f (R_f 0,08) (Collins, Braga & Bonato, 1997).

Neste ensaio bioautográfico é observado a possível existência de substâncias ou grupos de substâncias químicas capazes de inibir o crescimento bacteriano, desta forma mostrando que a planta possui este potencial a ser explorado. A bioautografia permite a determinação da polaridade dos compostos ativos, como mostra os resultados obtidos, sugerindo que as substâncias ou classes de substâncias ativas presentes no látex e no extrato etanólico sejam de características polares (Schomourlo et al., 2005). As saponinas, flavonóides, alcalóides, as antocianidinas e antocianinas assim como os esteróides e os taninos que foram identificadas na abordagem fitoquímica preliminar e que apresentam características polares podem ser responsáveis pela atividade apresentada frente às bactérias envolvidas neste estudo.

O perfil cromatográfico em conjunto aos resultados obtidos no ensaio antimicrobiano de bioautografia do látex seco e do extrato etanólico 75% da entrecasca sugerem que diferentes substâncias ou grupos de substâncias químicas e de diferentes polaridades sejam responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada.

As plantas apresentam inúmeros tipos de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) que são importantes para a defesa natural frente a todas as espécies de organismos vivos (Rauha et al., 2000), substâncias estas que aumentam sua concentração em situações adversas,

desta forma determinados grupos de metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana podem ser consideradas fitoalexinas. As quinonas produzem coloração marrom às frutas quando estas são danificadas, estas substâncias apresentam potencial antibacteriano, um exemplo é a hepericina (antroquinona) isolada da *Hypericum perforatum*, antigamente usada como antidepressivo (Domingo & López-Brea, 2003). Os taninos constituem um grupo de substâncias fenólicas poliméricas e podem-se dividir em hidrolizáveis ou condensados. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, como diarreia, reumatismo, hemorragia, feridas, queimaduras, inflamação, dentre outras. Tem-se descrito mais de 30 taninos que são capazes de inibir crescimento de fungos e bactérias. (Domingo & López-Brea, 2003; Simões et al., 2000; Cowan, 1999).

Os flavonóides são substâncias hidroxiladas fenólicas que constituem a mais ampla família de fenóis naturais. São conhecidas por serem sintetizadas pelas plantas em respostas as infecções bacterianas. Esta atividade é provavelmente devida a sua capacidade em formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular de forma similar as quinonas. E ainda seu caráter lipofílico pode ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microorganismos. Um exemplo de plantas que apresentam flavonóides ativos é a *Camellia sinensis* ativa frente ao *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* dentre outros. Lopes, Kato & Yoshida (1998) observaram a atividade fúngica de flavonóides de isolados de plantas, que apresentaram ação 10 vezes mais potente que a nistatina (Cowan, 1999; Domingo & López-Brea, 2003; Sartori, 2005).

Os alcalóides recebem esta denominação por serem compostos nitrogenados heterocíclicos que apresentam atividade microbicida, incluindo espécies de *Giardia* e *Entamoeba* e também atividade contra Tripanossoma. O mecanismo de ação dos alcalóides

parece estar relacionado com a sua interação com a parede celular e o DNA dos microorganismos (Cowan, 1999; Domingo & López-Brea, 2003).

As saponinas são glicosídeos de esteróis ou de terpenos policíclicos e devido ao seu comportamento anfifílico e capacidade de se complexar com os esteróis, proteínas e fosfolídeos de membranas apresentam inúmeras propriedades biológicas. Dentre as propriedades apresentadas estão a atividade hemolítica, molusquecida, anti-helmíntica, hipocolesterolemiantes, antiinflamatória, antiviral. As saponinas são também dotadas de atividade antibacteriana, apresentou atividade frente à *E. coli*, *Staphylococcus sp* e também para fungos (Simões et al., 2000; Domingo & López-Brea, 2003).

As catequinas são produtos originados a partir das proantocianidinas e antocianidinas. Estas apresentam atividade em inativar a toxina colérica do *Vibrio* e também atividade inibitória da enzima glicosiltransferase produzida pela *Streptococcus mutans* encontrada na cavidade oral do homem e causadores de cáries e gengivites. Também foram relatadas atividade frente a *S. aureus* e *S. typhimurium* (Cowan, 1999; Simões et al., 2000; Peres et al., 1997).

