

Lorena Carneiro Albernaz

Substância antimicrobiana de amplo espectro de *Tabebuia caraiba*

**Brasília, DF
2006**



**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde**

Lorena Carneiro Albernaz

Substância antimicrobiana de amplo espectro de *Tabebuia caraiba*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Laila Salmem Espíndola

**Brasília, DF
2006**

Sumário

Dedicatória	I
Agradecimentos	II
Lista de Abreviaturas	IV
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	VII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	1
1.1 Doenças Infecciosas e Resistência bacteriana	2
1.2 As plantas	10
1.3 O Cerrado	17
1.4 <i>Tabebuia caraiba</i>	18
2. Objetivos	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1 Material botânico e Produção dos extratos brutos	21
3.2 Microorganismos	22
3.3 Teste de susceptibilidade à ação antimicrobiana dos extratos vegetais	22
3.3.1 Teste antibacteriano - Método de difusão em ágar	22
3.3.2 Teste Antifúngico - Método de difusão em ágar	23

3.3.3 Autobiografia	23
3.3.4 Método da diluição - Concentração Inibitória Mínima	24
3.3.5 Isolamento do sub-grupo ativo	24
3.3.6 Caracterização do sub-grupo ativo	25
4. Resultados	26
4.1 Screening preliminar - Teste de difusão em ágar	26
4.2 Fracionamento químico biomonitorado	36
4.2.1 Partição bifásica	36
4.2.2 Tratamento cromatográfico da fração metanólica	36
4.2.3 Tratamento cromatográfico do grupo G2	39
4.2.4 Tratamento cromatográfico do grupo G2-3	42
4.3 Autobiografia	44
4.4 Determinação da atividade de SG2-3-4 pelo teste de difusão em ágar	45
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de SG2-3-4	46
4.6 Estudos espectrométricos de SG2-3-4	47
5. Discussão	53
6. Conclusão	63
7. Perspectivas	65
8. Bibliografia	66
9. Anexo	75

Dedicatória

A minha mãe, minha mimi, por me mostrar que só vale viver se for pra ter sonhos e correr atrás deles, e por acreditar que um dia eu seria uma pesquisadora. Te amo.

Agradecimentos

À Deus por me permitir todos os dias correr atrás dos meus sonhos e por me dar a força que eu preciso.

À Laila um exemplo pra mim, e definir o que você significa na minha vida é difícil, amiga, orientadora, minha mãe científica, pessoa que me incentiva e que prometeu nunca me deixar desistir. Nunca saberei te agradecer o bastante.

À minha família, queria citar todos, mais daria outra dissertação, pelo apoio, e pelo amor incondicional, e por terem sido tão presentes em todos os momentos da minha vida.

Pai, obrigada pelo amor, por me apoiar, por me deixar voar. Eu te amo.

Fábio o melhor irmão do mundo. Pela sua força, pelo seu amor, e por acreditar em mim, por querer que eu vença.

Tia Zilda, um anjo na minha vida. Uma pessoa admirável. Obrigada pelo amor, apoio e carinho.

Aos meus amigos do Laboratório: Aline, Ellen, Dani, Clarice, Alice, Jair, Nashira, Rosy, Raquel, Everton. Não só pela ajuda, mas por fazerem parte da minha história. Mari e Thiago, MUITO OBRIGADA, vocês foram essenciais pra que tudo terminasse bem.

Bibi, Ana Karina, Thais, Lolô, Grazi, Liana, Louly, Má, Marcia, Dani e Rê pelas risadas, pelas horas de "recreio", pelas conversas sérias, pelo carinho, pelos lanches. E principalmente por serem minha família brasileira.

Vivi, Janine, Lila, Geo, Aninha, Maíra, Fernanda como vocês fazem falta aqui do meu lado, mas estiveram sempre presentes, acho que todos os dias. Sempre prontas pra escutar tudo que eu tinha pra falar, pra dar broncas, pra dar colo, pra abraçar, pra fazer rir, pra chorar junto. E a todos os

Albernaz L.C.

amigos especiais que moram longe e que apesar da distancia sempre estiveram presentes na minha vida.

