

JULIANA BERNARDON PRETTO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS PUROS  
OBTIDOS DE ALGUMAS PLANTAS DA FLORA  
CATARINENSE**

**Itajaí -2005**

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

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO**  
**DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS PUROS**  
**OBTIDOS DE ALGUMAS PLANTAS DA FLORA**  
**CATARINENSE**

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

**JULIANA BERNARDON PRETTO**

Itajaí (SC), setembro de 2005

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO  
DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS PUROS OBTIDOS  
DE ALGUMAS PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS**

Juliana Bernardon Pretto

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em produtos naturais – microbiologia, e aprovada em forma final pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí'

---

Alexandre Bella Cruz, Doutor  
Orientador

---

Tânia Maria Bellé Bresolin, Doutora  
Coordenadora do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Banca examinadora:

---

,Doutor  
Presidente

---

Valdir Cechinel Filho, Doutor  
Co-orientador

---

,Doutor

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que dele participaram,  
desde quando era um sonho:

Deus, por permiti-lo;

Meus pais, Luiz Antônio e Loiva  
pelo apoio e exemplo de vida;

Ao amigo, cúmplice e esposo, Leonardo,  
pela compreensão por tanta ausência;

Ao irmão José Luiz sempre presente apesar da distância.

## **AGRADECIMENTOS**

- ✓ **Ao Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz, pela orientação e exemplo de dedicação e profissionalismo;**
- ✓ **Ao Prof.Dr. Valdir Cechinel Filho, pelo estímulo, orientação, sugestões pertinentes e amizade;**
- ✓ **A Prof.Msc.Rosana Ce Bella Cruz, pela amizade e auxílio;**
- ✓ **A amiga “Romelinha” por ter me aturado esse tempo todo;**
- ✓ **As amigas Juzinha, Mara, Cris Wolke, Cristi e Rô pelos momentos compartilhados;**
- ✓ **Aos amigos Héd, Marcos e Carol pela amizade;**
- ✓ **A amiga Dani.....**
- ✓ **Ao “amigo piazinho” pelo empréstimo do computador...**

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

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS PUROS OBTIDOS DE ALGUMAS PLANTAS DA FLORA CATARINENSE**

**JULIANA BERNARDON PRETTO**

Setembro/2005

Orientador: Dr. Alexandre Bella Cruz

Co-Orientador: Dr. Valdir Cechinel Filho

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Calophyllum brasiliense*, atividade antimicrobiana

Número de Páginas: 74

**RESUMO**

No presente trabalho, foram analisadas algumas plantas da flora catarinense (*Abuta sellowana*, *Calophyllum brasiliense*, *Coussapoa schottii*, *Psychotria spp.*, *Quina spp.*, *Sloanea spp.*, a planta conhecida popularmente como Lírio do Campo, e os compostos puros isolados de *Adiantum cuneatum*: filiceno e filicenol), quanto a atividade antimicrobiana, pelo método de diluição em ágar. A triagem apontou a planta *Calophyllum brasiliense* como mais promissora, a qual foi investigada. A *Calophyllum brasiliense* demonstrou ação antibacteriana e ação antifúngica contra os microrganismos testados. As frações mais ativas foram encontradas nas folhas, sendo que todas as partes da planta apresentaram atividade antimicrobiana. A planta apresentou seletividade de ação contra bactérias Gram-positivas. No entanto, compostos puros isolados de *C. brasiliense* não demonstraram atividade frente aos mesmos microrganismos nas concentrações testadas. Estes resultados sugerem que os compostos ativos provavelmente estavam presentes em baixas concentrações na planta ou que sua ação se devia a um efeito sinérgico de vários compostos. Foi realizada também, a avaliação da atividade antibactericida, através da determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Verificou-se ainda que a *Calophyllum brasiliense* apresentou ação contra fungos filamentosos (dermatófitos), e contra a levedura *Cryptococcus neoformans*. Os compostos puros também foram testados e não apresentaram efeito relevante. Avaliou-se também o possível mecanismo de ação da atividade antifúngica, através do método da *Neorospora crassa*, cujos resultados demonstram que os compostos não atuam inibindo a parede celular fúngica. Os resultados demonstram que a *Calophyllum brasiliense* apresenta um perfil de atividade antimicrobiana, confirmando seu uso popular como anti-infeccioso.

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

**ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF EXTRACTS, FRACTIONS AND PURE  
COMPOUNDS FROM SOME PLANTS OF THE CATARINENSE FLORA**

**JULIANA BERNARDON PRETTO**  
**Setembro/2005**

Advisor: Dr. Alexandre Bella Cruz

Co-Advisor: Dr. Valdir Cechinel Filho

Key-words: Medicinal plants, *Calophyllum brasiliense*, antimicrobial activity

**ABSTRACT**

In this study, we have evaluated the antimicrobial activity from some plants of the catarinense flora (*Abuta sellowana*, *Calophyllum brasiliense*, *Coussapoa schottii*, *Ipomoea pes-caprae*, *Psychotria spp.*, *Quiina spp.*, *Sloanea spp.*, and the plant known popularly as Lírío do Campo) and the pure compounds isolated from *Adiantum cuneatum* (filiceno and filicenol), for possible antimicrobial activity by using Minimal Inhibitory Concentration (MIC). From a selection, the *Calophyllum brasiliense* was selected as more promising, and more detailed investigated. The *Calophyllum brasiliense*, demonstrated to antibacterial and antifungal action against the tested microorganisms. It presented selectivity of action against Gram-positive bacteria, as for example *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactie* and *Bacillus cereus*. The isolated pure compounds of *C. brasiliense*, had not demonstrated activity when tested front to the same microorganisms. These results suggests a synergistic action of some compounds, as well as the presence in low concentration of these compounds. It was did it, the evaluation of the antibactericidal activity, through the determination of Minimal Inhibitory Bactericidal (CBM). Was observed also that *C. brasiliense*, had activity against filamentous fungi (dermatophytes) and yeast *Cryptococcus neoforms*.. The pure compounds had been also tested and they had not presented effect. Also evaluated the possible mechanism of action of the antifungal activity, through the method of *Neorospora crassa*, and these results suggests that the tested compounds had do not act to inhibition of fungal cellular wall. In summary, the results confirm and justify the popular use of this plant, for the treatment of infectious pathologies. Our results suggest that the *Calophyllum brasiliense* presents a profile of antimicrobiana activity, confirming its popular use as antiinfectious.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 <u>Objetivo geral</u> .....	3
2.2 <u>Objetivos Específicos</u> .....	3
3 EMBASAMENTO TEÓRICO.....	4
3.1 <u>Plantas medicinais</u> .....	4
3.2 <u>Gênero <i>Calophyllum</i></u> .....	8
3.2.1 <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	9
3.3 <u>Microrganismos</u> .....	10
3.3.1 Bactérias.....	10
3.3.1.1 Bactérias Gram-positivas.....	14
3.3.1.2 Bactérias Gram-negativas.....	15
3.3.2 Fungos.....	16
3.3.2.1 Dermatofitoses.....	18
3.3.2.2 Infecções Fúngicas Oportunistas.....	20
3.4 <u>Antimicrobianos</u> .....	22
3.5 <u>Classificação dos agentes antimicrobianos</u> .....	25
3.5.1 Agentes Antibacterianos.....	25
3.5.2 Agentes Antifúngicos.....	27
3.6 <u>Ensaio de citotoxicidade com <i>Artemia salina</i></u> .....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 <u>Plantas Medicinais</u> .....	30
4.1.1 Triagem de plantas com potencial medicinal.....	30
4.1.1.1 Preparação de extratos, frações e compostos puros das plantas utilizadas para triagem.....	30
4.1.2 Preparação de extratos, frações e compostos puros de <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	31
4.2 <u>Material microbiológico</u> .....	32
4.3 <u>Métodos microbiológicos</u> .....	33
4.3.1 Determinação da atividade antimicrobiana.....	33
4.3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Bactérias.....	33



4.3.1.1.1 Preparo dos inóculos bacterianos .....	33
4.3.1.1.2 Avaliação da atividade antibacteriana .....	34
4.3.1.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	34
4.3.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Fungos .....	35
4.3.1.3.1 Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes .....	35
4.3.1.3.2 Preparo dos inóculos de fungos filamentosos .....	36
4.3.1.3.3 Avaliação da atividade antifúngica .....	36
4.3.1.4 Avaliação do possível mecanismo de ação antifúngica .....	37
4.3.2 Ensaio de citotoxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1 <u>Triagem das plantas medicinais brasileiras em relação a atividade antimicrobiana</u> .....	40
5.2 <u>Atividade antibacteriana de <i>Calophyllum brasiliense</i></u> .....	45
5.3 <u>Atividade antifúngica de <i>Calophyllum brasiliense</i></u> .....	52
5.4 <u>Teste de citotoxicidade com <i>Artemia salina</i></u> .....	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos e frações de oito plantas brasileiras contra bactérias Gram-positivas através do método de diluição em ágar.....42
- Tabela 2.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de compostos puros isolados de *Adiantum cuneatum* contra bactérias Gram-positivas através do método de diluição em ágar.....42
- Tabela 3.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* através do método de diluição em ágar.....46
- Tabela 4.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos puros isolados de *Calophyllum brasiliense* através do método de diluição em ágar.....49
- Tabela 5.** Resultados de Concentração Bactericida Mínima (CBM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* através do método de diluição em ágar.....51
- Tabela 6.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* contra fungos dermatófitos através do método de diluição em ágar.....53
- Tabela 7.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos puros isolados de *Calophyllum brasiliense* contra fungos dermatófitos pelo método de diluição em ágar.....54
- Tabela 8.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* contra leveduras pelo método de diluição em ágar.....55
- Tabela 9.** Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos puros isolados de *Calophyllum brasiliense* contra leveduras através do método de diluição em ágar.....56
- Tabela 10.** Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos, frações de *Calophyllum brasiliense* contra alguns fungos oportunistas através do método de diluição em ágar.....57
- Tabela 11.** Resultados obtidos com *C. brasiliense* pelo método da *Neorospora crassa*, para evidenciar possível mecanismo de ação da atividade antifúngica.....60
- Tabela 12.** Teste de toxicidade para *Artemia salina* das frações isoladas de *Calophyllum*

*brasiliense*.....60

## 1 INTRODUÇÃO

“Nada é mais imaturo na ciência do que a crença de que nada pode ser aprendido do passado”. Examinando-se o passado, vê-se que a história do desenvolvimento dos fármacos ocorreu em etapas: no começo os vegetais eram utilizados da maneira como eram encontrados no meio ambiente; depois estes passaram a ser concentrados para melhorar a intensidade e uniformidade de sua ação. Na seqüência, à medida que os progressos da química se impunham, as substâncias ativas puderam ser isoladas e, finalmente, utilizadas como protótipos de moléculas sinteticamente elaboradas, as quais possuíam atividade ainda maior (TYLER, 1999).

Apesar do aumento significativo na síntese de novos medicamentos, com crescimento do arsenal terapêutico disponível, estudos indicam que pelo menos um terço dos pacientes tratados pela medicina convencional nos Estados Unidos faz uso de fitoterapia, segundo avalia o Instituto Nacional de Saúde daquele país, (FETROW e ÁVILA, 1999) ainda que muitos deles deixem de revelar isso aos médicos. De fato, já em 1990, a indústria de fitoterápicos vendeu em 7 países da Comunidade Européia, o que equivale a 2,4 bilhões de dólares. Nos Estados Unidos, em 1995 este valor chegou a 3,2 bilhões de dólares, com crescimento anual de 25% desde então (NEWALL, ANDERSON e PHILLIPSON, 1996).

No Brasil, estima-se que  $\frac{1}{4}$  dos 8 bilhões de dólares de faturamento da indústria farmacêutica nacional em 1996, foram resultantes de medicamentos derivados de plantas. É importante ressaltar que apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram estudadas em busca de moléculas bioativas (AMORIM *et al.*, 2003).

As pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar os fitoterápicos já existentes vêm reassumindo papel importante nos últimos anos. Nesse contexto, 30% dos medicamentos produzidos pelos países desenvolvidos são provenientes de recursos naturais. No período de 1981 até 2002, dos 90 novos fármacos analisados pela *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e 9 eram oriundas de produtos naturais (SIXEL e PECINALLI, 2002; NEWMAN, CRAGG e SNADER, 2003).

Segundo Fetrow e Ávila (1999), é difícil selecionar as espécies vegetais que devem ser investigadas quanto ao seu potencial farmacológico, levando-se em conta a imensa quantidade de

espécies a serem exploradas. Por isso, os relatos da medicina popular costumam ser eficazes na identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas, auxiliando nas pesquisas com plantas medicinais (MACIEL *et al.*, 2002).

A medicina popular e o conhecimento sobre o uso de plantas são o resultado de influências culturais oriundas dos colonizadores europeus, indígenas e africanos. Baseando-se nas informações do uso popular das plantas, os cientistas podem direcionar a escolha das plantas que serão estudadas. Através dessas pesquisas, podem validar o uso de plantas medicinais, facilitando o uso de medicamentos equivalentes ou complementares aos existentes no mercado, com qualidade farmacológica comprovada (AMORIN *et al.*, 2003; DAS DORES *et al.*, 2003).

A validação da utilização de plantas medicinais depende da investigação sistemática realizada sob vários aspectos. Dentre esses aspectos podemos citar o aspecto químico, farmacológico e microbiológico, que somados a outros irão resultar no medicamento fitoterápico (ROJAS *et al.*, 1992; NIERO *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi avaliada a possível atividade antimicrobiana de algumas plantas da flora catarinense, tendo sido testadas as seguintes plantas: *Abuta sellowana*, *Adiantum cuneatum*, *Calophyllum brasiliense*, *Coussapoa schottii*, *Ipomoea pes caprae*, *Psychotria sp*, *Quiina sp*, *Sloanea sp* e a planta conhecida popularmente como Lírio do Campo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense.

#### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1 Selecionar plantas com perfil de atividade antimicrobiana.
- 2.2.2 Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos, frações e compostos puros obtidos das plantas que apresentarem melhor perfil antimicrobiano.
- 2.2.3 Avaliar a atividade bactericida dos extratos, frações e compostos puros obtidos das plantas que apresentarem melhor perfil antimicrobiano.
- 2.2.4 Avaliar a atividade citotóxica da planta que apresentar melhor perfil antimicrobiano.

### 3 EMBASAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais fazem parte da história da humanidade. Elas eram empregadas na alimentação, em práticas religiosas, no folclore, na medicina e nas lendas. Há registros médicos que comprovam que os chineses já utilizavam as plantas medicinais desde 3700 a.C. e acreditavam que havia uma planta apropriada para o tratamento de cada doença. 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 (COWAN, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2003; NIERO *et al.*, 2003).

As primeiras informações relativas à utilização empírica de plantas medicinais, com fins terapêuticos, são encontrados no código de Hamurabi (2000 a.C.), no papiro de Ebers (1500 a.C.) e na obra Universo Medicina de Penadio Dioscorides (40-90 d.C). Entretanto, a pesquisa sistemática, tendo em vista o isolamento dos princípios ativos vegetais, iniciou-se no século XIX, quando o farmacêutico alemão Fridiech Wilhelm Setürner procurava no ópio, a substância responsável por sua ação hipnótica (SIANI, 2003).

Plantas medicinais são aquelas que possuem em sua composição, substâncias químicas, biologicamente sintetizadas a partir de nutrientes, água e luz. Estas substâncias provocam no organismo humano e animal, reações que podem variar entre a cura ou abrandamento de doenças, através da ação de princípios ativos como alcalóides, glicosídeos, saponinas, etc. A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças é denominada fitoterapia, havendo atualmente 150 delas reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com real valor terapêutico (FETROW e ÁVILA, 1999).

Preparação fitofarmacêutica é um medicamento manufaturado obtido exclusivamente de plantas, enquanto que medicamento é um produto preparado seguindo procedimentos legais e que tenha sido caracterizado em termos de sua eficácia. Atualmente, muitos estudos científicos já comprovaram a utilidade de muitas plantas medicinais, mas seu uso maior é feito devido à crença popular (FETROW e ÁVILA, 1999; NIERO *et al.*, 2003).

As plantas produzem dois tipos distintos de metabólitos. Os metabólitos primários, são encontrados em todos os sistemas vivos e são essenciais ao crescimento e a vida da própria planta, como por exemplo os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, etc. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, e são resultantes de processos adaptativos. A produção de determinados metabólitos secundários, pode ser característica restrita de certas plantas e são caracterizados por uma enorme diversidade química. Hoje, sabe-se que as referidas substâncias, são de importância relevante nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores (BRUNETON, 1995; BASILE *et al.*, 2000; DUFFY e POWER, 2001; LIMA, 2001; NIERO *et al.*, 2003).

Muitas “curas” de patologias são atribuídas aos metabólitos secundários, presentes nas plantas. Os metabólitos secundários são constituídos por uma variedade de substâncias bioativas, e nos dias atuais o interesse científico por essas substâncias tem aumentado devido a busca por novos medicamentos oriundos de plantas (BASILE *et al.*, 1999 e 2000; SATO *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2003).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, bem como a extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento. Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais, via de regra, originaram medicamentos em menor tempo, com custos muitas vezes inferiores, e conseqüentemente, mais acessíveis à população (BRITO e BRITO, 1993; UGAZ *et al.*, 1994).

As pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos, a partir de plantas, ou de aprimorar fitoterápicos já existentes vêm reassumindo papel importante nos últimos anos. Colaboram com isso a grande aceitação popular para o uso de plantas medicinais e acima de tudo, a movimentação anual de vultuosas quantias na economia mundial com o comércio de fitofármacos e a possibilidade de desenvolver novos medicamentos a partir de moléculas naturais. Das cerca de 250.000 espécies de plantas no mundo, menos de 10% foram exaustivamente investigadas com vistas ao descobrimento de propriedades terapêuticas. Para a realização de uma triagem preliminar podem ser pesquisadas não somente plantas empregadas diretamente na



terapêutica, mas também aquelas que possam constituir matéria prima das preparações galênicas ou de fornecer intermediários para a fabricação de fármacos sintéticos (FERREIRA *et al.*, 1998; SIXEL, PECINALLI, 2002).

Embora várias plantas estejam sendo utilizadas ou comercializadas com finalidades terapêuticas, a grande maioria não possui dados científicos que comprovem a sua eficácia e seu espectro toxicológico no homem, assim como a garantia da qualidade do produto ou de sua produção (FERREIRA *et al.*, 1998).