Nos modelos de avaliação da atividade antimicrobiana é notada a falta de modelos que avaliem a atividade *in vivo* de plantas medicinais, sendo esta uma das propostas para estudos futuros (Ríos & Recio, 2005).

Neste trabalho foi reproduzido e adaptado o modelo experimental de infecção sistêmica em camundongos para avaliação da atividade *in vivo* do látex seco de *C. urucurana* (Yamaguchi et al., 1998; Koga et al., 2005).

No modelo de infecção sistêmica induzida em camundongos, os resultados obtidos pelo látex mostraram que o mesmo apresenta atividade antibacteriana, com atividade profilática as infecções causadas pelos microorganismos gram-positivo e gram-negativo (*S. aureus* e *K. pneumoniae*) envolvidos neste estudo. Na infecção induzida pela *S. aureus* o látex

apresentou melhor atividade nas maiores doses (500 e 1000 mg/kg), com prevenção de morte superior a 50 % dos animais. Não sendo marcante a diferença protetora entre essas doses. No caso da infecção induzida pela *K. pneumoniae*, os melhores resultados também foram obtidos nas maiores doses, sendo que nas doses de 500 e 1000 mg/kg os resultados foram semelhantes, apresentando uma proteção de 60 % dos animais. A atividade profilática apresentada pelo látex foi discretamente melhor na infecção induzida pela *K. pneumoniae*, apresentando uma dose mediana efetiva (DE₅₀) menor que na infecção sistêmica induzida pela *S. aureus*. A atividade antibacteriana *in vivo* do látex apresentou correlação positiva com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, os quais também apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias envolvidas neste modelo experimental.

De forma geral os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos realizados, os látex e extratos testados apresentaram maior atividade antibacteriana frente às bactérias gram-positivas. O perfil de seletividade em relação às bactérias gram-positivas tem sido geralmente encontrado nos testes de atividade antimicrobiana com plantas, entretanto é um fenômeno também observado para a maioria dos agentes antimicrobianos sintéticos (Schaechter et al., 2002). A resistência intrínseca das bactérias gram-negativas aos agentes antimicrobianos tem sido associada à presença de enzimas e outras estruturas na membrana externa que são capazes de bular a atividade antibiótica. Com isso o agente antimicrobiano não consegue penetrar na célula, ou quando consegue a concentração não é suficiente para apresentar o resultado esperado (Schaechter et al., 2002; Murray et al., 2004).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para *Croton urucurana* Baillon no desenvolvimento do trabalho permitiram concluir que:

❖ Na triagem da atividade antibacteriana pelo ensaio de difusão em disco as partes da planta testada apresentaram atividade antibacteriana, com os melhores resultados observados para o látex *in natura* e seco, o qual apresentou maior potência, seguido pelos extratos clorofórmico e etanólico 75 % da entrecasca e por último os extratos hexano e etanólico 75 % das folhas;

❖ No teste de sensibilidade, na determinação da CIM dos extratos selecionados, todos apresentaram atividade antibacteriana, sendo que o látex *in natura* e seco apresentaram melhor atividade e potência antibacteriana, porém não diferindo quanto ao espectro de ação, quando comparados aos extratos clorofórmico e etanólico 75 % da entrecasca;

❖ De acordo com os resultados obtidos no ensaio de difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima, a atividade antibacteriana apresentada pelo látex *in natura* e látex seco e extratos obtidos por partição em diferentes solventes e em diferentes partes de *C. urucurana* indicam que os princípios ativos são de natureza diferente e distribuem-se de modo não uniforme nas diferentes partes da planta;

❖ O perfil fitoquímico apresentado pelo látex seco e extrato etanólico 75% da entrecasca revelou a presença de grupos de metabólitos secundários, substâncias bioativas, como alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos, saponinas, taninos condensados e esteróides, que são grupos de substâncias dotadas de atividade antimicrobiana;