A todos meus amigos, difícil seria citar todos sem esquecer, mas quem é amigo saberá que eu nunca me esqueceria dele.

Aos amigos do INCQS/FIOCRUZ, porque foram eles os responsáveis por eu amar tanto trabalhar com microbiologia.

Ao professor Albino Verçosa de Magalhães pela ajuda fundamental no nosso trabalho. Éramos presença constante no laboratório de patologia.

Ao professor Jaime Santana pela grande ajuda sempre.

Ao Professor Marcelo Valle e a Dra. Maria Fátima Grossi de Sá por aceitarem fazer parte da banca.

Ao professor Dr. José Elias de Paula, pela coleta e identificação das plantas utilizadas neste trabalho, parte fundamental para a realização do mesmo.

Professor Edilberto Silveira (UFC) e Dr. Raimundo Braz Filho (UENF) pela cooperação na elucidação da molécula.

Eduardo, Vanessa e Ana Paula obrigada.

A Capes pela concessão da bolsa.

Perdoem-me se eu esqueci de citar alguma pessoa, mas saibam que todas as pessoas que passaram pela minha vida, desde a infância em Ipameri até a faculdade, e contribuíram de alguma forma para o que eu sou hoje, são especiais, e que nunca serão esquecidas. E eu achei que essa seria a parte mais fácil.

Albernaz L.C.

Lista de abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection

B. cereus – *Bacillus cereus*

C. koseri – *Citrobacter koseri*

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDC – Centers for Diseases Control and Preventions

CIM – Concentração Inibitória Mínima

¹³C – Carbono 13

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

E. aerogenes – *Enterobacter aerogenes*

E. coli – *Escherichia coli*

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

E. faecium – *Enterococcus faecium*

g - Grama

¹H - Hidrogênio

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Km² – Quilômetro quadrado

K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*

L – Litro

LPSs – lipopolissacarídeos

MecA – Gene de resistência de espécies de *Staphylococcus*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina

mL – Mililitro

µg – micrograma

mg – Miligrama

mm - milímetro

Albernaz L.C.

NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide Reduced

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

P. mirabilis – *Proteus mirabilis*

PBPs – Penicillin Binding Proteins

PBP2a - Penicillin Binding Proteins 2a

PQS - Sinalizador 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona

QS – Quorum-Sensing

RF – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear (1D – uma dimensão e 2D – duas dimensões)

RNA – Ácido Ribonucléico

S. choleraesuis – *Salmonella choleraesuis*

S. typhimurium – *Salmonella typhimurium*

S. marcescens – *Serratia marcescens*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

SSNCISM - *Salmonella* Subcommittee of Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia/mL

UV – Ultravioleta

VanA, VanB, VanC, VanD e VanE – genes de resistência de espécies de *Enterococcus*

vCJD - variante da doença de Creutzfeldt-Jacob

VISA – *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina

VRE – *Enterococcus* resistentes a vancomicina

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes	4
Figura 2. Substâncias naturais que inibem o QS	15
Figura 3. <i>Tabebuia caraiba</i> (Mart.) Bureau	18
Figura 4. Processo de extração por maceração com hexano seguido de etanol 95%	21
Figura 5: Halos de inibição formados em crescimento bacteriano de <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i>	28
Figura 6. Perfil em CCD das frações (F) oriundas da coluna cromatográfica aberta	38
Figura 7. Fracionamento químico do grupo G2 em coluna cromatográfica aberta	41
Figura 8. Perfil em CCD de SG2-3-5 oriundo da coluna cromatográfica aberta G2-3	44
Figura 9. Autobiografia: halo de inibição do grupo G2 em <i>S. aureus</i>	45
Figura 10. Esquema para obtenção do sub-grupo SG2-3-4	49
Figura 11. Unidades arílicas (A e B) reconhecidas. Possibilidade estrutural (1 e 2) de SG2-3-4	50
Figura 12. Ésteres etílico (I) e metílico (II) presentes em SG2-3-4	51
Figura 13. Constituintes da madeira do caule de <i>Tabebuia impetiginosa</i>	60
Figura 14. Compostos antimicrobianos extraídos da casca do caule de <i>Tabebuia aurea</i>	61
Figura 15. Estruturas de substâncias antimicrobianas extraídas de plantas	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais agentes antimicrobianos	9
Tabela 2. Extratos de plantas do bioma Cerrado avaliados sobre os microorganismos	30
Tabela 3. Extratos ativos após triagem do Banco de extratos sobre os microorganismos	34
Tabela 4. Grupos obtidos após reunião das frações	39
Tabela 5. Os 13 grupos resultantes do fracionamento de G2	42
Tabela 6. Os 7 sub-grupos resultantes do fracionamento de G2-3	44
Tabela 7. Atividade de SG2-3-4 pelo método de difusão em ágar	46
Tabela 8. Valores de CIM do extrato de <i>Tabebuia caraiba</i> e de SG2-3-4	48
Tabela 9: Dados preliminares de RMN	51