Diversas pesquisas têm comprovado a utilização de várias plantas medicinais no tratamento de infecções (SAVI *et al.*, 1996-1997; COWAN, 1999; LIMA, 2001; SCHLEMPER, *et al.*, 2001; NADINIC *et al.*, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2003; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004). O uso de plantas medicinais no mundo, principalmente na América do Sul, contribui significativamente com cuidados com a saúde. Muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica (HOLETZ *et al.*, 2002; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004), por isso a necessidade de validar cientificamente o uso das mesmas.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), demonstram que cerca de 80% da população mundial utiliza algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa, ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% dá-se por indicação médica. Por outro lado, é preocupante o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico. São várias as publicações que registram o uso medicinal das plantas, sem apresentar dados comprobatórios de suas propriedades terapêuticas (SIMÕES, 2002).

Os estudos com plantas medicinais no Brasil está se intensificando, devido a diversidade de espécies presentes na flora brasileira e a necessidade da busca de novos agentes antimicrobianos para combater a resistência dos microrganismos frente a auto-medicação, AIDS, entre outros fatores (ADEBAJO, OLOREK, ALADESAMNI, 1989; BRITO e BRITO, 1993; MIGUEL *et al.*, 1996; LIMA, 2001). Considerando a evolução de genes bacterianos resistentes a antibióticos, extratos originários de plantas, tem se tornado objeto de estudo das indústrias farmacêuticas. O interesse por compostos naturais está sendo ampliado significativamente, também devido ao grande número de efeitos adversos causados pelos medicamentos sintéticos. Na busca por novos medicamentos, incluindo antibióticos, algumas indústrias têm realizado

testes de triagem farmacológica de plantas medicinais (FERREIRA *et al.*, 1998).

Grande parte das matérias-primas de origem natural que suprem a nossa indústria farmacêutica provém de países com as mesmas condições climáticas encontradas no Brasil. Temos sido importadores tradicionais de produtos farmacêuticos sintéticos, semi-sintéticos e naturais (CECHINEL FILHO e YUNES 2001).

É crescente a utilização de plantas medicinais em todo o mundo. Os conhecimentos acumulados pela medicina convencional não são suficientes para responder à cura de diversas patologias. Além disso, os melhores tratamentos e os mais especializados da medicina ortodoxa são caros e podem trazer consigo efeitos adversos (MENDELSON e BALICK, 1995; NEWALL, ANDERSON, PHILLIPSON, 1996; SIMÕES *et al.*, 2002).

Estima-se que aproximadamente 50% dos fármacos empregadas para o tratamento de infecções (antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e antivirais), são de origem natural ou semi-sintéticas modificadas para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicas, bem como 19,4% utilizaram produtos naturais como protótipos para medicamentos sintéticos (NEWMANN, CRAGG, SNADER, 2003).

Diante da enorme variedade de espécies da flora que são consideradas popularmente medicinais, e da possibilidade de inúmeras outras com igual potencial e nunca pesquisadas, é importante estabelecer um critério de seleção que atenda aos objetivos da investigação. Uma triagem preliminar pode a princípio, separar plantas que efetivamente sejam ativas (SIXEL e PECINALLI, 2002).

Alguns princípios podem ser utilizados para planejar-se a seleção das plantas que serão objeto de estudo, como por exemplo (MAGISTRETTI, 1980):

- 1- Reestudo da planta, de acordo com algumas propriedades farmacológicas já descritas na literatura. Constitui uma forma prática pela seleção de espécies existentes, e já reconhecidas pelas suas propriedades medicinais.
- 2- Levantamento ecológico, ou seleção da planta num habitat particular, ou por intermédio de indicação sugestiva de efeitos em animais.
- 3- Seleção aleatória ou randômica seguida de bioensaios. Esta seleção é conduzida por coleta arbitrária de espécies representativas dos diversos grupos taxonômicos de uma região. Do material obtido são preparados extratos, que são analisados *in vivo* ou *in situ*, com a finalidade de encontrar amostras com efeitos farmacológicos

significativos.

- 4- Seleção por critérios quimiotaxonômicos. O reconhecimento da estrutura química de um princípio ativo encontrado em um vegetal, como sendo o fator responsável pelos seus efeitos farmacológicos, pode estabelecer uma importante referência na procura deste composto ou compostos semelhantes. Diversas plantas aparentadas fitogeneticamente, e que podem se assemelhar do ponto de vista químico, pela presença de tais metabólitos secundários, embora em concentrações variadas, podem ser pesquisadas.
- 5- Seleção através de investigações etnofarmacológicas. O fato de um expressivo número de indivíduos em uma população utilizar determinada planta na medicina tradicional, pode ser considerado uma boa sugestão para uma investigação farmacológica. Parte do que se busca entender cientificamente sobre plantas medicinais foi legado pela medicina popular, através de conhecimentos adquiridos e preservados.

Várias plantas da flora brasileira são empregadas na medicina popular com boa reputação de atividade medicinal. Muitas são utilizadas com finalidade antisséptica ou no tratamento de doenças infecciosas e estudos têm demonstrado que muitas vezes ocorre a confirmação da atividade antimicrobiana (ALVES *et al.*, 2000; HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORI *et al.*, 2003; DE CAMPOS *et al.*, 2004).

### **3.2 Gênero *Calophyllum***

O gênero *Calophyllum brasiliense* (*Clusiaceae/Guttiferae*) é composto por 180-200 espécies, combinadas nos ambientes quentes e úmidos dos trópicos (STEVENS, 1980).

Plantas do gênero *Calophyllum* são conhecidas por apresentarem metabolismo secundário ativo. Esse metabolismo tem sido evidenciado pela extensiva pesquisa química, resultando no isolamento de diversas classes de compostos incluindo xantonas, cumarinas, flavonóides, chalconas, benzofuranos, triterpenos, entre outros (DA SILVA *et al.*, 2001; ITO *et al.*, 1999 e 2002; HAY *et al.*, 2003; OGER *et al.*, 2003; SHEN *et al.*, 2003; ISAIAS *et al.*, 2004).

Algumas espécies do gênero *Calophyllum* são frequentemente empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias (ALI *et al.*, 1999b; SARTORI *et al.*, 1999). Diversos estudos tem reportado que extratos e/ou óleo de várias espécies deste gênero apresentam potencial atividade antibacteriana (BHAT *et al.*, 1954; POTTI e KURUP, 1970; MAHMUD *et al.*, 1998; ALI *et al.*, 1999a; DHARMARATNE, WIJESINGHE, THEVANASSEM, 1999a; KHAN, KIHARA, OMOLOSO, 2002; SAKAGAMI *et al.*, 2002) e antifúngica (MOREL *et al.*, 2002; OGER *et al.*, 2003; HAY *et al.*, 2003).

### 3.2.1 *Calophyllum brasiliense*

*Calophyllum brasiliense* é uma planta conhecida popularmente como “guarandi”, “guanandi”, “bari” ou “jacareúba” (CORREA, 1978; REYES-CHILPA, JIMENEZ-ESTRADA, ESTRADA-MUÑIZ, 1997; DA SILVA *et al.*, 2001; MESIA-VELA *et al.*, 2001).

É uma árvore característica de florestas tropicais. Sua distribuição vai desde o México, América Central, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia até o Brasil. No Brasil, pode ser encontrada da região amazônica até o norte de Santa Catarina. É uma árvore frondosa e pode atingir de 20-30m de altura. Possui folhas glabras e coriáceas, perenifólia, característica exclusiva das florestas pluviais localizadas sobre os solos úmidos e brejosos, vindo a florescer nos meses de setembro à novembro. Apresenta copa arredondada, extendida e densa. O tronco é cilíndrico e reto. As flores estão dispostas em panículas auxiliares, com 2 a 5 cm de largura, apresentando flores masculinas e bissexuais, brancas numerosas, pequenas e ligeiramente perfumadas. Os frutos são drupas ovóides ou esféricas, com 2,5 a 3 cm de largura (LORENZI, 1998).

A planta é utilizada como aromatizante, devido a um óleo essencial extraído da árvore, semelhante ao sândalo; o óleo contido nas semente pode ser utilizado como combustível para lamparinas. A madeira resultante da árvore da *Calophyllum* é utilizada na construção de casas, revestimento de assoalhos e fabricação de móveis. Testes experimentais indicam que a madeira da *C. brasiliense* é altamente resistente a fungos, que acometem a sua madeira quando está em decomposição. É resistente também aos cupins *Reticulitermes flavipes* e *Coptotermes formosanus*. A resistência natural aos fungos e cupins tem sido atribuída aos metabólitos

secundários presentes na árvore (REYES-CHILPA, JIMENEZ-ESTRADA, ESTRADA-MUÑIZ, 1997).

A *C. brasiliense* é utilizada popularmente para o tratamento de bronquite, distúrbios gástricos e hepáticos (SARTORI *et al.*, 1999), dor (LEWIS, 1977), inflamação, diabetes, hipertensão (DUKE, 1994), diarreia (VASQUEZ, 1990), herpes (RUTTER, 1990), reumatismo, varicose, hemorróida e úlceras crônicas (CORREA, 1978; REYES-CHILPA, JIMENEZ-ESTRADA, ESTRADA-MUÑIZ, 1997).

Outros estudos têm demonstrado que um grupo de cumarinas e xantonas apresentam potente inibição da transcriptase reversa do HIV-1 (McKEE *et al.*, 1998; DHARMARATNE, 2002; ITO *et al.*, 2002). Recentemente, diversos compostos (cumarinas e xantonas) desta planta também demonstraram atividade preventiva anticâncer (ITO *et al.*, 2002) e atividade tripanomicida (ABE *et al.*, 2004). Entretanto, embora algumas pesquisas tenham demonstrado que a planta em estudo apresente atividade antifúngica (REYES-CHILPA, JIMENEZ-ESTRADA, ESTRADA-MUÑIZ, 1997) e antibacteriana (COTTIGLIA *et al.*, 2002); ainda não se conhece o perfil dessa atividade.

### **3.3 Microrganismos**

#### **3.3.1 Bactérias**

As bactérias são os mais simples organismos encontrados na maioria dos ambientes naturais. Elas são células esféricas ou em forma de bastonetes curtos com tamanhos variados, alcançando às vezes micrômetros linearmente. A célula bacteriana apresenta várias estruturas, algumas das quais estão presentes apenas em determinadas espécies, enquanto outras são essenciais, e portanto encontradas em todas as bactérias (MIMS *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Uma das estruturas essenciais da célula bacteriana é conhecida como membrana. A membrana citoplasmática bacteriana, é uma estrutura de 8 nm de espessura, sendo esta estrutura

responsável por uma barreira de separação do meio interno (citoplasma) e externo da célula. A membrana dos procariotos difere quimicamente da membrana das células eucarióticas, principalmente pela ausência de esteróis. Como principais funções da membrana podemos citar o transporte de solutos, produção de energia por transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, biossíntese de componentes, duplicação do DNA e secreção de enzimas (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

A manutenção da forma bacteriana (bacilo, coco, etc.) é devido a presença da parede celular bacteriana. Além disso, a parede desempenha um papel importante na divisão celular como *primer* para sua própria biossíntese, dando origem ao septo que separa as duas novas células oriundas da divisão celular. Na maioria das bactérias, a parede celular deve a sua rigidez a uma camada composta por uma substância somente encontrada em procariotos e que recebe diferentes denominações como mureína, peptidoglicano, mucopeptídeo (MIMS *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

De acordo com a constituição da parede, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-negativas e Gram-positivas. As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. As principais diferenças reveladas pela coloração de Gram estão relacionadas a presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas e de uma espessa camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

As paredes das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam diferenças marcantes. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede composta de várias camadas que diferem na sua composição química e, conseqüentemente, é mais complexa que a parede das Gram-positivas, que apesar de mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 1998).

As bactérias Gram-positivas protegem sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa. As muitas camadas de peptidoglicano que são espessas, impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido a presença de açúcares e aminoácidos (SCHAECHTER *et al.*, 2002). A parede celular das bactérias Gram-negativas é formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. Como a maioria das membranas biológicas, a membrana externa das bactérias Gram-negativas é formada por uma dupla camada lipídica: uma camada interna composta de fosfolípidos e uma externa contendo lipopolissacarídeos e proteínas.

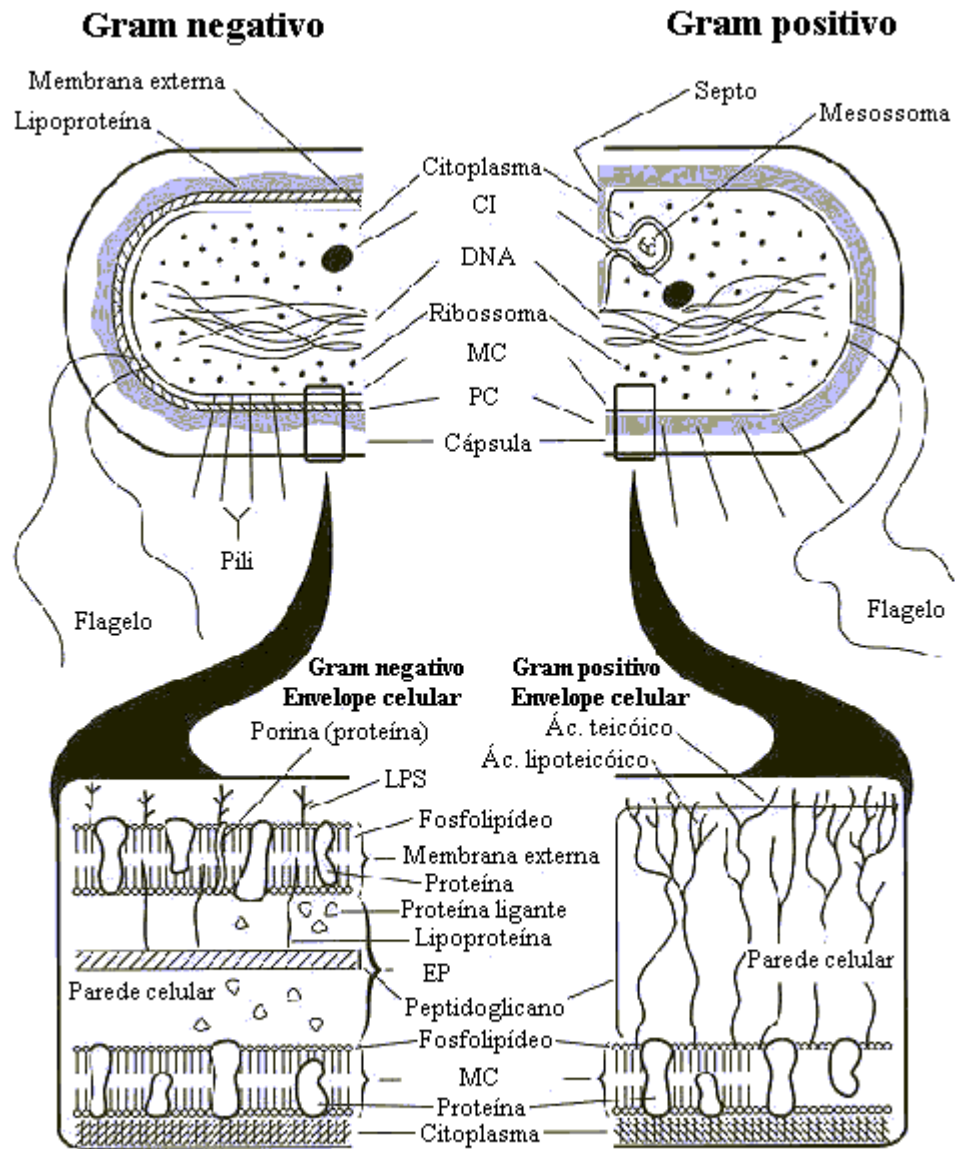
O seu interior possui características hidrofóbicas devido aos ácidos graxos e a parte polissacarídica externa constitui um ambiente hidrofílico. A membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos (SILVA *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

Devido a membrana externa apresentar características lipoproteicas, as bactérias necessitam dispor de mecanismos que permitam a entrada de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons. Por isso, sua membrana externa possui canais especiais chamados de porinas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

O sistema de dupla membrana das bactérias Gram-negativas origina um espaçamento. O espaço que separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado de espaço periplasmático. O espaço periplasmático é composto por uma camada de peptidoglicano e um gel composto por vários componentes. Nesse espaço pode-se encontrar algumas enzimas capazes de inativar fármacos tornando a célula resistente à elas, como por exemplo as beta-lactamases (RYAN, 1994; TRABULSI *et al.*, 1999).

As bactérias de modo geral são causadoras de diversas patologias. A gravidade da infecção depende de diversos fatores, dentre eles a imunidade do hospedeiro, bactéria causadora, local da infecção, resistência da bactéria a antibioterapia. As bactérias implicadas nestas infecções podem ser verdadeiramente patógenas ou patógenas oportunistas (TRABULSI *et al.*, 1999).

Figura 1. Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Legenda: CI - Corpo de Inclusão; EP - Espaço Periplasmático;

LPS - Lipopolissacarídeo; MC - Membrana Citoplasmática; PC - Parede Celular.

Fonte: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.htm>



### 3.3.1.1 Bactérias Gram-positivas

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos humanos e de outros mamíferos. O *S. aureus* é uma bactéria bastante comum e causadora de diversos tipos de infecções. A gravidade da infecção vai desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções graves potencialmente fatais. Quando as infecções estão localizadas na pele, podem causar furúnculos, conjuntivites, impetigos, feridas infeccionadas, foliculite, pústulas ou abscessos subcutâneos. Podem causar também infecções mais profundas como pneumonias, abscessos profundos, osteomielites, endocardites, flebites, mastites e meningites. São também associados a infecções relacionadas a cateteres, bem como com dispositivos cardiovasculares e válvulas cardíacas, e infecções alimentares (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 1998; MIMS *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

Cepas de isolados clínicos de *S. aureus* são frequentemente resistentes a muitos antibióticos. Desde a primeira vez que se utilizou a penicilina, os *S. aureus* demonstraram uma marcante habilidade de adaptação. A resistência a novas fármacos tem sido desenvolvida muito rapidamente, pouco tempo após seu lançamento no mercado. Algumas cepas são agora resistentes aos antibióticos mais convencionais. Isto se torna preocupante, uma vez são necessários vários anos de estudos para descoberta de novos antibióticos (SHIOTA *et al.*, 1999; FERESIN *et al.*, 2001).