❖ O perfil cromatográfico em conjunto aos resultados obtidos no ensaio antimicrobiano de bioautografia do látex seco e do extrato etanólico 75% da entrecasca sugerem que os mesmos apresentam diferentes classes de metabólitos secundários, de polaridades distintas, possuidoras de atividade antibacteriana;

❖ No modelo de infecção sistêmica, o látex seco apresenta atividade antibacteriana *in vivo*, com ação profilática, prevenindo os animais contra a morte causada pela infecção sistêmica induzida por *S. aureus* e *K. pneumoniae*;

❖ A planta *Croton urucurana* Baillon apresentou atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo*, nos modelos antimicrobianos frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, realizados neste trabalho, justificando em parte o uso desta planta como antiinfecioso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.95, n.3, p. 367-373, 2000.
- Alviano, W.S.; Mendonça-Filho, R.R.; Alviano, D.S.; Souto-Padron, T.; Rodrigues, M.L.; Bolognese, A.M.; Alviano, C.S. & Souza, M.M. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiology and Immunology, v.20, p.101-105, 2005.
- Amorim, E.L.C.; Lima, C.S.A. & Higino, J.S.; Albuquerque, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. Infarma, v.15, p. 66-69, 2003.
- Anthikomkulchai, S.; Prawat, H.; Thasana, N.; Ruangrunsi, N. & Ruchirawat, S. COX-1, COX-2 Inhibitors and Antifungal Agents from *Croton hutchinsonianus*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v.54, n.2, p.262-264, 2006.
- Arikan, S.; Paetznick, V. & Rex, J.H. Comparative Evaluation of Disk Diffusion with Microdilution Susceptibility Testing of caspofungin against aspergillus isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.46, n.9, p.3084-3087, 2003.
- Barry, A.L.; Thirnsberry, C.; Gerlach, E.H. & Hawkinson, R.W.D. M. Methods of measuring zone of inhibition whit the Bauer-Kirby disk susceptibility test. Journal of Clinical Microbiologic, v.6, p. 885-889, 1979.
- Bauer, A.W.; Perry, M.B. & Kirby, W.M.M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal Clinical Pathology, v. 45, p. 493-496, 1966.

- Biavatti, M.W. Química e bioatividade da *Raulinoa echinata*, espécie endêmica do vale do Itajaí – SC. Tese (Doutorado), 2001. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 248p.
- Cechinel Filho, V. & Yunes, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica, 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.
- 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. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p. 135-143, 2004.
- Collins, C.H.; Braga, G.L. & Bonato, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 7ed. Editora da Unicamp: São Paulo, 1997, p. 47, 48, 52.
- Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V. & Maes, L. Anti-infective of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, p.290-302, 2006.
- Costa, A.F. Farmacognosia. 2ed. v. 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.
- Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.*, v.12 n.4, p. 564-582, 1999.
- Craveiro, A.; Silveira, E. R.; Braz Filho, R. & Mascarenhas, I. P. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton urucurana*. *Phytochemistry*, v.20, n.4, p.852-854, 1982.
- De Souza, M.M., Bella Cruz, A., Schuhmacher, M.B., Kreuger, M.R.O., Freitas, R.A & Bella Cruz, R.C. Métodos de avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: Bresolin, T.M.B.; Cechinel Filho, V. (Editores) Ciências farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora Univali, Itajaí, 2003.

- Domingo, D. & López-Brea. Plantas com acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia, v.16, n. 4, p.385-393, 2003.
- Esmeraldino, L. E., Souza, A. M. & Sampaio, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. Phytomedicine, v.12, n.8, p.570-576, 2005.
- Falcão, E.P.S.; Silva, N.H. & Gusmão, N.B. et al. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. Acta Farmaceutica Bonoarense, p. 43-49, 2002.
- Freitas, M.F.L; Mota, R.A. & Leão, A.E.D.S. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.56, p. 405-407, 2004.
- Gurgel, A.; Sidrim, J.J.C.; Martins, D.T.; Filho, C.V. & Rao, V.S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. Journal of Ethnopharmacology, v.97, p.409-412, 2005.
- Gurgel, A.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Martins, D.T.O.; Mattos, P.O. & Rao, V.S.N. Studies on the antidiarrhoeal Effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. Phytotherapy Research, v.15, p. 319-322, 2001.
- Gurgel, L.A. Estudo da Atividade Antifúngica, Antiinflamatória intestinal e antinociceptiva visceral do látex do *Croton urucurana* Baill. Dissertação de mestrado, 2005. Universidade Federal do Ceará.
- Gus, P.I.; Melamed, J.; Barth, A.; Sudhaus, B.D.; Quinto, G.; Matos, G.H. & Bayer, M.C. Aderência in vitro do *Staphylococcus epidermidis* e da *Pseudomonas aeruginosa* alcaligenes em lentes intra-oculares. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v.69, 2006.