”O QUE EU SEI EU PASSO ADIANTE”

GALILEU GALILEI

Resumo

As infecções bacterianas matam milhões de pessoas por ano. Estudos têm demonstrado o aumento da resistência aos antibióticos disponíveis e o perigo do surgimento de novas doenças infecciosas, que possivelmente não poderão ser combatidas pelos fármacos atuais. O controle é dificultado pela falta de sincronia entre o desenvolvimento de novos antimicrobianos e a velocidade em que a resistência é espalhada pelo mundo. O interesse em investigar moléculas eficazes inclui o potencial biológico de compostos extraídos de espécies vegetais. Diante disso, foi realizada uma triagem do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília sobre bactérias patogênicas a seres humanos, responsáveis por infecções hospitalares e comunitárias. Duzentos e quarenta e dois extratos brutos hexânicos e etanólicos obtidos a partir de 37 espécies pertencentes a 15 famílias de plantas foram testados *in vitro* sobre três espécies de bactérias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis* e duas espécies Gram positivas: *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e sobre um fungo: *Candida albicans*. Para avaliação da atividade dos extratos foi realizado os testes de difusão em ágar, a uma concentração de 1000 µg/mL, sendo os resultados expressos pelo diâmetro da zona de inibição do crescimento microbiano (halo de inibição). O extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba* foi selecionado para estudo, devido a importante atividade sobre *E. faecalis* (halo de inibição de 20 mm; concentração inibitória mínima/CIM: 31,25 µg/mL) e *S. aureus* (halo de inibição de 22 mm; CIM: 500 µg/mL). A partição bifásica desse extrato permitiu selecionar a fração metanólica, que foi submetida ao fracionamento químico biomonitorado em coluna cromatográfica aberta de sílica, resultando na obtenção de 24 grupos (G). O monitoramento da atividade dos grupos foi realizado por meio da técnica de autobiografia. Os mais ativos foram G2 e G11. O G2 permitiu a obtenção do sub-grupo SG2-3-4, com amplo espectro de ação sobre outras bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri* e Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis*. O sub-grupo SG2-3-4 apresenta unidades arílicas, cujos espectros permitem cogitar a possibilidade estrutural da unidade capaz de ligá-las, sugerindo ser uma arilcumarina ou uma benzofuranona. SG2-3-4 encontra-se em processo de purificação para decisão da estrutura molecular.

Palavras-chave: Bioma Cerrado; Extratos de plantas; *Tabebuia caraiba*; Estudos biomonitorados; Potencial antimicrobiano