O *S. saprophyticus* é frequentemente isolado de infecções urinárias em pacientes do sexo feminino. É considerado um dos agentes mais frequentes de infecções urinárias, tais como cistite e pielonefrites agudas. Sua patogenicidade parece estar relacionada a sua capacidade de aderir às células do epitélio do trato urinário (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

As principais doenças associadas aos estreptococos ocorrem principalmente no trato respiratório, corrente-sanguínea ou na pele. Os estreptococos do grupo B são líderes em septicemias neonatais e meningites. Os índices de mortalidade em recém-nascidos é de 8%, mas em pré-maturos pode chegar a 30%. Nas doenças em neonatos com até seis dias de vida sabe-se que a transmissão ocorre, na maioria das vezes, verticalmente (TRABULSI *et al.*, 1999).

Os *streptococcus* do grupo B, como por exemplo *S. agalactie*, também têm sido associados com pneumonia em pacientes idosos. Essas bactérias são parte da flora oral normal e

da flora vaginal, sendo também isolados em infecções urinárias de pacientes adultos (MIMS *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

A maioria dos membros do gênero *Bacillus* são microrganismos saprófitas que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação. Podem desenvolver-se em alimentos e produzir uma enterotoxina ou uma toxina emética, causando intoxicação alimentar. Algumas vezes estes microrganismos podem produzir patologias em seres humanos imunocomprometidos (meningite, endocardite, conjuntivite, gastroenterite aguda)(JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 1998).

### 3.3.1.2 Bactérias Gram-negativas

As manifestações clínicas das infecções causadas por *Escherichia coli* dependem do local da infecção, do tipo da cepa e do sítio de ação. A causa mais comum de infecção do trato urinário, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções das vias urinárias em mulheres jovens (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Algumas cepas patogênicas de *E. coli* podem provocar diarreia. Essas cepas são classificadas pelas suas propriedades de virulência, e cada grupo provoca diarreia através de um mecanismo diferente. Quando as defesas normais do hospedeiro não estão adequadas, a *E. coli* pode atingir a corrente sanguínea e provocar sepse (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002). *Escherichia coli* e os estreptococos do grupo B constituem as principais causas de meningites em lactentes (TRABULSI *et al.*, 1999).

O gênero *Proteus* é encontrado regularmente no intestino do homem. A espécie mais comumente encontrada é *Proteus mirabilis*. As infecções causadas por essas bactérias ocorrem principalmente no trato urinário (MIMS *et al.*, 1999). É importante salientar que uma característica comum às bactérias do gênero *Proteus*, é a resistência natural às polimixinas, um grupo de antibióticos bastante ativo contra as demais enterobactérias e outros microrganismos Gram-negativos (TRABULSI *et al.*, 1999, KONEMAN *et al.*, 2001).

Salmonelose é uma gastroenterite comumente encontrada no homem, que tem início na mucosa intestinal. A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico da

bactéria, idade e condições de saúde do hospedeiro (MIMS *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

De um modo geral os sorotipos de *Salmonella* causam, no adulto normal, apenas uma enterocolite que evolui sem complicações e desaparece dentro de uma semana ou menos. Entretanto, se o hospedeiro é uma criança a infecção pode evoluir de maneira diferente e pode ser grave (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002). Além de enteroinfecções, a *Salmonella typhimurium* pode causar em crianças infecção sistêmica e meningite (TRABULSI *et al.*, 1999).

*Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo tipicamente oportunista, que pode causar as mais variadas patologias. Como exemplo podemos citar infecções localizadas, que ocorrem em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras. Infecções urinárias podem estar associadas ao uso de cateteres, pneumonias associadas ao uso de respiradores, entre outras. Pode ser encontrada nos hospitais, e sua elevada frequência nesse ambiente pode ser explicada pela elevada resistência a antibióticos e anti-sépticos leves (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002)

Espécies de enterobacter raramente são agentes primários de infecção. Frequentemente são isolados de diferentes espécimes clínicos, de pacientes hospitalizados. Vários casos de bacteremia, decorrentes de aplicação endovenosa de líquidos contaminados, têm sido descritos (TRABULSI *et al.*, 1999).

### **3.3.2 Fungos**

Os fungos podem causar no homem doenças denominadas micoses, das mais variadas classificações. As micoses ocupam lugar de destaque na patologia tropical. O termo micose foi empregado pela primeira vez por Virchow, em 1856 (TRABULSI *et al.*, 1999).

Vários dos fungos que podem causar micoses vivem em associação com o homem como comensais ou estão presentes no ambiente. Nos últimos anos houve um aumento crescente das infecções fúngicas sistêmicas, não apenas por fungos patogênicos conhecidos, mas também por fungos considerados inócuos (RANG e DALE, 1993; MIMS *et al.*, 1999).

Fungos são formados por células eucarióticas, com núcleo bem definido circundado por

uma membrana nuclear, uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis. Naturalmente essa descrição também se aplica às células animais, um aspecto que representa um sério problema no tratamento das infecções fúngicas (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Os fungos originam-se de uma única célula ou de um fragmento de hifa e estas unidades apresentam estruturas variadas. Uma destas unidades é a parede celular, que é uma estrutura rígida responsável pela proteção da célula. A parede celular é composta, de modo geral, por glucanas, mananas, quitina, proteínas e lipídeos. As glucanas e as mananas estão combinadas com proteínas, formando as glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Estudos citoquímicos demonstraram que cada camada possui um polissacarídeo dominante. As camadas mais internas (8° e 5°) contêm beta-1-3 glucanas e mananas, enquanto as mais externas contêm mananas e beta 1-6 glucanas. A primeira e a terceira camadas são mais ricas em mananas (TRABULSI *et al.*, 1999).

As glucanas nas células fúngicas são normalmente polímeros de D-glicose, ligados através de pontes betaglicosídicas. As mananas, polímeros de manose, representam o material amorfo da parede. A quitina, é o principal componente estrutural da parede celular fúngica. Os lipídios estão presentes como compostos polares e apolares. Os principais lipídios apolares são os triacilgliceróis e os esteróis, e os polares são os diacilglicerofosfolinas e diacilgliceroolaminas (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Outro componente da célula fúngica é a membrana plasmática, que atua como uma barreira semipermeável, no transporte ativo e passivo, para dentro e para fora da célula, sendo constituída de uma porção hidrofóbica e uma hidrofílica. As membranas das células dos fungos possuem em sua constituição química esteróis, que não são encontrados nas células bacterianas (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Os fungos patogênicos podem ser divididos com base na forma de crescimento ou conforme o tipo de infecção produzida. De acordo com a micose causada podem ser divididos em micose superficial ou micose profunda, de acordo com a forma de crescimento são classificados em filamentosos ou leveduriformes (MIMS *et al.*, 1999).

As micoses cutâneas são as principais patologias causadas por fungos classificados como dermatófitos. São encontradas em locais ligeiramente mais profundos na epiderme e podem ser agudas ou crônicas, dependendo do agente etiológico e do estado imunológico do paciente

(LACAZ *et al.*, 1998; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Micoses superficiais são infecções limitadas às camadas mais externas da pele e cabelos. Em geral, trata-se de infecções leves, com resposta inflamatória mínima ou ausente. As micoses subcutâneas constituem um grupo distinto de doenças fúngicas que acometem a derme e o tecido subcutâneo. São causadas por fungos que costumam ser isolados do ambiente e que só produzem a doença em circunstâncias oportunistas ou associados a traumatismos. Já as micoses sistêmicas, são infecções que invadem órgãos internos do organismo. São causadas por patógenos primários ou por fungos oportunistas (LACAZ *et al.*, 1998).

Infecções oportunistas ocorrem, por que o equilíbrio entre o microrganismo e os mecanismos de defesa antiinfecciosa do paciente é rompido. Isto pode ser provocado pela queda de resistência do paciente, utilização de procedimentos invasivos hospitalares (destaque para sondas e cateteres) ou pelo emprego de antibióticos, que matam as bactérias que competiam com os fungos no organismo (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

### 3.3.2.1 Dermatofitoses

A expressão dermatófito é utilizada para designar grupo de fungos que em vida parasitária vivem à custa de queratina da pele, unhas e pêlos. Os dermatófitos enquadram os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

As infecções por dermatófitos incluem organismos fúngicos que colonizam a camada epidérmica queratinizada e estabelecem uma reação inflamatória associada no hospedeiro. Essas infecções são geralmente cutâneas e restritas a derme, pois em indivíduos sadios esses fungos não conseguem penetrar em tecidos e órgãos. As principais patologias causadas pelos dermatófitos são as tineas. O termo tinea deriva da palavra latina que significa verme, e refere-se a lesões serpiginosas que caracterizam essas infecções e que aparecem como se um “verme” estivesse cavando nas margens. Esse termo é utilizado em associação à parte do corpo acometida para descrever a patologia, como por exemplo, *tinea pedis* (pé) (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Todas as manifestações clínicas dessa patologia estão relacionadas com a inflamação da

epiderme, da derme e dos folículos pilosos. Esse processo é desencadeado por uma reação imunologicamente mediada aos antígenos fúngicos que se difundem a partir da epiderme infectada (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

As diferentes espécies de dermatófitos possuem diferentes nichos ecológicos. Fungos do gênero *Microsporum* são de distribuição geográfica mundial, e são os patógenos zoofílicos e geofílicos mais comum em infecções humanas (LACAZ *et al.*, 1998).

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

O *Microsporum gypseum* é um fungo de espécie geofílica, que encontra-se no solo de jardins, e quando acomete seres humanos provoca lesões inflamatórias e impetiginosas. Pode provocar *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea cruris* em crianças e adultos (FISHER e COOK, 2001).

*Trichopyton rubrum* é o agente etiológico da *tinea corporis*, *barbae*, *cruris*, *pedis*, *manuum* e onicomicose das mãos e dos pés. Espécie antropofílica de distribuição mundial, atinge cerca de 40% dos casos de *tinea*. Este fungo pode infectar os pêlos e a pele. Processos inflamatórios causados por esses agentes são geralmente crônicos, algumas vezes com lesões profundas chamadas de granulomas tricofíticos (TRABULSI *et al.*, 1999; FISHER e COOK, 2001).

O *Trichophyton mentagrophytes* é um dermatófito cosmopolita é a espécie mais isolada do homem e animais. De acordo com a variedade de espécie isolada pode ser zoofílico ou antropofílico. Por exemplo, a variedade *mentagrophytes* que provoca *tinea pedis* e, *tinea corporis*, algumas vezes invade a lâmina ungueal, apresentando pontos brancos na unha. É um agente contagioso, podendo ser transmitido entre animais, de animais para pessoas e de pessoa para pessoa (WRIGHT, SCOTT, GORMAN, 1983; TRABULSI *et al.*, 1999; FISHER e COOK, 2001)

O *Trichopytom tonsurans* é um fungo antropofílico de distribuição mundial, mas considerado endêmico nos Estados Unidos, Canadá, México, Caribe e nordeste da América do Sul. A *tinea capitis* de ponto negro epidérmico é a causa das infecções nos países acima citados.

É também o agente da *tinea capitis* em crianças e adultos, provocando microepidemias no Brasil. Foi isolado, também, de casos de *tinea corporis*, *tinea pedis* e ocasionalmente onicomicose (FISHER e COOK, 2001).

O *E. floccosum* é o único patógeno humano desse gênero. É encontrado em todo planeta, especialmente nas zonas úmidas e tropicais. Trata-se de um fungo antropofílico que não foi encontrado no solo ou em outras espécies animais. É um fungo altamente contagioso, que infecta a pele e as unhas, mas não os pêlos. É o agente responsável por casos de *tinea cruris*, *tinea corporis*, *tinea pedis* e onicomicose. Infecções desse agente podem tornar-se epidêmicas em um time de atletas, acampamentos, dormitórios, etc (FISHER e COOK, 2001).

### 3.3.2.3 Infecções Fúngicas Oportunistas

Diversos fungos, presentes no meio ambiente ou integrantes da flora normal, podem em determinadas situações passarem de saprófitos a patogênicos, provocando quadros clínicos variáveis, desde processos febris benignos, a septicemias algumas vezes fatais (LACAZ *et al.*, 2002).

Fatores ligados ou não ao hospedeiro explicam a grande incidência de tais infecções. Por exemplo, ambientes hospitalares, pacientes hospitalizados por longo período, queimados, pacientes em tratamento quimioterápico, pacientes com HIV, entre outros. Todas as vezes em que o organismo encontra-se debilitado por doenças orgânicas como a diabetes, criam-se condições ou oportunidades que um fungo de saprófito passe a ser patógeno (LACAZ *et al.*, 2002; SCHAECHTER *et al.*, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2003).

Dentre as principais patologias fúngicas oportunistas podemos citar a candidíase, aspergilose, criptococose e fusariose. Candidíase ou candidoses são infecções provocadas por leveduras de gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans*. A maior parte dessas infecções são de origem endógena, ou seja, são causadas por microrganismos que fazem parte da microbiota normal do ser humano. A transmissão exógena ocorre principalmente em pacientes debilitados pelo tratamento com antibióticos e drogas imunossupressoras, e no decurso de doenças crônicas (LACAZ *et al.*, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999; FISHER e COOK, 2001)

As candidíases podem ser superficiais ou profundas, com localização cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica. Na candidíase mucocutânea os tecidos da mucosa oral e vaginal são os mais atingidos. A candidíase cutânea envolve as áreas intertriginosas da pele das mãos, virilhas e axilas. Na candidíase sistêmica o fungo pode invadir diversos órgãos causando candidíase pulmonar, endocardite, fungemia e nefrite. Extensa é a literatura sobre tais micoses, principalmente correlacionada com a AIDS ou outras imunodeficiências (LACAZ *et al.*, 1998).

*Candida tropicalis* é uma levedura oportunista, causando candidíase em humanos e em animais. A doença é geralmente restrita ao hospedeiro imunocomprometido, provocando meningite, endocardite, candidíase disseminada, pielonefrite, esofagite e vaginite (DAVISE, 1987; LACAZ *et al.*, 1998).

A aspergilose é a micose provocada por uma das espécies pertencentes a um dos grupos do gênero *Aspergillus*. Os aspergilos têm ampla distribuição geográfica, encontrando-se no solo, no ar, em plantas e matéria orgânica em geral, sendo contaminantes comuns em laboratórios e hospitais (YAMADA *et al.*, 1993; TRABULSI *et al.*, 1999).

A aspergilose raramente ocorre como doença primária em indivíduos normais. A infecção pode ser localizada nos pulmões (freqüentemente o fungo é inalado), ouvido, sistema nervoso central, olhos e em outros órgãos. Várias espécies de *Aspergillus* podem provocar “colonização” em cavidades pré-existentes, infecção propriamente dita, processos alérgicos e intoxicações (micotoxicoses). As formas clínicas mais comumente observadas são a pulmonar e a cutânea (TRABULSI *et al.*, 1999).

Podem também causar o aspergiloma intracavitário ou bola fúngica, onde observam-se processos pneumônicos parenquimatosos. Além disso o fungo pode preencher cavidades com abscessos ou cistos (RYAN, 1994; TRABULSI *et al.*, 1999).

*Aspergillus fumigatus* é a espécie de *Aspergillus* que mais freqüentemente é isolada em pacientes humanos. Apesar de geralmente, as pessoas somente estarem expostas a infecção, se estiverem muito debilitadas (FISHER e COOK, 2001).

O *Aspergillus flavus*, difere dos demais do gênero devido à produção de toxinas. Pode provocar aspergilose pulmonar alérgica ou doença disseminada (FISHER e COOK, 2001; LACAZ *et al.*, 2002).

*Aspergillus niger*, é freqüentemente encontrado no solo, no ar, no mofo de grãos estocados e em vegetais em decomposição. Na maioria dos casos, quando contaminado o



paciente desenvolve otomicose, aspergiloma e infecções dos seios nasais (FISHER e COOK, 2001).

A espécie *Fusarium* é encontrada em todo o mundo, no solo, nos vegetais em decomposição e nos frutos maduros. Agente da hialo-hifomicose, apresenta variado quadro clínico, inclusive processos generalizados em pacientes com neoplasias. Apresenta grande importância como agente de ceratites, devido a exposição à poeira, especialmente nos usuários de lente de contato. Várias espécies de *fusarium* são produtoras de micotoxinas (FISHER e COOK, 2001; LACAZ *et al.*, 2002).

A criptococose, ocorre com grande frequência em pacientes imunodeprimidos, geralmente acometendo os pulmões e o Sistema Nervoso Central (SNC). Seu agente etiológico é o *Criptococcus neoformans*, que é encontrado na natureza, geralmente nas fezes de pombos e outras aves. É uma infecção que se manifesta com quadros clínicos variados. O fungo atinge o organismo através do trato respiratório. Após podem causar lesões tegumentares, viscerais ou meningoencefálicas. Trata-se de uma micose extremamente grave e para qual têm sido empregados vários tratamentos (LACAZ *et al.*, 2002; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

*Saccharomyces cerevisiae* é um tipo de levedura encontrada no levedo do pão, cerveja, vinho e álcool industrial. *S. cerevisiae*, pode ser encontrada, ocasionalmente, como parte da flora normal endógena da garganta. Essa levedura vem sido isolada em casos de fungemia, infecção disseminada e de válvulas do coração. Foi isolada também de cateteres de pacientes com AIDS, pneumonia, câncer e outras doenças (FISHER e COOK, 2001).

### **3.4 Antimicrobianos**

O homem e os microrganismos partilham uma vida em comum que se perde na sombra do tempo, e certamente, desde a pré-história provocam doenças ao homem. Entretanto as causas dessas doenças só começaram a ser descobertas séculos atrás, a partir de 1878, graças aos trabalhos de Pasteur e Koch, que demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades do homem e animais (TAVARES, 1999; MIMS *et al.*, 1999).

Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos, actinomicetos ou bactérias,

capazes de impedir o crescimento ou destruir, microrganismos. Embora a maioria dos agentes antimicrobianos em uso atualmente, sejam derivados de produtos naturais de fermentação, a maioria deles são modificados quimicamente a fim de aprimorar as propriedades antimicrobianas ou farmacológicas (MIMS *et al.*, 1999).