- Hadecek, F. & Greger, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochemical Analysis*, v.11, p.137-147, 2000.
- Hiruma-Lima, C.A.; Toma, W.; Souza Gracioso, J.S.; Almeida, A.B.A.; Batista, L.M.; Magri, L.; Paula, A.C.B.; Soares, F.R.; Nunes, D.S. & Souza Brito, A.R.M.S. Natural trans-Crotonin: The Antiulcerogenic Effect of Another Diterpene Isolated from the Bark of *Croton cajucara* benth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. V.25, n.4, p.452-456, 2002.
- 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. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.9, n.7, p. 1027-1031, 2002.
- Jones, K. Review of sangre de Drago (*Croton lecheri*) – A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v.9, n.6, p.877-896, 2003.
- Joyce, C. *Earthly goods: medicine hunting in the rainforest*. New York. Ed. Little, Brown and Company, 304p, 1994.
- Koga, T.; Abe, T.; Inoue, H.; Takenouchi, T.; Kitayama, A.; Yoshida, T.; Masuda, N.; Sugihara, C.; Kakuta, M.; Nakagawa, M.; Shibayama, T.; Matsushita, Y.; Hirota, T.; Ohya, S.; Utsui, Y.; Fukuoka, T. & Kuwahara, S. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of CS-023 (RO49008463), a Novel Parenteral carbapenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.3239-3250, 2005.
- Lall, N. & Meyer, J.J. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, n.3, p.347-354, 1999.

- 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.
- Lorenzi, H. & Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto *Plantarum*, p. 208-209, 2002.
- Matos, F.L.A. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.
- Mattos, P.E.O. “Validação pré-clínica das atividades antinociceptiva, antiinflamatória, cicatrizante e avaliação da toxicidade do látex de *Croton urucurana* Baillon (Sarra d'água)”. Dissertação de mestrado, 2001. Universidade Federal de Mato Grosso, MT, p.95.
- Milo, B.; Risco, E.; Vila, R.; Iglesias, J. & Cañigüeral, S. Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. *Journal of Natural Products*, v.65, p.1143-1146, 2002.
- Mims, C., Playfair, J., Roitt, I.; Wakelin, D. & Willians, R. *Microbiologia Médica*. 4.ed. Manole: São Paulo, 2005.
- Murray, P.K, Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. & Pfaller, M.A. *Microbiologia Médica*. 4.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.
- Nascimento, G. G. F.; Locatelli, J.; Freitas, P. C. & Silva, G.L. Antibacterial activity plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p. 247-256, 2000.
- Nascimento, P.F.C.; Nascimento, A.C.; Rodrigues, C.S.; Antonioli, A.R.; Santos, P.O.; Júnior, A.M.B. & Trintade, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA, 2003.
- Newmann, D.J., Cragg, G.N. & Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v.66, p.1022-1037, 2003.
- 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, N.M.; Cechinel filho, V. *Ciências farmacêuticas Contribuição ao Desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Editora Univali, 2003.
- Patiño, D.C. Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos. *Umbral Científico*, v.3, p.48-56, 2003.
- Penildon, S. *Farmacologia*. 6ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.
- Peres, M.T.L. P.; Monache, F.D.; Cruz, A.B.; Pizzolatti, M.G. & Yunes, R.A. Chemical and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.56, p.223-226, 1997.
- Peres, M.T.L.P., Pizzolati, M.G., Yunes, R.A. & Monache, F.D. Clerodane Diterpenes of *Croton urucurana*. *Phytochemistry*, v.49, p.171-174, 1998.
- Pires, M.M.Y.; Souza, L.A. & Terada, Y. Biologia floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, v.26, n.2, p.209-215, 2004.
- Preto, J.B.; Cechinel Filho, V.; Nieldin, V.F.; Sartori, M.R.K.; Isaisas, E.B. & Bella Cruz, A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense*. *Zeitschirff Für Naturforsh*, v.59, p.657-662, 2004.