Abstract

Bacterial infections cause the death of millions of people each year. Studies have shown increased resistance to available antibiotics and the danger of new infectious diseases, which probably cannot be combated with the available drugs. Control is aggravated by the lack of synchronicity between the development of new drugs and the spreading of resistance throughout the world. The search for effective molecules includes the biological potential of vegetable compounds. In this regard, a screening was conducted of the Cerrado Biome Plant Extract Bank of the University of Brasília Farmacognosy Laboratory for human pathogenic bacteria causing nosocomial and community-acquired infections. Two hundred and forty-two crude hexanic and ethanolic extracts, obtained from thirty-seven species belonging to fifteen plant families, were tested *in vitro* against three Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella choleraesuis*) and two Gram positive microorganisms, (*Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*) and against a fungus (*Candida albicans*). The agar-diffusion method was used to evaluate the activity of the extracts, at a concentration of 1000 µg/mL. The results were expressed according to the diameter of the bacterial growth inhibition zone. The hexanic stem bark extract of *Tabebuia caraiba* was selected for this study due to its significant activity against *E. faecalis* (inhibition zone: 20 mm; minimum inhibitory concentration/MIC: 31.25 µg/mL), and *S. aureus* (inhibition zone: 22 mm; MIC: 500 µg/mL). The bioassay-guided fractioning of this extract allowed the selection of the methanolic fraction, which was submitted to a biphasic partition on a silica gel column leading to the creation of 24 groups. An autobiography assay was used to monitor group activity. Of all groups, G2 and G11 were the most active, with promising results for G2. This group allowed the creation of the sub-group SG2-3-4, with a high spectrum of action on other Gram-negative (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*) and Gram positive bacteria (*Staphylococcus epidermidis*).

The sub-group, SG2-3-4, presented arilic units, whose spectra allowed us to consider the structural binding capacity of the unit, which appears to be either a aril-cumarine or a benzofuranone. The SG2-3-4 is currently undergoing a purification process to establish the molecular structure.

Keywords: Cerrado biome; Plant extracts; *Tabebuia caraiba*; Biomonitored studies; Antimicrobial activity

1. Introdução

Os microorganismos são os menores seres vivos existentes, desempenhando importantes funções na natureza, com características heterogêneas, encontrados em quase todos os ambientes, tanto na superfície, como no mar e subsolo e até mesmo em fontes termais a 130 °C. Acredita-se que cerca da metade da biomassa do planeta seja constituída pelos microorganismos, sendo os 50% restantes distribuídos entre as plantas (35%) e os animais (15%) (Whitman, 1998). Nos dias atuais, se tem o conhecimento de que homens e micróbios sempre conviveram em um mesmo ambiente. Porém, a descoberta do universo microbiano ocorreu com a identificação de um fungo por Hooke e de uma bactéria por Leeuwenhoek, entre os anos de 1665 e 1678 (Gest, 2004). Dados confirmam que desde a Pré-história os micróbios são causadores de doenças em humanos, porém somente a partir da segunda metade do século XIX, por volta de 1878, os trabalhos de Pasteur, Koch e seus contemporâneos demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades que acometiam homens e outros animais (Tavares, 2001).

Fleming, em 1929, trabalhando com bactérias patogênicas a seres humanos, teve uma de suas placas de Petri contaminadas com *Penicillium notatum* e observou um halo de inibição em volta da colônia, onde as bactérias não cresceram. Assim, foi descoberto, por acaso científico o primeiro antibiótico, a penicilina. Fleming, ao descobrir a penicilina, também verificou que algumas espécies de bactérias não eram inibidas por esse novo agente: um grupo de bactérias colifóides e a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Abraham e Chain, em 1940, identificaram em extratos de *Escherichia coli* uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, sendo aquela *Albernaz L.C.*

denominada penicilinase (Tavares, 2001). Assim, surgiam os primeiros relatos de resistência bacteriana e os indícios de que os próprios microorganismos produzem antibióticos para suprimir o crescimento de outros microorganismos.

Nos anos 40, a pesquisa com antibióticos teve grande impulso em todo o mundo. Novos antibióticos foram descobertos e incorporados aos receituários médico e veterinário. Porém, a partir da década de 50, o uso indiscriminado de antibióticos estabeleceu a seleção de exemplares resistentes por meio da pressão seletiva (OMS, 1998). De acordo com a teoria da evolução de Darwin, não são os antibióticos que transformam uma bactéria sensível em resistente, eles apenas selecionam os germes resistentes da população bacteriana não havendo indícios de que sejam agentes mutagênicos responsáveis pela resistência (Livermore, 2004). Desta maneira, ocorre a necessidade da busca por novos fármacos, pois os micróbios desconhecidos e resistentes aos medicamentos disponíveis causam epidemias infecciosas, que são grave problema de saúde pública (Mahady, 2005; Morens, 2004), com significantes taxas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsáveis por 50% das mortes nos países tropicais (Mahady, 2005). Entretanto, o ritmo de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos diminuiu drasticamente no decorrer da última década (Goodman, 2003).