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3.000 anos atrás, quando os médicos chineses utilizavam bolores para tratar tumores inflamatórios e feridas infeccionadas. Os sumérios recomendavam emplastos com uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixa. A descoberta de novos agentes antimicrobianos costumava ser uma questão meramente casual. Durante a idade média, substâncias de origem vegetal, animal e mineral continuaram a ser utilizadas sem o conhecimento maior de suas propriedades químico-farmacêuticas, confundindo-se freqüentemente a medicina com a magia (TAVARES, 1999).

No início do século XX, surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. As descobertas de Ehrlich e seus contemporâneos revolucionaram a terapêutica e provocaram o desenvolvimento da pesquisa e da indústria químico-farmacêutica objetivando a obtenção de novas substâncias medicamentosas sintetizadas em laboratório. Paul Ehrlich, inclusive elaborou as primeiras teorias sobre mecanismo de ação das fármacos antimicrobianas (DE SOUZA *et al.*, 2003).

O maior conhecimento dos métodos laboratoriais permitiu também o estudo das plantas com propriedades terapêuticas, procurando-se isolar seus princípios ativos. A pesquisa planejada conduziu à descoberta das primeiras substâncias que utilizadas em doses adequadas, eram capazes de destruir os microrganismos sem destruir a vida humana (TAVARES, 1999).

Uma das primeiras substâncias antimicrobianas oriunda de plantas, foi a quinina, obtida de uma árvore chamada chinchona existente no Peru, utilizada na terapêutica da malária. Outra substância também isolada de planta foi a emetina utilizada contra amebíase e a ipecacuanha utilizada no tratamento de diarréias (id *ibdem*, 1999).

Os primeiros agentes antiinfecciosos importantes, não eram verdadeiros antibióticos, mas sim antimetabólicos sintéticos. Como por exemplo o prontossil que *in vivo* é metabolizado a sulfonamida. A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de utilidade clínica, por Alexander Fleming em 1928, deu início a era da antibióticoterapia. O resultado final desse progresso científico refletiu-se na mudança da expectativa de vida para pacientes portadores de várias doenças infecciosas, antes de difícil tratamento e de alta mortalidade (TAVARES, 1999;

SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Com o advento da quimioterapia sulfamídica, por Domagk em 1935, e após a descoberta da penicilina por Fleming (1929), começaram a surgir por síntese orgânica ou biossíntese, drogas ou fármacos com atividade antifúngica. Esses fármacos podem atuar por via tópica ou sistêmica em diversas micoses (LACAZ *et al.*, 2002).

Os fármacos utilizados no tratamento de patologias infecciosas são agentes antibióticos, análogos dos antibióticos ou quimioterápicos. Antibióticos são substâncias anti-infecciosas, de origem natural, produzidas metabolicamente por microrganismos; análogos de antibióticos são produzidos por vegetais ou animais e quimioterápicos são substâncias antimicrobianas sintéticas. O agente terapêutico deve alcançar o sítio de infecção em concentração suficiente para inibir ou eliminar o agente infeccioso, com toxicidade mínima para o hospedeiro (DE SOUZA *et al.*, 2003).

Algumas substâncias químicas com propriedades antimicrobianas são tão tóxicas que são utilizadas apenas topicamente. Para uso interno, a droga antimicrobiana deve possuir toxicidade seletiva, ou seja ser tóxica apenas para o microrganismo, e não para o hospedeiro. A relação entre a toxicidade para o agente e para o organismo hospedeiro é chamada de índice terapêutica. Sabe-se que muitos antifúngicos são nefro e hepatotóxicos, o que pode ser muitas vezes mais grave do que a própria patologia causada pelo agente microbiano (BLACK, 1996; LACAZ *et al.*, 2002 e SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Agentes antimicrobianos são, via de regra, classificados como sendo específicos ou inespecíficos. Os específicos atuam principalmente sobre o microrganismo invasor, sem afetar significativamente o hospedeiro. Os antimicrobianos inespecíficos, ou seja, compostos capazes de *in vitro*, matar ou inibir o crescimento de qualquer microrganismo, não são considerados quimioterápicos, e sim desinfetantes, anti-sépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes, sanitizantes. Seu uso é exclusivamente tópico (DE SOUZA *et al.*, 2003).

Os microrganismos geralmente adquirem resistências aos antimicrobianos por mutações genéticas, mas muitas vezes pode não ser a mutação o fator responsável pela resistência. Os mecanismos de resistência clinicamente relevantes, incluem a síntese de enzimas que inativam a droga, prevenção do acesso ao sítio alvo (inibição da absorção ou aumento da excreção) ou modificação do sítio alvo (BLACK, 1996; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Durante as últimas décadas, ocorreu o uso desenfreado de agentes antimicrobianos, o que

pode ter contribuído para uma resistência dos microrganismos aos antibióticos. Associado a esse uso irracional e a resistência, houve um aumento dramático de infecções, principalmente fúngicas, como resultado das imunodeficiências associadas a AIDS, quimioterapia anticancerígena, transplantes, idosos e neonatos (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Atualmente, a pesquisa, a descoberta e a produção de novos agentes antimicrobianos revelam-se crescentes e necessárias. O risco do surgimento de microrganismos resistentes pode acontecer facilmente e é um risco clínico importante. Processos genéticos de seletividade podem conduzir ao aparecimento de “supermicrobios”. As medidas defensivas a serem tomadas incluem a busca por novos agentes antimicrobianos (TAVARES, 1999; MIMS *et al.*, 1999; LIMA, 2001; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

### **3.5 Classificação dos agentes antimicrobianos**

#### **3.5.1 Agentes Antibacterianos**

Os agentes antibacterianos podem ser classificados seguindo diversos critérios como estrutura química, mecanismo de ação, espectro e ação entre outros (MIMS *et al.*, 1999, SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Segundo Mims *et al* (1999), Tavares (1999),e Schaechter *et al* (2002), o sítio alvo dos grupos de agentes antimicrobianos, podem ser abordados da seguinte maneira:

##### **A) Inibidores de Síntese de Parede Celular**

A parede celular é um envoltório de proteção que reveste a membrana celular bacteriana. Os antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular atuam produzindo uma parede com defeitos estruturais atuando sobre o processo de replicação celular, e mostram-se seletivos, isto é, atuam apenas sobre a bactéria e não sobre o hospedeiro pois as células dos mamíferos não possuem parede celular.

##### **B) Inibidores da Síntese de Proteínas**

A síntese protéica pode sofrer interferência em várias fases do seu desenvolvimento: na

formação do RNA-mensageiro, na fixação do RNA-mensageiro ao ribossoma, por alterações no ribossoma e na fixação do RNA-transporte ao ribossoma .

#### C) Inibidores da Síntese de Ácidos Nucléicos

Para iniciar a síntese de DNA é necessário a ativação prévia de uma enzima para produzir o desenrolar as dupla fita de DNA e introduzir uma superespiral negativa. Esta enzima é a DNA-girase ou topoisomerase II .

É possível interferir na síntese de ácidos nucleicos através de 5 mecanismos diferentes:

- Inibição da síntese de nucleotídeos
- Alteração da propriedades de pareamento das bases modelo
- Inibição da DNA ou RNA-polimerase
- Inibição da DNA-girase
- Efeitos diretos sobre o próprio DNA.

#### D) Inibidores da Função da Membrana Citoplasmática

A membrana citoplasmática, é composta por cerca de 66% de proteínas e 33% lipídeos, que confere a ela uma permeabilidade seletiva responsável por controlar a passagem de substâncias e nutrientes para o interior da célula e a saída de dejetos resultantes do catabolismo. As alterações físico-químicas da membrana citoplasmática levam à morte bacteriana pois a permeabilidade seletiva é rompida, causando a saída de elementos vitais à célula como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucleicos ou a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano (TAVARES, 1999).

Os antibióticos que atuam por esse mecanismo assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças a presença, em sua molécula de grupamentos básicos  $\text{NH}_3^+$  e de uma cadeia lateral de ácido graxo. Quando alcançam a membrana citoplasmática, o ácido graxo mergulha na sua parte lipídica e a porção básica permanece na superfície. A intercalação das moléculas do agente antimicrobiano na membrana provocam sua desorganização, com saída dos componentes celulares e morte da bactéria. Por atuarem em estrutura comum a todas as células, todos esses agentes são igualmente tóxicos para o parasito e hospedeiro, sendo empregados clinicamente em escala limitada (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1993; TRABULSI, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2003).

### 3.5.2 Agentes Antifúngicos

Durante as últimas décadas, as micoses passaram a ser uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos. Devido principalmente a infecções como a AIDS, quimioterapia cancerígena e transplantes, houve um aumento dramático das infecções fúngicas em humanos. Infecções fúngicas produzidas por agentes que eventualmente apresentam baixa virulência, podem tornar letais infecções em pacientes como neonatos, diabéticos, desnutridos, neutropênicos, pacientes submetidos a cirurgias (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Com o aumento das infecções fúngicas, aumenta também a necessidade de novos agentes antifúngicos. Os antifúngicos existentes no mercado, possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se leva em consideração os efeitos colaterais como a nefro e a hepatotoxicidade. Como exemplo de antifúngicos que apresentam esses efeitos tóxicos temos a anfotericina B, e o cetoconazol, entre outros. Além disso podem ser fungistáticos e não fungicidas (azóis), ou podem desenvolver resistências (TAVARES, 1999; ZACCHINO *et al.*, 2003).

De acordo com Polak (1999), o fármaco ideal para cura de infecções antifúngicas ainda não foi descoberto. Os fármacos utilizados nas infecções fúngicas podem ser tóxicos não apenas para a célula fúngica, mas também para a célula do hospedeiro. Essa ação tóxica é devido à semelhança entre a célula fúngica e a célula humana. Numerosos agentes que inibem processos vitais da célula fúngica são conhecidos, mas devido a sua toxicidade para o homem não podem ser empregados como medicamento.

Segundo Selitrennikoff (1992), os novos agentes antifúngicos devem inibir processos moleculares que estão ausentes, ou que sejam suficientemente diferentes no hospedeiro. Fungos e humanos são ambos eucarióticos e as extensivas diferenças entre suas células ainda estão sendo exploradas para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Durante a elaboração de novos agentes antimicrobianos, devemos levar em consideração tanto a atividade antimicrobiana quanto as propriedades farmacológicas do agente antimicrobiano frente ao hospedeiro. Dentre as propriedades desejadas para um novo agente antimicrobiano podemos citar: seletividade para o alvo, atóxico para o hospedeiro, meia vida longa no plasma, baixa ligação às proteínas plasmáticas, ausência de interferência com outros fármacos, entre

outras (MIMS *et al.*, 1999; LACAZ *et al.*, 2002; ZACCHINO *et al.*, 2003).

O ensaio da *Neorospora crassa* é um teste de triagem para avaliação de mecanismo de ação de drogas fúngicas. Caso a droga venha a atuar na parede celular, pode-se assim reduzir a toxicidade, pois a parede celular só está presente na célula fúngica. A *Neorospora crassa* é um fungo filamentosos que quando está na presença de inibidores da parede celular fúngica e sob certas condições (37°C e meio osmótico), cresce como protoplasma (sem parede celular). Microscopicamente é possível observar essas malformações (hifas curtas e ramificadas). Isto pode ser visualizado macroscopicamente em ensaios de difusão em agar. Os halos produzidos pelos compostos que inibem a parede celular fúngica aparecem manchados e, por outro lado os que não interagem produzem zonas claras de inibição (ZACCHINO *et al.*, 2003; SELITRENNIKOFF, 1992).

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

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

Como exemplo de drogas que afetam a membrana celular podemos citar os derivados poliênicos, e derivados imidazólicos. Estas substâncias combinam-se com esteróis da membrana, rompendo a mesma ou tornando-a incapaz de efetuar suas funções normalmente (permeabilidade e transporte). A droga forma um poro na membrana, e o centro hidrófilo da molécula cria um canal iônico transmembrana. Podem ocorrer alterações na permeabilidade celular e causar a perda de constituintes essenciais das células como  $K^+$ , açúcares, proteínas, fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfato (RANG e DALE, 1993; TRABULSI, *et al.*, 1999).

### 3.6 Ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina*

O estudo da toxicidade de substâncias bioativas isoladas de plantas, compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou sintéticos preferencialmente deve ser viável, de fácil execução e que forneça um resultado rápido, têm sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química, farmacologia ou microbiologia. Animais, cultura celular, avaliação de sistemas bioquímicos podem ser realizados, mas apresentam custo elevado para uma triagem. Geralmente, a não ser que existam programas de colaboração, os laboratórios não estão adequadamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais ou tecidos e órgãos isolados. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos, levou à busca de novos testes (CAVALCANTE *et al.*, 2000).

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e portanto é considerado um ensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Estudos relatam que a *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é utilizado para determinar toxicidade de produtos naturais e químicos, considerando que estas larvas apresentam sensibilidade a substâncias tóxicas. Além disso tem a vantagem de ser um teste rápido e barato (CAVALCANTE *et al.*, 2000; SANTOS PIMENTA *et al.*, 2003).

O primeiro trabalho relativo ao uso de *Artemia salina* em bioensaios foi publicado em 1956 e, a partir daí inúmeros artigos tem sido reportados na literatura em estudos utilizando produtos e toxinas naturais além de extratos de plantas, e tem sido proposto como teste padrão por VanHaecke e Persoone (CAVALCANTE *et al.*, 2000).



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Plantas da flora catarinense

#### 5.1.1 Triagem de plantas com potencial medicinal

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura (MACIEL *et al*, 2002). A metodologia empregada para a seleção das plantas utilizadas nesse trabalho, foi planejada de acordo com a abordagem randômica. O processo de seleção das plantas foi aleatório, seguido de bioensaios farmacológicos, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta. A seleção foi conduzida através da coleta de espécies representativas dos diversos grupos taxonômicos de uma região. Após a coleta as plantas foram submetidas a estudos fitoquímicos no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da UNIVALI.

##### 4.1.1.1 Preparação de extratos, frações e compostos puros das plantas utilizadas para triagem

Foram fornecidos para a pesquisa, extratos brutos, frações oriundas de extratos (Hexano, Diclorometano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Metanol) e compostos puros, obtidos a partir das plantas da flora catarinense estudadas no NIQFAR/CCS/UNIVALI. As plantas utilizadas foram *Abuta sellowana* (caule), *Calophyllum brasiliense* (raízes e folhas), *Coussapoa schottii* (folhas), *Ipomoea pes-caprae* (planta inteira), *Psychotria sp.* (caules e folhas), *Quiina sp.* (caules e folhas), *Sloanea sp.* (caules e folhas), a planta conhecida popularmente como Lírio do campo (caules, folhas e rizomas) e os compostos puros filiceno e filicenol isolados de *Adiantum cuneatum*.

Os extratos brutos foram obtidos através de maceração em álcool metílico das diferentes

partes das plantas em estudo.

As frações foram obtidas através de partição com solventes de polaridade crescente:

- Fração hexano (HEX);
- Fração diclorometano (DCM);
- Fração acetato de etila (AE);
- Fração metanol (MeOH)

Os compostos puros foram obtidos nos laboratórios de fitoquímica do NIQFAR a partir dos extratos e frações semi-purificados através de procedimentos cromatográficos usuais, como cromatografia em coluna (CC) (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; NIERO *et al.*, 2003).

#### **4.1.2 Preparação de extratos, frações e compostos puros de *Calophyllum brasiliense***

Devido ao melhor perfil de atividade antimicrobiana dentre as plantas testadas, selecionou-se a *C. brasiliense* para estudos mais detalhados. A planta foi identificada pelo botânico Ademir Reis e está presente no herbário Barbosa Rodrigues sob a excicata número VC007. Para os estudos foram fornecidos pelo laboratório de fitoquímica da UNIVALI, extratos brutos, frações de extratos (polar e apolar) e compostos puros, obtidos a partir de *C. brasiliense*. As partes da planta utilizadas foram raízes, caule, folhas, flores e frutos.

Os caules e as folhas, foram coletadas nos jardins da UFSC/Florianópolis em dezembro de 1998. Raízes, flores e frutos foram coletados, no mesmo local no período de abril, setembro e dezembro de 2001.

Os extratos brutos foram obtidos através de maceração em álcool metílico das diferentes partes das plantas em estudo. Após filtração, o solvente foi removido com auxílio do rotavapor. O extrato bruto metanólico foi dissolvido em clorofórmio. As porções solúveis, foram denominadas

de apolares, e as porções não solúveis foram denominadas de polares. Os compostos puros foram obtidos a partir dos extratos e frações semi-purificados através de procedimentos cromatográficos usuais, como cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD) (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; NIERO *et al.*, 2003), cujo desenvolvimento foi realizado nos laboratórios de fitoquímica do NIQFAR, resultando na dissertação da mestrandia Daniela Buffon Isaias.

#### **4.2 Material microbiológico**

Os microrganismos que foram utilizados para realização da pesquisa são: *Bacillus cereus* (ATCC14579); *Enterobacter cloacae* (ATCC35030); *Escherichia coli* (ATCC11775); *Proteus mirabilis* (ATCC14273); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27859); *Salmonella typhimurium* (ATCC14028); *Staphylococcus aureus* (ATCC65388); *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC35552); *Streptococcus agalactiae* (ATCC13813) foram fornecidos pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello de Campinas/SP. Para os testes com fungos foram utilizadas as seguintes cepas: (disponíveis na Universidade Nacional de Rosário) *Aspergillus fumigatus* (ATCC26934); *Aspergillus flavus* (ATCC9170); *Aspergillus niger* (ATCC9092); *Candida albicans* (ATCC10231); *Candida tropicalis* (C131); *Cryptococcus neoformans* (ATCC32264); *Epidermophyton floccosum* (C114); *Microsporium canis* (C112); *Microsporium gypseum* (C115); *Neorospora crassa* (ATCC9279); *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC9763); *Trichophyton rubrum* (C137) e *Trichophyton metagrophytes* (ATCC9972), *Trichophyton tonsurans* (ATCC9171).

### **4.3 Métodos microbiológicos**

#### **4.3.1 Determinação da atividade antimicrobiana**

A avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos foi realizada pelo método da diluição em ágar. Este é um método clássico utilizado em testes *in vitro* (BARON e FINEGOLD, 1990).