- Rahalison, L.; Hamburger, M.; Monod, M.; Frenk, E. & Hostettman, K. Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Medica*, v.60, p. 41-43, 1994.
- Rang, H.P.; Dale, M.M. & Ritter, J.M. *Farmacologia*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon Oxford*, v. 39, p. 603-613, 2001.
- Rauha, J.P.; Remes, S.; Heimonen, M.; Hopia, A.; Kahkonen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K. & Vuuroela, H. Antimicrobial effects of finnish plant extratcts containing flavonoids and phenoli compounds. *Internacional Journal of Food Microbiology*, v.56, p.3-12, 2000.
- Ríos, J.L. & Recio, M.C. Medicinal plants and Antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.80-84, 2005.
- Robbers, J.E.; Speedie, M.K. & Tyler, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Willians & Wilkins. p. 1-14, 1996.
- Santos, F.A.; Jéferson, F.A.; Santos, C.C.; Silveira, E.R. & Rao, V.S.N. antinoceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Science*, v.77, p.2953-2963, 2005.
- Sartori, M.R.K. “Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG’”. Dissertação de Mestrado, 2005. Universidade do Vale do Itajaí – SC, p.81.
- Sartori, M.R.K.; Pretto, J.B.; Cruz, A.Bresciani, L.F.V.; Yunes, R.A.; Sortino, M.; Zacchino, S.A. & Cechinel Filho, V. Antifungal activity of fractions and two purê compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela paludosa*) (Asteraceae). *Pharmazie*, v.58, n.8, p.567-569, 2003.

- Saxena, G.; Farmer, S. Towers, G.H.N. & Hancock. Use of Specific Dyes in the Detection of antimicrobial Compounds from crude plant Extracts using a Thin Layer Chromatography agar Overlay Technique. *Phytochemical Analysis*, v.6, p.125-129, 1995.
- Schaechter, M., Engleberg, N.C, Eisenstein, B.I. & Medoff, G. *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas*. 3 ed. Guanabara koogan: Rio de Janeiro: 2002.
- 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.
- Schomourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S. & Costa, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medical and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.96, p. 563-568, 2005.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2ed., Editora UFRGS: Porto Alegre, 2000, 821p.
- Souza, H.C.A.; Barbosa, W.L.R. & Vieira, J.M. Investigação Fitoquímica e Isolamento da Substância Antibacteriana Presente na Espécie *Ananas erectifolius* (curauá). *Revista Científica da UFPA*, v.4, 2004.
- Souza, L.K.H.; Oliveira, C.M.A.; Ferri, P.H.; Santos, S.C.; Júnior, J.G.O.; Miranda, A.T.B.; Lião, L.M. & Silva, M.R.R. Antifungal Properties of Brazilian Cerrado Plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p. 247-249, 2002.
- 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: Editora Univali, 2003, 239p.

- Suffredini, I.B.; Sader, H.S.; Gonçalves, A.G.; Reis, A.O.; Gales, A.C.; Varella, A.D. & Younes, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37. p.379-389, 2004.
- Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.3, p.281-301, 2000.
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F. & Candeias, J.A.N. *Microbiologia*. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
- Virtuoso, S.; Davet, A.; Dias, J.F.G.; Cunico, M.M.; Miguel, M.D.; Oliveira, A. B. & Miguel, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n.2: 137-141, 2005.
- Yamaguchi, K.; Domon, H.; Miyazaki, S.; Tateda, K.; Ohno, A.; Ishii, K.; Matsumoto, T. & Furuya, N. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activities of CS-834, a New oral carbapenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 555-563, 1998.
- Zacchino, S. Estratégias para a descoberta de novos agents antifúngicos. 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 antifungal cell wall. In: Rai, M., Mares, D. (Editors) *Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects*. The Harworth Press, p. 1-41, 2003.

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](#)