1.1 Doenças Infecciosas e Resistência Bacteriana

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003), 17 milhões de mortes em 2002 foram decorrentes de doenças infecciosas, sendo 11,4 milhões devido a infecções bacterianas. Estudos têm demonstrado o aumento da resistência aos antibióticos disponíveis (Lambert, 2005; Cunha, 2001; Poole, 2000; Cunha, 1998) e a OMS alerta sobre o perigo do surgimento de novas doenças infecciosas, que, possivelmente, não poderão ser combatidas pelos

antibióticos disponíveis, sendo o controle dos microorganismos dificultado pela falta de sincronia entre a velocidade de desenvolvimento de novas drogas antibióticas e a velocidade em que a resistência é espalhada pelo mundo. Dessa maneira, a resistência microbiana aos tratamentos tende a levar o mundo de volta a era pré-antibiótica (OMS, 2000a). Na **Figura 1** pode ser observado um mapa das doenças infecciosas emergentes, como o vírus ebola na África e re-emergentes como a dengue, a febre amarela, o cólera, a malária, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina e tuberculose multi-resistente a drogas no continente americano.

Em 1905, Ehrlich *et al.* identificou o fenômeno da resistência a fármacos observando que em culturas de tripanossomas africanos tratados com arsênico ou com determinados corantes havia sobrevivência de alguns exemplares da mesma colônia (Tavares, 2001). Uma teoria é a possibilidade de que a resistência bacteriana seja intrínseca a bactéria, possibilitando o rápido surgimento de cepas resistentes, antes mesmo de se iniciar o uso clínico do medicamento (**Tabela 1**). É conhecido que as bactérias apresentam mecanismos capazes de induzir a resistência aos antibióticos. Um exemplo são os *Staphylococcus* metilina resistentes que modificam o receptor da penicilina, exigindo concentrações elevadas de β -lactâmicos para a obtenção do efeito desejado (Lambert, 2005; Jeljaszewicz, 2000).

antibióticos aminoglicosídeos, cefalosporinas, clindamicinas, penicilinas semi-sintéticas, trimetoprima-sulfametoxazol. Algumas cepas resistentes de *E. faecalis* produzem β -lactamases do tipo penicilinase (Cereda, 2001). No Brasil, desde 1997 já se tem conhecimento de cepas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina e, em 1998, essas cepas provocaram um surto de infecções em um hospital de São Paulo (Tavares, 2001).

Em relação aos agentes antimicrobianos utilizados, vão agir de alguma forma sobre a integridade da célula bacteriana, podendo interferir na síntese da parede celular (penicilinas, cefalosporinas, vancomicina), na síntese protéica (aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, clorafenicol), na transcrição do RNA (rifampicina), na segregação do DNA (quinolonas), na integridade do cromossomo (metronidazol) e no metabolismo do ácido fólico (trimetoprima, pirimetamina). Porém, é possível que ocorram mudanças nos alvos de ação do fármaco reduzindo a possibilidade de inibição de alguma das funções celulares, como a aquisição de transpeptidases alteradas, MecA, um grupo de genes que codifica a resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) e a muitos outros β -lactâmicos (Lambert, 2005).

O rápido tratamento de uma doença infecciosa diminui o risco de seleção e disseminação de uma bactéria resistente (Figliolini, 1998). A pressão seletiva de variantes e genes resistentes resulta do extenso uso de antimicrobianos, anti-sépticos e desinfetantes nas práticas médica e veterinária e na agricultura (avaparcina ou tetraciclina (Jeljaszewicz, 2000), sobretudo o uso de antibióticos como imipenem, ceftazidime e ciprofloxacina (Cunha, 2000). O surgimento de cepas bacterianas resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA), demonstra a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos (Lambert, 2005). Recentemente, foram introduzidos no mercado os agentes oxazolidinonas, ketolides, azalides, streptograminas e gliciliclinas, que possuem mecanismos de ação diferentes e estão começando

a ser utilizados na prática clínica, porém o desenvolvimento da resistência é quase inevitável (Lambert, 2005; Hancock, 2005).