A diluição em meio produz resultados quantitativos, ou seja a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de um microrganismo específico. O método da macrodiluição consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos, semear a bactéria ou fungo em estudo e após incubação verificar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo (BARON e FINEGOLD, 1990).

##### **4.3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Bactérias**

###### **4.3.1.1.1 Preparo dos inóculos bacterianos**

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas as cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*. As bactérias foram ativadas em tubo com caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), incubados a 35°C por 18 horas. Para o isolamento de colônias jovens, alíquotas de cada cultura ativada foi transferida para placa de petri com ágar Mueller-Hinton e incubado a 35°C por aproximadamente 24 horas. Após o período de incubação selecionou-se 3 a 4 colônias, transferindo-as para um tubo estéril contendo 5mL de solução salina (0,86%). A turvação da suspensão celular foi medida em

espectrofotômetro (SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU UV1601), lendo-se em comprimento de onda de 530nm. A solução salina estéril foi empregada como branco. Quando necessário, fez-se à diluição para alcançar a concentração desejada de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células/mL, compatível com a escala 0,5 de MacFarland. Esta solução foi então diluída para obter o inóculo com concentração entre  $5 \times 10^5$  e  $7,5 \times 10^5$  células/ mL (NCCLS, 1993; BARON; FINEGOLD, 1990).

#### **4.3.1.1.2 Avaliação da atividade antibacteriana**

Os valores da CIM foram determinados conforme descrito por NCCLS, 1993. Os compostos foram dissolvidos em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) e água na proporção de 1:1. A concentração do DMSO não ultrapassou 2% em relação ao volume total de cada experimento.

Após dissolução, os compostos foram adicionados em séries de dez frascos, em diferentes concentrações juntamente com 1mL do meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Após homogeneização da mistura e solidificação dos meios de cultura, os microrganismos previamente ativados foram inoculados nas séries correspondentes, sendo então incubados a 35°C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima através da verificação visual do crescimento microbiano. A CIM foi determinada como a mais baixa concentração do composto teste que inibiu completamente o crescimento do microrganismo.

Durante os testes foram realizados controles com solventes utilizados na solubilização dos compostos, a fim de se verificar seu efeito sobre os microrganismos testados. Os testes foram realizados em duplicata.

#### **4.3.1.1.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano

necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a bactéria. Quando os valores da CBM são comparados com a CIM, pode-se avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (BARON e FINEGOLD 1990).

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), foram selecionados os frascos que apresentaram inibição do desenvolvimento de bactérias no ensaio de CIM e as bactérias foram isoladas desses frascos e inoculadas (subcultura) em meio Mueller-Hinton isento de composto e incubados por 24 horas a 35°C. Após a incubação, as culturas foram inspecionadas através da verificação visual do crescimento microbiano.

Para a interpretação dos resultados foram considerados os seguintes critérios:

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

#### **4.3.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Fungos**

##### **4.3.1.2.1 Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes**

A metodologia para a obtenção dos inóculos foi descrita por Sartori, 2003. Os inóculos foram preparados a partir das cepas de: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*. Os fungos leveduriformes foram semeados em tubos de Sabouraud dextrosado (Merck) inclinados, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens e incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Após incubação, transferiu-se entre 4 a 5 colônias de levedura com alça estéril para um tubo estéril contendo salina a 0,85%.

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

Os inóculos foram armazenados sob refrigeração de acordo com a espécie de fungo (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* armazenados à  $-20^{\circ}\text{C}$  e *Cryptococcus neoformans* armazenados a  $-4^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.3.1.2.2 Preparo dos inóculos de fungos filamentosos

A metodologia para a obtenção dos inóculos foi descrita por Sartori, 2003. Os inóculos de fungos filamentosos foram preparados com *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Neorospira crassa*.

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

A contagem dos conídeos foi realizada em câmara de Neubauer. A seguir, foram feitas as diluições necessárias para se alcançar a concentração desejada entre  $10^5$  e  $10^6$  células/mL.

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

#### 4.3.1.2.3 Avaliação da atividade antifúngica

Os componentes da planta foram dissolvidos em solução DMSO e água (1:1). A concentração de DMSO não ultrapassou a 2% em relação ao volume total de cada experimento.

Após dissolução, os compostos foram adicionados em séries de dez frascos, em diferentes concentrações juntamente com 1mL do meio de cultura ágar Sabouraud. Após homogeneização da mistura e solidificação dos meios de cultura, os microrganismos previamente ativados foram inoculados nas séries correspondentes, sendo então incubados a temperatura ambiente por 7-15 dias para fungos filamentosos e 24-48 horas para fungos leveduriformes.

Para cada fungo testado foi adicionado dois tubos contendo somente o meio de cultura que eram os tubos controles (branco apenas com o solvente como controle positivo e um contendo 30µg/mL de cetoconazol como controle negativo). A leitura dos resultados foi válida quando observou-se o crescimento nos tubos brancos e não houve desenvolvimento fúngico no tubo que continha cetoconazol.

#### 4.3.1.3 Avaliação do possível mecanismo de ação antifúngica

O levantamento de hipóteses para a determinação do mecanismo de ação, de alguns compostos ativos presentes nas frações e compostos obtidos da *Calophyllum brasiliense*, foi realizado no laboratório do Departamento de Farmacognosia da Universidade Nacional de Rosário (Rosário -Argentina), em colaboração com a professora Suzana Zacchino via Cyted (Programa de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento).

O estudo para verificação da atividade das frações de *C. brasiliense* em inibir a parede celular fúngica, foi realizado através da observação de malformações das hifas com uso de protetor osmótico sorbitol e no ensaio da *Neurospora crassa* (SELITRENNIKOFF, 1992).

No ensaio qualitativo da *N. crassa* foi utilizado meio de cultura com a seguinte composição: 30mL de meio contendo 0,5% de protease peptona (Britania 02-0700), extrato de levedura (Britania -006-05), 4,0% sacarose (grau reagente) e 1,5% agar (Merck 1613). A mistura



resultante foi autoclavada a 115°C por 15min. O meio de cultivo foi distribuído em placas de Petri (9cm de diâmetro) e após resfriamento parcial 30µL do inóculo de esporos de *N. crassa* foi semeado e incubado à temperatura ambiente sob luz direta. Aguardou-se a solidificação do meio, e aplicou-se sobre este, discos de 0,65mm (Baxter F-2882-1). As amostras dissolvidas em DMSO foram colocadas sobre os discos (25µg/disco).

Para preparar o inóculo dos esporos de *N. crassa*, o cultivo foi feito em meio contendo 0,25% de protease peptona (Difco 0122-01) (p/p), 0,25% de extrato de levedura (p/p) 1% de sacarose (p/p) e 1,5% agar (p/p) por 4-5 dias de incubação à temperatura ambiente e luz produzindo uma coloração laranja no crescimento das hifas com esporos. O inóculo foi feito em tampão contendo 0,075g/100mL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (grau reagente) em solução de glicerol e água (15:85).

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

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

#### **4.3.2 Ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina***

O teste de citotoxicidade através do uso do microcrustáceo *Artemia salina* serve como um biomonitoramento dos extratos de plantas (SIQUEIRA *et al.*, 2001). É um método rápido, confiável e barato para determinação de citotoxicidade (SIQUEIRA *et al.*, 2001; PAYROL *et al.*, 2001).

O teste foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meyer *et al* (1982). Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial (solução de NaCl a 3,8%) e deixados em temperatura ambiente por 48 horas. Para o preparo da água marinha basta

dissolver o sal apropriado em água destilada. Manteve-se o pH da água entre 8 e 9. Para eclosão dos microcrustáceos, foi utilizada uma caixa contendo divisória, de maneira que apenas um dos lados fique iluminado para permitir, por fototropismo, a migração das larvas.

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

Após o preparo das diferentes concentrações, adicionou-se 10 larvas de *Artemia salina* em um pocinho, juntamente com o extrato e deixou-se incubar a 25°C por 24 horas. Os pocinhos foram mantidos sob iluminação.

O resultado foi obtido contando-se o número mortos e vivos em cada pocinho, através de verificação visual. O experimento foi realizado em triplicata. Como controle positivo, foi utilizado solução de dicromato de potássio nas concentrações de: 400, 600 e 800 µg/mL. O controle negativo utilizado foi realizado com 2mL de água do mar artificial. Utilizou-se o método de Probitos de análise para a obtenção das DL<sub>50</sub> e seus respectivos intervalos de confiança. Os extratos foram considerados ativos quando ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* (TAS) foi < 1000ppm.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem das plantas da flora catarinense em relação a atividade antimicrobiana

Inicialmente, foi realizada uma triagem preliminar de extratos e frações de nove diferentes plantas da flora catarinense, com o objetivo de selecionar a planta com o melhor perfil de atividade antimicrobiana. As plantas utilizadas na triagem foram *Abuta sellowana* (caule), *Calophyllum brasiliense* (raízes e folhas), *Coussapoa schottii* (folhas), *Ipomoea pes-caprae* (planta inteira), *Psychotria sp.* (caules e folhas), *Quiina sp.* (caules e folhas), *Sloanea sp.* (caules e folhas), a planta conhecida popularmente como Lírio do campo (caules, folhas e rizomas). Também foram avaliados dois compostos puros (filiceno e filicenol) isolados de *Adiantum cuneatum*.

Estas plantas foram escolhidas para pesquisa exclusivamente devido a disponibilidade de seus extratos e frações. Não foram utilizados outros critérios como informação etnofarmacológica, ensaios preliminares, quimiotaxonomia, etc. Portanto, a pesquisa foi randômica, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta, ou melhor, seus extratos e frações. Segundo Maciel *et al.*, 2002, a pesquisa conduzida através da abordagem randômica aumenta a probabilidade de “novas descobertas” de substâncias inéditas, pois a cada 10.000 diferentes tipos de plantas existe a possibilidade de obtenção entre 50.000-100.000 estruturas. As probabilidades de novas descobertas, é sem dúvida maior na seleção randômica.

Os extratos e as frações das diferentes plantas foram avaliadas quanto a sua capacidade em inibir o desenvolvimento microbiano “*in vitro*”. Foi utilizada a metodologia de diluição em ágar para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) conforme descrito nos itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2

Para o ensaio da CIM foram empregadas cepas de microrganismos representantes de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo leveduriforme.

Para classificar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações das plantas, utilizou-se os seguintes parâmetros: os extratos e/ou frações que apresentaram CIM menor que 100µg/mL foram considerados com boa atividade antimicrobiana, os que apresentaram CIM entre 100 e

500µg/mL foram considerados moderadamente ativos, quando apresentaram atividade entre 500 e 1000µg/mL foram considerados fracos e quando a CIM for maior que 1000µg/mL então o produto foi considerado inativo (HOLETZ *et al.*, 2002).

O emprego do critério anteriormente descrito se justifica devido ao fato da grande maioria dos antimicrobianos de uso clínico serem ativos contra os microrganismos sensíveis em concentração de até 10µg/mL. Segundo Mitscher *et al.* (1972), caso um composto puro não apresente atividade até a concentração de 100µg/mL, é pouco provável que esse seja um candidato a uso clínico, a menos que seja ativo contra um microrganismo resistente ou ainda seja comparativamente atóxico. Levando-se as observações de Mitscher *et al.* (1972) em consideração, bem como, que os extratos e frações de produtos naturais possam conter diversos compostos, e muitas vezes, em quantidades pequenas, os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizadas em concentrações que variaram desde 100µg/mL até 1000µg/mL.

Na prática, não foi observado dificuldade em encontrar resultados reprodutíveis utilizando este procedimento. Entretanto, os extratos e/ou frações que apresentaram atividade em concentrações superiores a 1000µg/mL ou quando a quantidade dos mesmos foi insuficiente para os ensaios, as respectivas atividades não foram detectadas pela triagem.

Durante os ensaios para a triagem, foi detectada atividade antimicrobiana para alguns extratos e/ou frações contra bactérias Gram-positivas. Os valores da CIM são apresentados na tabela 1. Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana dos compostos puros isolados de *Adiantum cuneatum* são apresentados na tabela 2. Nenhum extrato, frações ou compostos puros apresentaram atividade contra as bactérias Gram-negativas (*Enterococcus cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Salmonella tiphymurium*) e o fungo leveduriforme *Candida albicans*.

Tabela 1. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de oito plantas brasileiras contra bactérias Gram-positivas através do método de diluição em ágar.

Planta e Parte da Planta	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	B.c	S.a	S.s	St.a
<i>Abutia sellowiana</i> Caule EBM	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Calophyllum brasiliense</i> Raízes EBM	>1000	300	900	>1000
<i>Calophyllum brasiliense</i> Flores EBM	300	200	800	>1000
<i>Coussapoa schotti</i> Folhas Hexano	>1000	>1000	>1000	900
<i>Coussapoa schotti</i> Folhas DCM	>1000	>1000	>1000	600
<i>Coussapoa schotti</i> Folhas AE	>1000	150	>1000	>1000
<i>Coussapoa schotti</i> Aquosa	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Ipomoea pes-caprae</i> Planta inteira EBM	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Psychotria spp.</i> Folhas EBM	NT	>1000	NT	NT
<i>Psychotria spp.</i> Caule EBM	NT	>1000	NT	NT
<i>Quiina spp.</i> Caule EBM	NT	>1000	NT	NT
<i>Quiina spp.</i> Folhas EBM	NT	>1000	NT	NT
Lírio do Campo Rizomas EBM	>1000	>1000	>1000	600
Lírio do Campo Caule EBM	>1000	>1000	>1000	>1000
Lírio do Campo Folhas EBM	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Sloanea spp.</i> Caule EBM	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Sloanea spp.</i> Caule Hexano	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Sloanea spp.</i> Caule DCM	>1000	>1000	>1000	600
<i>Sloanea spp.</i> Caule AE	>1000	>1000	>1000	800

Legenda: *Bacillus cereus* (B.c), *Staphylococcus aureus* (S.a), *Staphylococcus saprophyticus* (S.s), *Streptococcus agalactiae* (St.a), Acetato de Etila (AE), DCM (Diclorometano), Extrato Bruto Metanólico (EBM), NT (Não testado).

Tabela 2. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos puros isolados de *Adiantum cuneatum* contra bactérias Gram-positivas através do método de diluição em ágar.

Composto	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	B.c	S.a	S.s	St.a
Filiceno	>100	>100	>100	>100
Filicenol	>100	>100	>100	>100

Legenda: *Bacillus cereus* (B.c), *Staphylococcus aureus* (S.a), *Staphylococcus saprophyticus* (S.s), *Streptococcus agalactiae* (St.a)

Como indicam os resultados, as bactérias Gram-positivas foram seletivamente inibidas pelos componentes de alguns extratos e/ou frações das plantas analisadas, com exceção dos compostos puros filiceno e filicenol, que nas concentrações testadas não apresentaram atividade antimicrobiana frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Esses resultados demonstram que na concentração testada os compostos puros não são ativos, e/ou que só poderão vir a apresentar atividade antimicrobiana quando estiverem presentes em concentrações mais elevadas, ou em sinergismo com outros compostos.

O perfil de seletividade em relação às bactérias Gram-positivas tem sido geralmente encontrado nos testes de atividade antimicrobiana com plantas (BASILE *et al.*, 2000), entretanto é um fenômeno também observado para a maioria dos agentes antimicrobianos (SCHAECHTER *et al.*, 2002). O fato de não ter sido observado atividade dos extratos e/ou frações das plantas estudadas, contra as bactérias Gram-negativas estudadas, até a concentração máxima de 1000µg/mL, pode ser explicado devido a estrutura da célula bacteriana.

A resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos tem sido associada a presença de uma membrana externa existente nesses microrganismos. Com isso o agente antimicrobiano encontra grande dificuldade de penetrar na célula, ou quando consegue a concentração não é alta o suficiente para apresentar o resultado esperado (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Os compostos hidrofóbicos apresentam dificuldade de atravessar a membrana celular externa, devido a porção polar estar situada na face externa da membrana e por outro lado, compostos hidrofílicos apresentam a mesma dificuldade para atravessar a membrana devido ao interior hidrofóbico da membrana (TAVARES, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Além disso, as bactérias Gram-negativas possuem o espaço periplasmático, onde podem ser encontradas as enzimas degradantes que inativam alguns antibióticos, como por exemplo, os beta-lactâmicos, nucleases, proteases, entre outras (TAVARES, 1999; SCHAECHTER, 2002 ).

Também tem sido demonstrado que as bactérias, sobretudo as Gram-negativas, possuem mecanismos especializados em expulsar substâncias estranhas para fora de sua célula, mecanismo esse chamado de bomba de efluxo. Esses mecanismos atuam limitando o acesso do agente antimicrobiano ao seu alvo de ação, através de uma ativa bomba de efluxo, que lança a molécula de antibiótico, para fora da célula. Esse sistema previne o acúmulo de droga no interior da célula, evitando assim que o agente antimicrobiano atinja a quantidade necessária para tornar o ambiente letal à célula, não exercendo o seu efeito (HANCOCK e BELL, 1988; NIKAIDO, 1989 e 1994; POOLE, 1994; GHANNOUM e RICE, 1999; KÖHLER, PECHÈRE, PLÉSIAT, 1999; VAN BAMBEKE, MICHOT, TULKENS, 2003).

Durante os ensaios para triagem das plantas foi observado que nenhum dos extratos, frações ou compostos puros isolados das plantas em estudo, foram ativos nas concentrações testadas contra o fungo leveduriforme *Candida albicans*.

Esses resultados vão de encontro à prevalência da resistência dos supostos agentes antifúngicos aos testes de sensibilidade com a células fúngicas. Esse fato pode ser observado devido a parede celular fúngica atuar na célula como uma barreira protetora. Essa parede pode estar impedindo a entrada dos extratos, frações e compostos, ou os mesmos podem não estar interferindo em processos que resultem na inibição da parede ou na sua mal formação. Devido a essas dificuldades a parede se mantém intacta e a viabilidade celular é mantida (SELITRENNIKOF, 1992).

De acordo com a tabela 1, pode-se evidenciar os testes de atividade antimicrobiana das plantas estudadas frente aos microrganismos Gram-positivos testados. A fração AE isolada das folhas de *C. schotti* apresentou a menor CIM quando comparada com as demais plantas em estudo. Essa concentração foi de 150µg/mL frente a bactéria *S. aureus*. Os extratos brutos de raízes e flores de *C. brasiliense* também apresentaram atividade contra *S. aureus*, porém nas concentrações de 300 e 200µg/mL respectivamente. De acordo com a classificação de Holetz *et al.*, 2002, já comentada anteriormente as plantas citadas acima apresentaram-se moderadamente ativas frente ao *S. aureus*.