Em relação às particularidades dos microorganismos, o *Staphylococcus aureus*, cocos Gram positivo, possui uma membrana composta por uma camada única de peptidoglicana que facilita o acesso do fármaco, contrariamente aos bacilos Gram negativos, porém com elevada resistência natural intrínseca a praticamente todos os medicamentos utilizados na terapêutica (Jeljaszewicz, 1998). Colonizam especialmente as vias nasais e são patógenos frequentes de infecções purulentas, bem como septicemia (Jeljaszewicz, 2000). Causam furúnculos, tersetol, pneumonia, flebites, meningites, osteomielites, endocardites e sobretudo infecções nosocomiais, das quais é o principal agente. Um grupo de genes, *MecA*, que codifica resistência a meticilina em *S. aureus*, sintetiza enzimas de ligação de penicilina 2a (PBP2a) que envolvem a união dos componentes dos peptídeoglicanos na formação da parede (Fuda, 2004). Essas mesmas PBP2a são responsáveis pela resistência de *Proteus mirabilis* ao imipenem. Porém, existe um grupo de β -lactâmicos que ainda mantêm atividade sobre PBP2a, que inclui cefalosporinas modificadas (Lizawada, 2004; Vouillamoz, 2004), carbapenens (Kurazono, 2004) e um trinem (Ferrari, 2003). Esses novos agentes mostram atividade sobre MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina) e estão em vários estágios de desenvolvimento farmacológico e ensaios clínicos. Os antibióticos do tipo glicopeptídeos como a vancomicina e teicoplanina inibem a formação da parede celular da bactéria, e são considerados os mais potentes sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), cepas primeiramente isoladas no Japão em 1996 (Hiramatsu, 2001), que foram se espalhando por vários outros países atingindo o mundo todo.

Há ocorrência de espécies de *Enterococcus* que não respondem aos β -lactâmicos por apresentarem baixa afinidade pelas enzimas PBPs, resultando em alto nível de resistência

principalmente aos aminoglicosídeos (gentamicina e eritromicina) e glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). Contudo, a resistência à ampicilina é raramente encontrada em *Enterococcus faecalis*, contrariamente a *Enterococcus faecium* resistentes devido a superprodução das enzimas PBP2a (Cereda, 2001). O mais freqüente caso de resistência a antibióticos glicopeptídeos em *E. faecium* e *E. faecalis* é a aquisição dos genes denominados VanA (alta resistência à vancomicina e à teicoplanina) e VanB (resistência à vancomicina, mas susceptibilidade à teicoplanina), que codificam enzimas que produzem uma modificação nos peptídeoglicanos (Cereda, 2001). Foi também identificado o gene VanD (gene de resistência) nas duas espécies (Cereda, 2001). Os grupos VanA e VanB compreendem dois genes – vanH_aX e vanH_bBX_b, localizados nos plasmídeos, requeridos para a resistência - e presume-se que são originários de bactérias produtoras de glicopeptídeos. Os *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) são patógenos responsáveis por sérias infecções sistêmicas principalmente em pacientes com sistema imunológico debilitado e em pessoas transplantadas (Sastry, 1995).

Em relação às particularidades de casos de resistência, o primeiro isolado clínico de VRSA expressando alto nível de resistência a vancomicina (concentração inibitória mínima/CIM = 1024 µg/mL) deve-se a aquisição de genes VanA de *Enterococcus* sp. em 2002. Essa foi a primeira vez em que se isolou uma cepa de *S. aureus* com um gene adquirido de *Enterococcus* sp. (Weigel, 2003) e uma segunda cepa foi isolada nesse mesmo ano (CIM = 32 µg/mL) (Tonover, 2004). A transferência de genes de resistência à vancomicina entre *Enterococcus* sp. e *S. aureus* já havia sido demonstrada previamente em laboratório (Jeljaszewicz, 2000). A presença de dois diferentes mecanismos de resistência em algumas cepas induzidos por MecA no cromossomo e VanA no plasmídeo, resulta em multi formas de peptídeoglicanos e em cepas resistentes a oxacilina (CIM = 800 µg/mL) e a vancomicina (CIM = 512 µg/mL) (Severin, 2004).