Os extratos brutos metanólicos de raízes e flores de *C. brasiliense* foram os únicos que apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. saprophyticus* e *B. cereus*. O extrato bruto das raízes apresentou uma atividade antimicrobiana moderada contra *B. cereus* e o extrato bruto das raízes e flores apresentaram uma fraca atividade antimicrobiana contra *S. saprophyticus*.

*Coussapoa schotti* (folhas DCM e folhas hexano), *Sloanea spp.* (caule AE e DCM) e Lírio do Campo (rizomas EBM), foram as plantas testadas que apresentaram atividade contra *S. agalactie*, sendo esse microrganismo o mais susceptível frente aos extratos e/ou frações testadas. Frente ao microrganismo *S. agalactie*, as frações DCM das folhas de *C. schotti* e do caule de *Sloanea spp.*, juntamente com o extrato bruto metanólico dos rizomas do Lírio do Campo apresentaram fraca atividade antimicrobiana, sendo que a CIM para estes componentes foi de 600µg/mL.

A planta em estudo que apresentou melhor atividade contra um maior número de microrganismos foi a *C. brasiliense* EBM de flores, o qual foi ativo para todas as bactérias Gram-positivas testadas, seguida pelo EBM de raízes da mesma planta, que foi ativo contra

dois microrganismos (*S. aureus* e *S. saprophyticus*). As demais partes da plantas que apresentaram atividade foram ativas apenas contra um dos microrganismos Gram-positivos testados.

De acordo com esses resultados pode-se observar que os compostos isolados das frações ou extratos brutos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados foram os extratos brutos e as frações mais polares, onde pode estar a maior concentração de componentes ativos.

De acordo com as tabela 1, pode-se evidenciar que as plantas *Abutia sellowana*, *Ipomoea pes-caprae*, *Psychotria spp*, *Quiina spp.*, e os compostos puros isolados de *Adiantum cuneatum*, não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

Baseado nos resultados apresentados, a planta que apresentou os melhores resultados de atividade antimicrobiana potencialmente interessante foi a *Calophyllum brasiliense*, e por isso foi submetida a fracionamentos e isolamentos dos possíveis princípios ativos.

## **5.2 Atividade antibacteriana de *Calophyllum brasiliense***

A etapa da triagem foi muito importante para a escolha da planta com atividade antimicrobiana mais promissora. Através dos resultados preliminares obtidos (Tabela 1), foi verificado que a planta *Calophyllum brasiliense* apresentou um perfil de atividade que poderia apresentar frações e/ou compostos com potencial antimicrobiano. Além disso, estudos preliminares realizados com a *C. brasiliense* (SANTOS e SOUZA, 2000), demonstram que a planta possui atividade antimicrobiana (*S. aureus*, *S. saprophyticus*, *Microsporum canis*), reforçando a continuação de investigações químicas e microbiológicas a fim de identificar os princípios ativos da planta.

Diante dos promissores efeitos biológicos desta planta, paralelamente desenvolveu-se um estudo fitoquímico sendo esse tema da dissertação da mestrandia Daniela Buffon Isaias.

A *Calophyllum brasiliense* foi separada em raízes, caules, folhas, flores e frutos e cada parte foi submetida à extração conforme descrito no item 4.1.2 , para a obtenção dos respectivos extratos brutos metanólicos. Com exceção do extrato bruto das flores, devido ao seu baixo



rendimento, cada extrato bruto foi fracionado por partição, fornecendo uma fração polar (não solúvel em clorofórmio) e outra fração apolar (solúvel em clorofórmio).

O EBM de flores não foi particionado em fração apolar e polar devido ao baixo rendimento de extração do material de partida (flores).

Os extratos brutos metanólicos de diferentes partes de *C. brasiliense* e suas respectivas frações foram submetidos à avaliação de atividade antimicrobiana pelo método de diluição em ágar, conforme descrito no item 4.3.1.

Os valores de CIM dos extratos de *C. brasiliense* e suas respectivas frações são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* através do método de diluição em ágar.

Composto	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	Bactéria Gram-positiva				Bactéria Gram-negativa					
	B.c	S.a	S.s	St.a	E.co	E.c	P.m	Ps.a	S.t	
Frutos EBM	>1000	>1000	>1000	1000	NT	>1000	NT	NT	NT	
Frutos Apolar	>1000	150	700	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Frutos Polar	>1000	500	1000	700	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Raízes EBM	>1000	300	900	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Raízes Apolar	>1000	300	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Raízes Polar	400	400	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Folhas EBM	900	300	500	700	NT	>1000	NT	NT	NT	
Folhas Apolar	400	300	900	$\leq 100$	NT	>1000	NT	NT	NT	
Folhas Polar	1000	600	700	700	NT	>1000	NT	NT	NT	
Flores EBM	300	200	800	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Caules EBM	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Caule Apolar	>1000	300	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	
Caules Polar	600	600	400	500	NT	>1000	NT	NT	NT	

Legenda: Extrato Metanólico Bruto (EBM), *Bacillus cereus* (B.c), *Staphylococcus aureus* (S.a), *Staphylococcus saprophyticus* (S.s), *Streptococcus agalactiae* (St.a), *Enterobacter cloacae* (E.co), *Escherichia coli* (E.c), *Proteus mirabilis* (P.m), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps.a), *Salmonella tiphyrium* (S.t), NT (Não testado).

Conforme pode ser observado na tabela acima, os EBM de raízes, folhas, frutos e flores apresentaram atividade contra dois ou mais tipos de bactérias Gram-positivas. Assim como ocorreram nos ensaios preliminares, quando os EBM e/ou suas frações foram ativos, essa ação foi seletiva para bactérias Gram-positivas. O motivo da ação seletiva dos EBM e/ou suas frações é o mesmo já descrito anteriormente para a triagem das plantas.

Alguns EBM (frutos, folhas) e frações (folhas apolar e polar, caulas polar), não foram testados contra algumas bactérias Gram-negativas devido a quantidade insuficiente de extratos e frações.

O EBM do caule de *C. brasiliense* não apresentou atividade contra nenhuma bactéria estudada, entretanto, foi observada atividade nas duas frações testadas (polar e apolar). Isto pode ser justificado pelo fato das frações apresentarem concentração maior dos componentes ativos e/ou menor interferência de outros componentes não ativos.

Os EBM das folhas e flores de *C. brasiliense* foram os extratos que apresentaram maior espectro de ação, inibindo todos os microrganismos Gram-positivos testados (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. agalactie*).

As frações polar e apolar de EBM das folhas, assim como o extrato bruto, também foram ativos contra todas as bactérias Gram-positivas testadas. Sendo observado inclusive, valores de CIM menores para a fração apolar contra as bactérias *B. cereus*, *S. aureus* e *S. agalactie*, por outro lado a CIM foi maior contra *S. saprophyticus*, sugerindo a possibilidade da presença de mais que um componente ativo no extrato e com atividades distintas contra as bactérias testadas.

A bactéria que se mostrou mais susceptível aos extratos e frações de *C. brasiliense* foi o *S. aureus*, seguida por *S. saprophyticus*, *S. agalactie* e *B. cereus*. A fração que apresentou menor CIM (150µg/mL) frente a *S. aureus* foi a fração dos frutos apolar.

Os extratos e frações de *C. brasiliense* que apresentaram atividade contra um maior número de bactérias testadas foram respectivamente: frações apolares de raízes e caules (ativas contra uma bactéria); fração apolar dos frutos, extrato bruto metanólico e fração polar das raízes (ativas contra duas bactérias); fração polar dos frutos (ativa contra três bactérias); extrato bruto metanólico das folhas, flores e caules, fração apolar das folhas, frações polares das folhas e caules (ativas contra quatro bactérias).

Quando compara-se atividade antimicrobiana levando-se a polaridade das frações em consideração (tabela 3), observa-se que as frações polares demonstraram maior frequência de

atividade antimicrobiana, ou seja, em doze testes de sensibilidade enquanto que as frações apolares foram ativas em oito testes. Porém as frações apolares apresentaram CIM menores que as frações polares, sendo que cinco delas situaram-se entre 100 e 300µg/mL, uma fração entre 400 e 600µg/mL, e duas entre 700 e 900µg/mL. Já a fração polar não apresentou nenhuma atividade entre 100 e 300µg/mL, oito delas estavam entre 400 e 600µg/mL, três entre 700 e 900µg/mL e uma com 1000µg/mL. Esses resultados indicam, que as substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana da planta podem estar presentes tanto na fração polar quanto na apolar e/ou, compostos das duas polaridades podem apresentar atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas.

Como os resultados demonstraram, todas as partes testadas de *C. brasiliense* apresentaram alguma atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas testadas, confirmando outros relatos e justificando a razão pela qual plantas do gênero *Calophyllum*, têm sido utilizadas pela população para o tratamento de diversas patologias relacionadas aos processos infecciosos (REYES-CHILPA *et al.*, 1997; DWECK e MEADOWS, 2002).

As principais classes de compostos presentes em plantas do gênero *Calophyllum* são xantonas, cumarinas, flavonóides e triterpenos (LOCKSLEY e MURRAY, 1969; POTTI e KURUP, 1970; DHARMARATNE *et al.*, 1999b; GONZALEZ *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2002; KHAN, KIHARA, OMOLOSO, 2002; SAKAGAMI *et al.*, 2002; ABE *et al.*, 2004).

Extratos obtidos de diversas partes de espécies da família Clusiaceae, como a *Calophyllum*, apresentaram xantonas como uma das classes de substâncias de interesse fitoquímico (LOCKSLEY e MURRAY, 1969; DHARMARATNE e WANIGASEKERA, 1996; DHARMARATNE e WIJESINGHE, 1997; DHARMARATNE *et al.* 1998; JANTAN, JALIL, WARIF, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003). As xantonas são conhecidas por suas propriedades antimicrobianas, principalmente contra o microrganismo *S. aureus* e *S. aureus* resistente a meticilina (GOH *et al.*, 1992; DHARMARATNE *et al.*, 1999a; SIMÕES *et al.*, 1999; KIJOA *et al.*, 2000).

Os flavonóides encontrados no gênero também podem estar relacionados com a eficácia da planta contra bactérias patogênicas (CECHINEL FILHO, 2000). A classe fitoquímica dos flavonóides é conhecida por suas propriedades antibacterianas (ZACCHINO *et al.*, 1998; COWAN, 1999) e antifúngicas (GOH *et al.*, 1992). Devido a sua polaridade é possível que estejam correlacionados com a atividade antibacteriana dos extratos polares, como raízes EB,

raízes polar, flores EB, folhas EB, frutos polar, caules polar e folhas polar.

Os terpenos de um modo geral são ativos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (HERNANDEZ-PEREZ *et al.*, 1994; COWAN, 1999). Em 1977, foi relatado que 60% de derivados de óleos essenciais inibiram o crescimento de fungos, enquanto 30% inibiram o crescimento de bactérias (COWAN, 1999).

O ácido hidroxicinâmico, relacionado com as cumarinas possui conhecida ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (COWAN, 1999).

Além dos extratos e frações de *C. brasiliense*, testou-se também compostos puros isolados da planta. Na tabela 4 são apresentados os resultados de atividade antimicrobiana de seis compostos isolados de *C. brasiliense*.

Tabela 4. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos puros isolados de *Calophyllum brasiliense* através do método de diluição em ágar.

Composto	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	Bactéria Gram-positiva				Bactéria Gram-negativa					
	B.c	S.a	S.s	St.a	E.co	E.c	P.m	Ps.a	S.t	
1,5 dihidroxixantona	700	200	200	500	800	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Ácido Brasiliênsico	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Ácido Gálico	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Ácido Protocatético	500	200	200	200	400	400	500	800	700	
Epicatequina (-)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Friedelin	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Amoxicilina	NT	NT	NT	NT	NT	6	NT	NT	1	
Vancomicina	0,7	2	2	0,8	NT	NT	NT	NT	NT	

Legenda: Extrato Metanólico Bruto (EMB), *Bacillus cereus* (B.c), *Staphylococcus aureus* (S.a), *Staphylococcus saprophyticus* (S.s), *Streptococcus agalactiae* (St.a), *Enterobacter cloacae* (E.co), *Escherichia coli* (E.c), *Proteus mirabilis* (P.m), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps.a), *Salmonella tiphymurium* (S.t), NT (Não testado).

O composto 1,5 dihidroxixantona apresentou seletividade para bactérias Gram-positivas assim como para a maioria dos compostos, entretanto também foi detectada fraca atividade contra *E. coli*. O ácido brasiliênsico foi testado somente até a concentração de  $100\mu\text{g/mL}$  devido ao baixo rendimento de obtenção e foi demonstrado, que esse composto não possui atividade

antibacteriana até esta concentração. O ácido protocatético apresentou atividade contra todos os microrganismos testados: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os demais compostos puros epicatequina, ácido gálico, e friedelin, não apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados até a concentração de 1000µg/mL

Considerando-se as observações de Mitscher *et al.* (1972), um composto puro que não apresente atividade até a concentração de 100µg/mL, dificilmente será empregado para uso clínico, devido a grande concentração necessária para que ele exerça sua atividade biológica. Os resultados apresentados na tabela 4, demonstram que alguns dos compostos puros isolados de *C. brasiliense* testados são ativos, porém em concentrações superiores aos recomendados por Mitscher. A xantona (1,5 dihidroxixantona), juntamente com o ácido protocatético provavelmente participam da atividade antimicrobiana global detectada na planta, entretanto outros compostos que não foram isolados podem também estar relacionados com atividade, inclusive com maior potência. No entanto, os compostos isolados podem ser alvo de estudos futuros de modificação molecular, podendo gerar derivados com maior potencial antimicrobiano.

Na tabela 5, podemos evidenciar os resultados da atividade bactericida da planta em estudo. Os extratos e/ou frações utilizados nesse teste foram aqueles que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de CIM. Para o teste da concentração bactericida mínima (CBM), foi utilizada a metodologia descrita no item 4.3.1.1.3.

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana. Agentes antimicrobianos que possuem ação bactericida, causam danos irreversíveis as bactérias. Os agentes que são conhecidos como bacterostáticos, atuam inibindo o crescimento bacteriano, prevenindo a sua multiplicação mas não causando a sua morte (BARON e FINEGOLD, 1990).

Devido ao fato da CBM ser realizada somente se a amostra apresentar atividade antimicrobiana mensurável pela CIM, foram realizadas análises somente contra os microrganismos que foram sensíveis, ou seja, as bactérias *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. agalactie*, e *B. cereus*.

O critério empregado para interpretação dos resultados foi o crescimento do microrganismo no meio de cultura que significou ação bacteriostática e ausência de crescimento que significou ação bactericida.

Tabela 5. Resultados de Concentração Bactericida Mínima (CBM em  $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* através do método de diluição em ágar.

Composto	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	B.c	S.a	S.s	St.a
Frutos EBM	NT	>1000	>1000	1000
Frutos Apolar	>1000	250	>1000	800
Raízes Polar	500	600	>1000	>1000
Raízes EBM	>1000	500	900	>1000
Raízes Apolar	>1000	500	>1000	>1000
Folhas EBM	NT	300	700	900
Folhas Apolar	NT	500	900	200
Folhas Polar	NT	700	900	1000
Flores EBM	500	700	1000	1000
Caules Polar	NT	600	500	700

Legenda: EBM= Extrato Bruto Metanólico, B.c = *Bacillus cereus*, S.a = *S. aureus*, S.s = *S. saprophyticus*, St.a = *S. agalactie*, NT = Não Testado

O perfil de atividade verificado com a CIM (ação bacteriostática) para aos EBM e suas frações foi semelhante para a CBM (ação bactericida).

Os compostos polar e apolar das folhas de *C. brasiliense* apresentaram CBM de 700, 1000, 900 e 500, 200 e 900 $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para os microrganismos *S. aureus*, *S. agalactie* e *S. saprophyticus*. O extrato bruto apresentou CBM de 300, 900 e 700 $\mu\text{g/mL}$  para os mesmos microrganismos. Como pode ser observado, as folhas de *C. brasiliense* apresentaram os melhores resultados, assim como aconteceu na determinação da CIM.

Os resultados das CBM, assim como os da CIM evidenciam a possibilidade de mais de um componente ativo estar presente nos EBM e/ou frações, e esse componente pode apresentar atividades distintas contra as bactérias testadas.

Os resultados dos testes de Concentração Bactericida Mínima dos compostos mais ativos, refletem com maior precisão o potencial microbicida de extratos e frações isolados de plantas.

### 5.3 Atividade antifúngica de *Calophyllum brasiliense*

Existe um consenso geral de que são necessários novos agentes antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo mais seguros. Para uso humano, existem limitadas opções terapêuticas. Primeiramente, devemos lembrar de que a célula fúngica é uma célula eucariótica, então o composto pode ser tóxico tanto para o microrganismo patogênico quanto para o paciente (GUNJI, ARIMA, BEPPU, 1983; FROST *et al.*, 1995; ZACCHINO *et al.*, 1998; ZACCHINO *et al.*, 2003).

Com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos e imunocomprometidos que desenvolvem patologias oportunistas, ocorreu um aumento da utilização de agente antimicóticos. Sabe-se que seu uso é limitado, tendo em vista a sua toxicidade e seu tempo de tratamento prolongado. A toxicidade dos agentes antifúngicos existentes atualmente, pode ser atribuída a baixa seletividade de ação. Ou seja, as diferenças entre as células eucarióticas do hospedeiro e do patógeno fúngico são menores quando comparadas com as diferenças entre as bactérias. Por isso, a maioria dos agentes antifúngicos, atuam também no funcionamento da célula do hospedeiro, ou seja, possuem baixa seletividade. Estes fatores levam a uma busca por antimicóticos mais efetivos, menos tóxicos e preferencialmente mais baratos (GALGIANI, 1987; RAHALISON *et al.*, 1991 e 1994; FREIXA *et al.*, 1998; GIORDANI *et al.*, 1999, ZACCHINO *et al.*, 1999; HADACEK; GREGER, 2000; ZACCHINO *et al.*, 2003).

Os EBM de diferentes partes de *C. brasiliense* e suas respectivas frações foram submetidos a avaliações de atividade antifúngica pelo método de diluição em agar, conforme descrito no item 4.3.1.2.

Conforme já discutido anteriormente, considera-se ação antifúngica compostos que forem ativos nas concentrações entre 100 e 1000 µg/mL. Os valores de CIM dos extratos e as respectivas frações de *C. brasiliense* são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* contra fungos dermatófitos através do método de diluição em ágar.

Compostos	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	E.f	M.c	M.g	T.m	T.r	T. to
Frutos EBM	$\leq 1000$	1000	$>1000$	$\leq 1000$	$>1000$	$>1000$
Frutos Apolar	$<1000$	500	1000	$\leq 250$	1000	500
Raiz EBM	$>1000$	$>1000$	$>1000$	NT	700	500
Raiz Apolar	$<1000$	$>1000$	$>1000$	1000	$>1000$	$>1000$
Raiz Polar	$>1000$	$>1000$	$>1000$	NT	$>1000$	500
Folhas Apolar	$\leq 750$	$>1000$	$>1000$	$>1000$	$>1000$	$>1000$
Folhas Polar	$>1000$	$>1000$	$>1000$	$>1000$	$>1000$	$>1000$
Flores EBM	NT	$>1000$	$>1000$	NT	NT	500
Caules Apolar	$\leq 750$	$>1000$	$>1000$	$>1000$	$>1000$	500
Caules Polar	$\leq 750$	$>1000$	$>1000$	250	250	$>1000$

Legenda: Extrato Bruto Metabólico (EBM), *Epidermophyton floccosum* (E.f), *Microsporium canis* (M.c), *Microsporium gypseum* (M.g), *Trichophyton metagrophytes* (T.m), *Trichophyton rubrum* (T.r), *Trichophyton tonsurans* (T. to), NT= Não testado

Conforme pode ser evidenciado na tabela 6, os EBM de frutos, raízes e flores apresentaram atividade contra um ou mais de um fungo dermatófito. Os EBM das folhas e dos caules não foram submetidos aos testes de atividade antifúngica devido a quantidade insuficiente de extrato. O EBM das raízes foi o extrato que apresentou maior espectro de ação, inibindo dois microrganismos com CIM de 700 e 500  $\mu\text{g/mL}$  contra *T. rubrum* e *T. tonsurans* respectivamente.

A fração apolar dos frutos foi a fração que apresentou melhor perfil de atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de todos os fungos testados, seguida pela fração caules polar que inibiu o crescimento de três microrganismos. Esses resultados demonstram, assim como nos testes de atividade antibacteriana, a possibilidade da presença de mais de um componente ativo nas frações testadas.

Diferente da atividade antibacteriana, na atividade antifúngica as frações das folhas não apresentaram destacada atividade antimicrobiana, evidenciando que as folhas apresentam seletividade de ação bacteriana.



O fungo que se mostrou mais susceptível aos extratos e frações de *C. brasiliense* foi o *E. floccosum*, seguido de *T. metagrophytes* e *T. tonsurans*.

Os componentes mais ativos contra os fungos dermatófitos foram fração dos frutos apolar, raízes polar, EB das raízes, caules apolar, caules polar, folhas apolar e flores EB. Diferente da atividade antibacteriana, na atividade antifúngica os compostos apolares se mostraram mais ativos contra os microrganismos testados.

De acordo com a tabela 7, pode-se evidenciar que foram testados também, cinco compostos puros isolados de *C. brasiliense* (ácido brasiliênsico, ácido gálico, ácido protocatético epicatequina e friedelina). Os compostos que apresentaram atividade foram epicatequina, com CIM de 50µg/mL contra *T. tonsurans* e o ácido brasiliênsico, com CIM de 10µg/mL contra *T. tonsurans*. Devido a quantidade insuficiente de compostos puros, os mesmos não foram testados para *M. canis* e *T. metagrophytes*. Com esses resultados verificamos que apenas o ácido brasiliênsico e a epicatequina, parecem estar influenciando na atividade antifúngica dos extratos e frações, levando em consideração que apresentaram atividade contra esses microrganismos. Os demais compostos, quando testados isoladamente não demonstraram ação antifúngica. Pode-se sugerir também, que o efeito só ocorra quando em sinergismo com outros compostos, ou que esses compostos nessas concentrações não sejam responsáveis pelas ações antifúngicas.

Tabela 7. Resultados de Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) de compostos puros isolados de *Calophyllum brasiliense* contra fungos dermatófitos pelo método de diluição em ágar.

Compostos	Microrganismos – CIM (µg/mL)					
	E.f	M.c	M.g	T.m	T.r	T. to
Ácido Brasiliênsico	>100	NT	>100	NT	>100	10
Ácido gálico	>100	NT	>100	NT	>100	>100
Ácido Protocatético	>100	NT	>100	NT	>100	>100
Epicatequina	>100	NT	>100	NT	>100	50
Friedelin	>100	NT	>100	NT	>100	>100

Legenda: *Epidermophyton floccosum* (E.f), *Microsporium canis* (M.c), *Microsporium gypseum* (M.g), *Trichophyton metagrophytes* (T.m), *Trichophyton rubrum* (T.r), *Trichophyton tonsurans* (T. to), NT= Não testado

De acordo com os resultados das tabelas 6 e 7, podemos observar a atividade antifúngica de *C. brasiliense*, principalmente contra fungos dermatófitos. Dermatófitos são um grupo de fungos que possuem a capacidade de invadir tecidos queratinizados, produzindo uma patologia característica, a dermatofitose. Essa infecção é geralmente cutânea, porque os dermatófitos não possuem capacidade de penetrar nos tecidos mais profundos. As manifestações clínicas causadas pelos dermatófitos são conhecidas por tineas (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Na tabela 8 podemos evidenciar os resultados da determinação da CIM de extratos e/ou frações de *C. brasiliense* contra leveduras.

Tabela 8. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos e frações de *Calophyllum brasiliense* contra leveduras pelo método de diluição em ágar.

Compostos	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	C.a	C.t	C. neo
Frutos EBM	>1000	>1000	>1000
Frutos Apolar	>1000	>1000	$\leq 100$
Raiz EBM	>1000	NT	>1000
Raiz Apolar	>1000	>1000	>1000
Raiz Polar	>1000	NT	>1000
Folhas Apolar	>1000	>1000	>1000
Folhas Polar	>1000	>1000	>1000
Flores EBM	>1000	>1000	>1000
Caules Apolar	>1000	>1000	>1000
Caules Polar	>1000	>1000	>1000

Legenda: Extrato Bruto Metanólico (EBM), C.a= *Candida albicans*, C.t= *Candida tropicalis*, C.neo= *Cryptococcus neoformans*, NT= Não Testado

De acordo com a tabela 8, pode-se evidenciar que apenas a fração frutos apolar foi ativa contra *C. neoformans*, apresentando uma CIM  $\leq 100\mu\text{g/mL}$ . Essa atividade é considerada promissora, tendo em vista que o *C. neoformans*, acomete muito pacientes imunodeprimidos, causando principalmente meningite. Os demais extratos e frações não foram ativos contra

nenhuma das leveduras testadas.

Esses resultados demonstram a dificuldade em se encontrar agentes antifúngicos e a necessidade do desenvolvimento de estratégias (SELITRENNIKOFF, 1992) e pesquisas incessantes com plantas com finalidades medicinais.

De acordo com a tabela 9, os compostos puros isolados de *C. brasiliense*, assim como seus extratos e frações não foram ativos contra os microrganismos testados. Com isso pode-se sugerir novamente, que os mesmos nessas concentrações testadas não sejam responsáveis pela atividade da fração frutos apolar, ou que exista um efeito sinérgico. Os compostos só exercem sua ação quando estão em associados a outros compostos. O mesmo aconteceu quando os compostos puros foram testados contra o fungo oportunista *Fusarium spp.*

Tabela 9. Resultados de Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de compostos puros isolados de *Calophyllum brasiliense* contra leveduras através do método de diluição em ágar.

Compostos	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	C.a	C.t	C. neo
Ácido Brasiliênsico	>100	>100	>100
Ácido gálico	>100	>100	>100
Ácido protocatético	>100	>100	>100
Epicatequina	>100	>100	>100
Friedelin	>100	>100	>100

Legenda: C.a= *Candida albicans*, C.t= *Candida tropicalis*, C.neo = *C.riptococcus neoformans*, NT= Não Testado

Na tabela 10, pode-se evidenciar a atividade de extratos e frações de *C. brasiliense* contra fungos oportunistas. Nenhum dos EBM testados apresentou atividade antifúngica frente aos fungos oportunistas testados. As únicas frações que apresentaram atividade foram fração apolar dos frutos contra *Fusarium spp*, frações apolar e polar dos caules contra *A. fumigatus*, e fração polar das folhas com contra *A. flavus*. Alguns compostos não foram testados para todos os microrganismos devido a quantidade insuficiente de composto.

Tabela 10. Resultados da Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos, frações de *Calophyllum brasiliense* contra alguns fungos oportunistas através do método de diluição em ágar.

Compostos	Microrganismos – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	A.fl	A.fu	A.n	Fu	S.c
Frutos EBM	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Frutos Apolar	>1000	>1000	>1000	$\leq 100$	>1000
Raiz EBM	NT	NT	NT	>1000	NT
Raiz Apolar	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Raiz Polar	NT	NT	NT	>1000	NT
Folhas Apolar	>1000	>1000	>1000	NT	>1000
Folhas Polar	250	>1000	>1000	NT	>1000
Flores EBM	NT	NT	NT	>1000	NT
Caules Apolar	>1000	250	>1000	NT	>1000
Caules Polar	>1000	250	>1000	NT	>1000

Legenda: A.fl= *Aspergillus flavus*, A.fu= *Aspergillus fumigatus*, A.n= *Aspergillus niger*, Fu = *Fusarium spp.*, S.c= *Saccharomyces cerevisiae*

NT= Não testado.

Conforme pode ser evidenciado nas tabelas 8 e 10, as frações que apresentaram melhor atividade antifúngica foram as frações apolares, demonstrando que os compostos apolares penetram mais facilmente na membrana citoplasmática dos fungos composta principalmente por esteróis (TAVARES, 1999).

Os extratos e frações de *C.brasiliense* que apresentaram atividade contra um maior número de fungos testados foram respectivamente: extrato bruto metanólico das flores, frações apolar e polar das folhas e fração polar das raízes (ativas contra um fungo), extrato bruto metanólico e fração apolar das raízes (ativas contra dois fungos), extrato bruto metanólico dos frutos e fração apolar dos caules (ativas contra três fungos), fração polar dos caules (ativa contra quatro fungos) e fração apolar dos frutos (ativa contra oito fungos).

Segundo Ito *et al.* (2002), os principais constituintes da planta *C. brasiliense* são cumarinas, flavonóides, chalconas, benzofuranos e triterpenos.

Pesquisas indicam que o caule da espécie de *Calophyllum* contém uma grande quantidade de xantonas e flavonóides, enquanto as folhas possuem em sua composição cumarinas, benzopiranos e triterpenos (REYES-CHILPA, JIMENEZ-ESTRADA, ESTRADA-MUNIZ, 1997).

As xantonas são compostos que já possuem estudos que relatam sua atividade antifúngica (REYES-CHILPA, JIMENEZ-ESTRADA, ESTRADA-MUNIZ, 1997; KHAN, KIHARA, OMOLOSO, 2002; MOREL *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002; HAY *et al.*, 2003), atividade protetora de câncer (ITO *et al.*, 2002) e imunomodulatória (GONZALEZ *et al.*, 1999).

Compostos fenólicos hidroxilados como no caso das xantonas, têm-se mostrado ativos contra microrganismos. O número e a posição dos grupamentos OH no anel fenólico estão relacionados com sua atividade. Existem evidências que o aumento de hidroxilações resulta em aumento da toxicidade para célula microbiana e quanto mais oxidados os compostos, maior é o efeito inibitório. Os mecanismos que podem ser responsáveis pela toxicidade podem atuar inibindo processos enzimáticos através de oxidação. Essa oxidação pode ocorrer em grupamentos sulfidril ou através de interações com proteínas (COWAN, 1999).

A procura por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico em cumarinas e xantonas, pelo fato dessas substâncias demonstrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e serem de baixa toxicidade para mamíferos (SIMÕES *et al.*, 2002).

Lopes, Kato e Yoshida (1998), observaram a atividade antifúngica de flavonóides isolados de plantas, que apresentaram ação 10 vezes mais potente que a nistatina. A atividade antimicrobiana de flavonóides é provavelmente devido a sua habilidade de se complexar com proteínas e com a parede celular do microrganismo. Quanto mais lipofílico for o flavonóide, mais facilmente pode ocorrer a atividade antifúngica. Plantas em resposta a infecções causadas por microrganismos sintetizam flavonóides, e quando testados *in vitro* apresentam ação antimicrobiana (COWAN, 1999; SOMCHIT *et al.*, 2003).

Em relação as folhas de *C. brasiliense* observa-se a presença de cumarinas, flavonóides e triterpenos. O mecanismo de ação antifúngica dos compostos terpênicos ainda não está elucidado,

mas existem relatos de que envolva a ruptura de membrana. O comportamento anfótero de saponinas, e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas, pode ser responsável pela ação antimicrobiana. Essa ação pode ser devido a alteração da permeabilidade da membrana e sua posterior destruição (AVATO *et al.*, 1997; COWAN, 1999; GUILLET *et al.*, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003).

Devido a composição da célula fúngica ser muito semelhante a célula do seu hospedeiro, a maioria dos agentes antifúngicos utilizados atualmente são tóxicos também para o homem. Por isso a importância do estudo do mecanismo de ação dos agentes antifúngicos que serão utilizados na terapêutica (ZACCHINO *et al.*, 1998).

Um dos ensaios para verificar possível mecanismo de ação antifúngica é a *Neorospira crassa*. O ensaio da *N. crassa* é um método que permite avaliar macroscopicamente inibidores da parede celular fúngica. Quando se pesquisa um novo agente antifúngico, o ideal é que esse composto atue somente à nível de célula fúngica, ou seja seja seletivo e menos tóxico para célula hospedeira.

As frações das folhas frutos e raízes de *C. brasiliense* foram avaliadas quanto ao seu mecanismo de ação fúngico. Foi utilizada a metodologia da *N. crassa* conforme descrito no item 4.3.1.3. Os ensaios só foram realizados com algumas frações devido a quantidade insuficiente de compostos.

De acordo com a tabela 11 podemos evidenciar que os compostos testados no ensaio da *N. crassa* não foram ativos, podendo assim indicar que o mecanismo de ação desses compostos podem ser outro que não o de inibição de parede celular.

O ideal para um antifúngico que exerça sua ação através da inibição da síntese do ergosterol, é a inibição de enzimas específicas para a sua formação. Após o zimosterol a rota sintética do ergosterol difere do colesterol. Se o agente antifúngico atuar em uma enzima conversora de zimosterol em 24-metilzimosterol, ou de 24-metilzimosterol em ergosterol ele será específico para célula fúngica e possivelmente apresentará efeitos colaterais reduzidos (ZACCHINO *et al.*, 2003).

Tabela 11. Resultados obtidos com *C. brasiliense* pelo método da *Neorospora crassa*, para evidenciar possível mecanismo de ação da atividade antifúngica.

<b>Composto</b>	<b>Ensaio de <i>N. crassa</i></b>
Frutos polar	Não inibe
Raiz apolar	Não inibe
Folhas polar	Não inibe
Cetoconazol	Halo claro

#### 5.4 Teste de citotoxicidade com *Artemia salina*

Tabela 12. Teste de toxicidade para *Artemia salina* das frações isoladas de *Calophyllum brasiliense*

<b>Tipo de Extrato</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
Frutos Apolar	>1000
Raízes Polar	>1000
Folhas polar	>1000
Flores EBM	>1000

Inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (NOLDIN *et al.*, 2003).

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes. A simplicidade do bioensaio favorece sua utilização rotineira (SIQUEIRA *et al.*, 2001). Para a realização do ensaio de citotoxicidade, selecionou-se um composto isolado de cada parte da planta. Conforme demonstrado na tabela 12, observou-se que nenhum dos compostos

testados apresentou atividade citotóxica frente a *Artemia salina*.

Diversos trabalhos correlacionam a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras (SOLIS *et al.*, 1993; SIQUEIRA *et al.*, 1998 e 2001; ALVES *et al.*, 2000; KANEGUSUKU *et al.*, 2002; PAYROL *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003). Parra *et al* (2001), utilizaram o teste com *Artemia salina* como um teste preliminar para avaliar a toxicidade do composto.

Extrato e frações de diferentes partes da planta foram testados quanto a sua toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Foi utilizada a metodologia descrita no item 4.3.2.

O estudo de *Calophyllum brasiliense*, citado acima, demonstrou que os compostos não possuem ação citotóxica sobre as células, o que é indispensável no caso de um tratamento seguro (PARRA *et al.*, 2001).

Esses compostos apresentaram-se inativos para o microcrustáceo, mas com atividade antimicrobiana considerável. Caso os compostos acima testados continuem sendo estudados, sugere-se que se identifique o(s) componente(s) das frações e se realizem modificações estruturais na molécula, conduzindo a produtos com atividade mais significativa (SIQUEIRA *et al.*, 2001).



## 6 CONCLUSÕES

1. Através da triagem com as plantas da flora catarinense estudadas (*Abuta sellowana*, *Calophyllum brasiliense*, *Coussapoa schottii*, *Ipomoea pes-caprae*, *Psychotria spp.*, *Quiina spp.*, *Sloanea spp.*, a planta conhecida popularmente como Lírio do campo e os compostos puros filiceno e filicenol isolados de *Adiantum cuneatum*), observou-se que as plantas que apresentaram atividade antimicrobiana foram *Calophyllum brasiliense*, *Coussapoa schottii*, Lírio do Campo, *Sloanea spp.*

2. A planta que apresentou melhor potencial de atividade antimicrobiana foi a *Calophyllum brasiliense*.

3. Os extratos e frações de *C. brasiliense* apresentaram atividade seletiva contra bactérias Gram-positivas e contra fungos dermatófitos e um leveduriforme.