O freqüente uso de glicopeptídeos tende a aumentar o número de cepas resistentes. Falhas na terapia com vancomicina podem resultar da tolerância das bactérias ao fármaco, que se torna apenas bacteriostático e não mais bactericida, por dois mecanismos de ação já descritos: o primeiro tipo em *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina (VISA) está relacionado com o espessamento da parede bacteriana, impossibilitando a ação do glicopeptídeo devido à captura de suas moléculas e o segundo tipo (VRSA) está relacionado à aquisição do gen *vanA* por *S. aureus*, proveniente de *Enterococcus* resistentes a glicopeptídeos (Cui, 2006).

Salmonella ssp. causa importantes infecções humanas resultando em disfunções gastrointestinais caracterizadas por diarreia, febre e cólicas abdominais, podendo levar a infecções sistêmicas, meningites e, até mesmo, a morte. Há cada ano, 1,4 milhões de pessoas sofrem infecções por *Salmonella* nos Estados Unidos (Mead, 1999) e a ciprofloxacina é o antibiótico mais prescrito para esse tipo de infecção (Ângulo, 2000). Cerca de 5.592 estudos randomizados realizados entre os anos de 1996 a 1999 permitiram o isolamento de cepas humanas e a constatação de que 11,8% dessas cepas eram resistentes à kanamicina, 6,9% a ampicilina + clavulanato, 8,8% à cefalotina, 6,9% a trimetoprima e nenhuma delas resistentes à fluoroquinolona e às cefalosporinas de terceira geração (CDC, 2006).

As fluoroquinolonas agem inibindo a DNA girase e a topoisomerase IV, duas enzimas envolvidas na síntese de DNA (Tavares, 2001) e vitais no tratamento de infecções por *Salmonella* sp. em humanos (Ângulo, 2000). A resistência a este grupo de antibióticos pode resultar de mutações cromossômicas em ambos os alvos, sendo que a alteração em GyrA ou GyrB da DNA girase é muito comum em cepas Gram negativas, já em Gram positivas a situação é contrária sendo mais comum a mutação na topoisomerase IV (Hooper, 1999).

Outros mecanismos de resistência já detectados foram as mutações nos ribossomos de *E. coli* e de *Streptococcus pneumoniae* por alteração em grupos de genes; a inibição de uma proteína Albernaz L.C.

carreadora de acil-enol redutase NADH dependente e de outra proteína sintase de *Mycobacterium* sp., codificando resistência a isoniazida; a resistência à trimetoprima por *S. aureus* e *S. pneumoniae*, causada por uma mutação no gene *dhfr*; a resistência à mupirocina em *S. aureus*; a resistência ao ácido fusídico por *Staphylococcus* e a resistência à polimixina em *Salmonella* (Lambert, 2005).

Além da resistência bacteriana, o aumento de custo de tratamento per capita representa um grande problema de saúde pública. Segundo dados levantados pela OMS, em alguns países da Ásia, no final dos anos 90, o tratamento de meningite bacteriana subiu de US\$ 20 para US\$ 110; em relação às doenças infecciosas respiratórias, passou de US\$ 5 para US\$ 40 e os tratamentos de tuberculose multi-resistente podem chegar a US\$ 4000 (OMS, 1999). Nos EUA e no Canadá, mais da metade das prescrições de antibióticos são desnecessárias e um estudo feito no Vietnã demonstrou que 70% das prescrições eram feitas em dosagens erradas (OMS, 1999).

Tabela 1: Principais agentes antimicrobianos com ano de descoberta e produção, introdução na clínica e relato de resistência. (-): não está determinada. Modificado de Schwarz (2006).