4. Os menores valores de CIM encontrados na planta *C. brasiliense* foram na fração apolar das folhas (CIM de  $\leq 100\mu\text{g/mL}$ ) contra a bactéria *Streptococcus agalactie* e na fração apolar dos frutos (CIM de  $\leq 100\mu\text{g/mL}$ ) contra a levedura *Criptococcus neoformans*.

5. Os compostos puros isolados de *C. brasiliense*, 1,5 dihidroxixantona e o ácido protocatético apresentaram atividade antibacteriana frente as bactérias testadas, e os compostos puros epicatequina e ácido brasiliênsico apresentaram atividade frente a fungos dermatófitos.

6. O extrato bruto metanólico das flores de *C. brasiliense* e as frações polar das folhas e raízes e apolar dos frutos, não apresentaram citotoxicidade frente a *Artemia salina*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUNIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHIPLA, R. Trypanocidal constituents in plants, leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 141-143, 2004.

ADEBAJO, A.C.; OLOREK, K.J.; ALADESANMI, A.J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v. 15, p. 451-455, 1989.

ALI, M.S.; PERVEEN, S.; RIZWANI, G.H.; AHMAD, V.U. Screening for the antimicrobial properties of the leaves of *Calophyllum inophyllum* Linn. (Guttiferae). **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 21, n. 2, p. 359-361, 1999a.

ALI, M.S.; MAHMUD, S.; PERVEEN, S.; AHMAD, V.U.; RIZWANI, G.H. Epimers from leaves of *Calophyllum inophyllum*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1385-1389, 1999b.

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.

AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINO, J.S.; SILVA, L.R.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**, v. 15, n. 1-3, p. 66-69, 2003.

AVATO, P.; VITALI, C.; MONGELLI, P.; TAVA, A. Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives. **Planta Medica**, v. 63, p. 503-507, 1997.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Bailey & Scott's – Diagnostic microbiology**, 8 ed. The C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J.A.; COBIANCHI, C.R. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1479-1482, 1999.

BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRERA, S.; MONTESANO, D.; COBIANCHI, C.R.; VUOTTO, M.L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p. 110-116, 2000.

BHAT, S.G.; KANE, J.G.; SREENIVASAN, A. The *in vitro* evaluation of the antibacterial activity of undi oil (*Calophyllum inophyllum* Linn.). **Journal American Pharmaceutical Association (Baltim)**, v. 43, p. 543-546, 1954.

BLACK, J. **Microbiology: Principles and Applications**, 3 ed. Prentice Hall: New Jersey, 1996.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 53-67, 1993.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica e Farmacognosia**, Zaragoza: Editorial Acribia, 1995.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

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

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: **Plantas Medicinais sob a Ética da Química Medicinal**, Editora Argos, Chapecó, 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 Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional Ed., Rio de Janeiro, Brazil (in Portuguese), 1978.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 537-541, 2002.

DAVISE, H.L. **Medically Important Fungi: A guide to identification**. 2 ed. Nova Iorque: Elsevier, 1987.

DAS DORES, R.G.R.; VIANA, L.O.; PEREIRA, L.E.; PEDROSA, C.D.; SILVA, R.R.; PINHEIRO, A.C.N.; NASCIMENTO, C.B.; SILVA, D.C.O.; CAMPOS, G.B.W.; BORGES, J.; ALMEIDA, J.C.S.; FREITAS, L.S.; SILVA, L.C.; FONTES, S.D.; PEREIRA, T.M.C.; MIRANDA, T.M. Fitoterapia e alopatia: a atenção farmacêutica “verde”. **Infarma**, v. 15, n. 1-3, p. 62-65, 2003.

DA SILVA, K.L.; SANTOS, A.R.S.; MATTOS, P.E.O.; YUNES, R.A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Thérapie**, v. 56, p. 431-434, 2001.

DE CAMPOS, M. P., CECHINEL FILHO, V., SILVA, R. R., YUNES, R. A., MONACHE, F. D., BELLA CRUZ, A. Antimicrobial activity of extract, fractions and four compounds from *Piper solmsianum* C.DC. var *solmsianum*. **Phytomedicine**, 2004 (in press).

DE SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. (Editores) Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, Itajaí, 2003..

DHARMARATNE, H.R.W.; WANIGASEKERA, W.M.A.P. Xanthones from root bark of *Calophyllum thwaitesii*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 249-250, 1996.

DHARMARATNE, H.R.W.; MAYURI SAJEEVANI, J.R.D.; GISHANTHI, M. P.K.; EKANAYAKE, E.M.H.G.S. Distribution of pyranocoumarins in *Calophyllum cordato-oblongum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 995-998, 1998.

DHARMARATNE, H.R., WIJENGHE, W.M., THEVANASEM, V. Antimicrobial activity of xanthones from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 339-342, 1999 a .

DHARMARATNE, H.R.W.; PERERA, D.S.C.; MARASINGHE, G.P.K.; JAMIE, J. A chromene acid from *Calophyllum cordato-oblongum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 111-113, 1999 b .

DHARMARATNE, H.R.; WIJESINGHE, W.M. A trioxygenated diprenylated chromenxanthone from *Calophyllum moonii*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1293-1295, 1997.

DHARMARATNE H.R.W.; TAN G.T.; MARASINGHE G.P.; PEZZUTO J.M. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthones. **Planta Medica**, v. 68, p. 86-87, 2002.

DUKE J.A.; MARTINEZ, R.V. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**, CRC Press Ed., Maryland, 1994.

DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 527-529, 2001.

DWECK, A.C.; MEADOWS, T. Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – the African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 341-348, 2002.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LÓPEZ, S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 103-107, 2001.

FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES FILHO, S.L.M.; QUEIROZ, S.R.R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**, Academia Brasileira de Ciências, São Paulo, 1998.

FETROW, C.W.; ÁVILA, J.R. **Manual de Medicina Alternativa para o Profissional**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

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

FREIXA, B.; VILA, R.; VARGAS, L.; LOZANO, N.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Screening for antifungal activity of nineteen latin americal plants. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 427-430, 1998.

FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 3, p. 306-310, 1995.

GALGANI, J. Antifungal susceptibility tests. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 12, p. 1867-1870, 1987.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GIORDANI, R.; GACHON, C.; BUC, J.; REGLI, P.; JACOB, J.L. Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex. Its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth. **Mycoses**, v. 42, p. 465-474, 1999.

GONZALEZ, M.J.; NASCIMENTO, M.S.J.; CIDADE, H.M.; PINTO, M.M.M.; KIJOA, A.; ANANTACHOKE, C.; SILVA, A.M.S.; HERZ, W. Immunomodulatory activity of xanthones from *Calophyllum teysmanii* var. *inophylloide*. **Planta Medica**, v. 65, p. 368-371, 1999.

GOH, S.H.; JANTAN, I.; GRAY, A.I.; WATERMAN, G. Xanthones prenylated from *Garcinia opaca*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1383-1386, 1992.

GUILLET, D.; HÉLESBEUX, J.J.; SÉRAPHIN, D.; SÉVENET, T.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 5, p. 563-568, 2001.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. **Agriculture Biological Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 2061-2069, 1983.

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

HANCOCK, R.E.W.; BELL, A. Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. **European Journal Clinica Microbiological Infecty Diseases**, v. 7, p. 713-720, 1988.

HAY, A.E.; GUILLET, D.; MOREL, C.; LARCHER, G.; MACHEREL, D.; LE RAY, A.M.; LITAUDON, L.; RICHOMME, P. Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. **Planta Medica**, v. 69, n. 12, p. 1130-1135, 2003.

HERNANDEZ-PEREZ, M.; LÓPEZ-GARCIA, R.E.; RABANAL, R.M.; DARIAS, V.; ARIAS, A. Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 115-119, 1994.

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

ISAIAS, D.E.B.; NIERO, R.; NOLDIN, V.N.; BUZZI, F.C.; YUNES, R.A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL FILHO V. Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). **Pharmazie**, (in press), 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL FILHO, V.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*: Structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 3, p. 267-272, 2002.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y.; RAO, K.S.; TAKAYASU, J.; OKUDA, Y.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURAKAWA, H. A new biflavonoid from *Calophyllum paniciflorum* with antitumor-promoting activity. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 12, p. 1668-1671, 1999.

JANTAN, I.B.; JALIL, J.; WARIF, N.M.A. Platelet Activating Factor (PAF) antagonistic activities of compounds isolated from Guttiferae species. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 4, p. 243-246, 2001.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**, 2 ed. São Paulo: Premier, 1998.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Calophyllum soulattri*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 741-743, 2002.

KANEGUSUKU, M.; BENASSI, J.C.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; MAIA, A.A.; SOUZA, M.M.; DELLE MONACHE, F.; NIERO, R. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 57c, p. 272-276, 2002.

KIJJOA, A.; GONZALEZ, M.J.; AFONSO, C.M.; PINTO, M.M.M.; ANANTACHOKE, C.; SILVA, A.M.S.; HERZ, W. Xanthones from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 833-836, 2000.

KÖHLER, T.; PECHÈRE, J.C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 771-778, 1999.

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

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para Identificação – Fungos, Actinomicetos, Algas de Interesse Médico**, Sarvier: São Paulo, 1998.

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

LEWIS, W.H. **Medical botany - Plants affeting man's health**. John Wiley & Sons, New York. 1977.

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

LOCKSLEY, H.D.; MURRAY, I.G. Extractives from Guttigerae. Part XII. The isolation and structure of seven xanthones from *Calophyllum fragrans* Ridley. **Journal of Chemistry Society (C)**, p. 1567- 1571, 1969.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 00, p. 1-5, 1998

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2ed, v.01. São Paulo: Editora Plantarum, 1998.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necesSIDAde de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGISTRETTI, M.J. Remark on the pharmacological examination of plant extracts. **Fitoterapia**, v. 25, p. 67-79, 1980.

MAHMUD, S.; RIZWANI, G.H.; AHMAD, M.; ALI, M.S.; PERVEEN, S.; AHMAD, V.U. Antimicrobial studies on fractions and pure compounds of *Calophyllum inophyllum*. **Pakistan Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 13-25, 1998.

McKEE, T.C.; COVINGTON, C.D.; FULLER, R.W.; BOKESCH, H.R.; YOUNG, S.; CARDELLINA II, J.H.; KADUSCHIN, M.R.; SOEJARTO, D.D.; STEVENS, P.F.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute Collection. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1252-1256, 1998.

MENDELSON, R., BALICK, M. The value of undiscovered pharmaceutical in tropical forest. **Economic Botany**, v. 49, p. 223-228, 1995.

MESIA-VELA, S.; SANCHEZ, R.I.; ESTRADA-MUNIZ, E.; ALAVEZ-SOLANO, D.; TORRES-SOSA, C.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; KAUFFMAN, F.C. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. **Phytomedicine**, v. 8, n. 6, p. 481-488, 2001.

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

MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; MONACHE, F.D.; BELLA CRUZ, A. BELLA CRUZ, R.C., CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 694-696, 1996.

MITSCHER, L.A. LEU, R.P.; BARTHALA, M.S.; WU-NAN, W.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

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

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

MOREL, C.; SÉRAPHIN, D.; OGER, J.M.; LITAUDON, M.; SÉVENET, T.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. New xanthones from *Calophyllum caledonicum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1471-1474, 2000.

MOREL, C.; SÉRAPHIN, D.; TEYROUZ, A.; LARCHER, G.; BOUCHARA, J.P.; LITAUDON, M.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. New and antigungal xanthones from *Calophyllum caledonicum*. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 41-44, 2002.

NADINIC, E.L.; PENNA, C.; SAAVEDRA, C.L.; COUSSIO, J.D.; GUTKIND, G.; DEBENEDETTI, S.L. Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 123-130, 2002.



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

NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. **London: Pharmaceutical Press**, 1996.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M.; 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, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, 2003.

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

NIKAIDO, H. Prevention of drugs access to bacterial targets: permeability barrier and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

NOLDIN, V.F.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (ALCACHOFRA) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 33, p. 331-334, 2003.

OGER, J.M.; MOREL, C.; HELESBEUX, J.J.; LITAUDON, M.; SERAPHIN, D.; DARTIGUELONGUE, C.; LARCHER, G.; RICHOMME, P.; DUVAL, O. First 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl substituted xanthenes isolated from plants: structure elucidation, synthesis and antifungal activity. **Natural Products Research**, v. 17, n. 3, p. 195-199, 2003.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 959-961, 2003.

PAYROL, J.A.; MARTINEZ, M.M.; CARRABEO, G.T.; GARCIA, O.C. Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Revista Cubana Farmacêutica*, v. 35, n. 1, p. 56-60, 2001.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑHAS, G.I.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, 395-400, 2001.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiology: Concepts and applications**. International Edition, 1993.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D.A.G.; VIDOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M.; FERREIRA, A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* MART (CLUSIACEAE). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2003.

POLAK, A. Past, present and future of antimycotic combination therapy. **Mycoses**, v. 42, p. 335-370, 1999.

POTTI, G.R.; KURUP, P.A. Antibacterial principle of the root bark of *Calophyllum inophyllum*: isolation and antibacterial activity. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 8, n. 1, p. 39-40, 1970.

POOLE, K. Bacterial multidrug resistance emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 453-456, 1994.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-203, 1991.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; HOSTETTMANN, 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. **Farmacologia**, 2 ed, Guanabara Koogan: 1993.

REYES-CHILPA, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; ESTRADA-MUÑIZ, E. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliense* heartwood. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 7, p. 1901-1911, 1997.

ROJAS, A., HERNANDEZ, L., PEREDA-MIRANDA, R., MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 275-283, 1992.

RUTTER, R.A. Catalogo de las plantas utilizadas de la Amazonia Peruana. Lingüístico de Verano. Yarinacocha, Iquitos, Peru, 1990.

RYAN, K. J. **Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases**. 3 ed. Appleton and Lange: Stamford, 1994.

SAKAGAMI, Y.; KAJIMURA, K.; WIJESINGHE, W.M.N.M.; DHARMARATNE, H.R.W. Antibacterial activity of calozeyloxanthone isolated from *Calophyllum* species against vancomycin-resistant *Enterococci* VRE and synergism with antibiotics. **Planta Medica**, v. 68, p. 541-543, 2002.

SANTOS, D.R.; SOUZA, R.S.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações das plantas *Bauhinia forficata*, *Calophyllum brasiliense*, *Epidendron mosenii* e *Rubus imperialis*. **Monografia de conclusão de curso graduação em Farmácia**. Centro de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2000.

SANTOS PIMENTA, L.P.; PINTO, G.B.; TAKAHASHI, J.A.; SILVA, L.G.; BOAVENTURA, L.A. Biological screening of Annonaceos Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 209-212, 2003.

SARTORI, N.T.; CANEPELLE, D.; de SOUZA Jr., P.T.; MARTINS, D.T.O. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 149-156, 1999.

SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; BELLA CRUZ, A.; BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*)(Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, p. 567-569, 2003.

SATO, N.T.; TANAKA, H.; FUJIWARA, S.; HIRATA, M.; YAMAGUCHI, R.; ETOH, H.; TOKUDA, C. Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacterial. **Phytomedicine**, v. 9, p. 427-433, 2002.

SAVI, A.O., BREVIGLIERI, E., BELLA CRUZ, A. YUNES, R., CECHINEL FILHO, V. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 44(3)/45(1), p. 601-603.1996-1997.

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.; SCHLEMPER, V.; SILVA, D.; CORDEIRO, F.; BELLA CRUZ, A.; OLIVEIRA A.E.; CECHINEL FILHO V. Antibacterial activity of *Persea cordata* steam barks. **Fitoterapia**. v. 72, n. 1, p. 73-75, 2001.

SELITRENNIKOFF, C.P. **Screening for antifungal drugs**. In: Biotechnology of Filamentosos Fungi – Technology and Products. Boston: Butterum Henemann, p. 189 – 217, 1992.

SHEN, Y.C.; HUNG, M.C.; WANG, L.T.; CHEN, C.Y. Inocalophyllins A, B and their methyl esters from seeds of *Calophyllum inophyllum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 802-806, 2003.

SHIOTA, S.; SHIMIZU, M.; MIZUSHIMA, T.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of  $\beta$ -lactams in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 12, p. 1388-1390, 1999.

SIANI, CARLOS. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Scriptorio:Rio de Janeiro, 2003.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: Um texto ilustrado**. Eventos: Rio de Janeiro, 1999.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2002.

SIQUEIRA, F.S.A. Mecanismos de resistência a Beta-lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista do Biomédico**, v. 24, p. 275-278, 2002.

SIQUEIRA, J.M.; ZIMINIANI, M.G.; RESENDE, U.M.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo Fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v. 15, n. 3-4, p. 70-73, 2002.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). **Planta Medica**, v. 29, p. 250-252, 1993.

SOMCHIT, M.N.; REEZAL, I.; NUR, I.E.; MUTALIB, A.R. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 1-4, 2003.

STEVENS, P.F. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 61, p. 117-699, 1980.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**, 2 ed. Atheneu: São Paulo, 1999. 792p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N.; **Microbiologia**, 3 ed. Atheneu: São Paulo, 1999.

TYLER, V.E. Phytomedicines: back to the future. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1589-1592, 1999.

UGAZ, O.L. **Investigacion Fitoquímica**, 2 ed. Lima: Pontificia Universidade del Peru. Fondo editorial, 1994.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J.M.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1067-1077, 2003.

VASQUEZ, M.R. Useful plants of Amazonian Peru. Filled with **USDA's National Agricultural Library** Ed. 1990.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WRIGHT, L.R.; SCOTT, E.M.; GORMAN, S.P. The sensitive of mycelium, arthrospores and microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* to imidazoles determined by *in vitro* tests. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, n. 317-327, 1983.

YAMADA, H.; KOHNO, S.; MAESAKI, S.; KOGA, H.; KAKU, M.; HARA, K.; TANAKA, H. Rapid and Highly reproducible method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 1009-1012, 1993.

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

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

ZACCHINO, S.A.; LOPEZ, S.N.; PEZZENATI, G.D.; FURLÁN, R.L.; SANTECCHIA, C.B.; MUÑOZ, L.; GIANNINI, F.A.; RODRIGUEZ, A.M.; ENRIZ, R.D. In vitro evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids and related compounds acting against dermatophytes. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 10, p. 1353-1357, 1999.

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

ZHANG, Z.Z.; ELSOHLY, H.N.; JACOB, M.R.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 49-54, 2002.

<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.htm>, acesso em 20/06/2004.