Agente Antimicrobiano	Descoberta/ Produção	Introdução na Clínica	Ocorrência de Resistência	Modo de Ação
Penicilina	1929	1941	1940	Síntese da parede celular
Streptomicina	1943	1947	1947, 1956	Síntese protéica
Tetraciclina	1948	1952	1956	Síntese protéica
Eritromicina	1952	1955	1956	Síntese protéica
Vancomicina	1956	1972	1987	Síntese da parede celular
Gentamicina	1963	1967	1970	Síntese protéica
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985	Segregação cromossômica
Rifampicina	1957	1960	-	Síntese protéica

1.2 As Plantas

Desde tempos remotos os homens têm conhecimento acerca dos benefícios das plantas, o que tem levado à formação da medicina tradicional, em que o homem, por meio de falhas e sucessos, fez utilização de remédios retirados de vegetais. O primeiro marco data de 2600 a.C., na Mesopotâmia, com a utilização do óleo de *Cedrus*, *Cupressus sempervirens*, *Gycyrrhiza glabra*, *Commiphora species* e *Papaver somniferum*. A farmacopéia Egípcia, de 1500 a.C., descreve 700 drogas, que em sua maioria são plantas. Os gregos contribuíram substancialmente para o desenvolvimento de medicamentos de origem vegetal por meio dos trabalhos de Theophrastes (300 a.C), Dioscorides (100 d.C.) e Galeno (130-200 d.C.). Alguns desses medicamentos tornaram-se clássicos, como a morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum*, Papaveraceae) em 1806 por Seturner, utilizada como analgésico há mais de 4000 anos e a quinina, extraída das quinas (*Cinchona* ssp., Rubiaceae) em 1820 por Caventou e Pelletier, utilizada no controle da malária até os dias atuais. As cascas da quina eram utilizada por povos indígenas da Amazônia e sua utilização foi introduzida na Europa por volta de 1600. Sua estrutura levou à síntese de fármacos antimaláricos como a cloroquina e mefloquina. Já nos anos 60 do século XX, a busca por medicamentos para o controle do câncer permitiu o isolamento de compostos como a vimblastina, extraída de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) e o taxol, extraído de *Taxus* ssp. (Taxaceae). Em 1985, a *Artemisia annua* (Asteraceae) utilizada no tratamento de febres há mais de 2000 anos na China, permitiu o isolamento da artemisinina, utilizada sobre formas resistentes de *Plasmodium falciparum*. As substâncias extraídas de vegetais também são modelos para a síntese de derivados menos tóxicos e, às vezes, mais potentes como o taxotere (docetaxel[®]), modificação da estrutura do taxol, e a navelbina utilizadas contra o câncer, modificação da estrutura da vimblastina. Atualmente, é estimado que

aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional para cuidados primários de saúde e a OMS decidiu catalogar e avaliar a segurança e eficácia desses remédios. Em meados do século XX, o uso de plantas medicinais sofreu profunda alteração diante da introdução da terapêutica sintética e altamente industrializada. Nesse contexto mundial, as indústrias farmacêuticas brasileiras foram, em sua maioria, desativadas ou substituídas por empresas multinacionais, modificando então a prática médico-terapêutica que se afastou e, até mesmo, negligenciou a utilização de plantas medicinais. No decorrer das últimas décadas, observa-se, em vários países, uma diversificação nesse quadro, recolocando os produtos naturais em pauta na disputa pelo mercado farmacêutico e ampliando, também, o leque de pesquisas desenvolvidas (Alves, 2000). Apenas 1% das espécies de plantas da Terra tem seu potencial farmacêutico conhecido nos dias de hoje (Meléndez *et al.*, 2005).

O uso indiscriminado de antibióticos tem selecionado microrganismos patógenos multiresistentes (Hancock, 2005; Tshikalange *et al.*, 2005), justificando a pesquisa de plantas medicinais na busca de novas substâncias antimicrobianas. Bioprospecções mostram o grande potencial de novos agentes anti-infecciosos oriundos de plantas (Adonizio, 2006; Pereira, 2006; Tshikalange, 2005; Arias *et al.*, 2004; Ordoñez *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2001; Salvat *et al.*, 2001). Dados indicam que as plantas medicinais são mais ativas sobre as cepas Gram positivas do que sobre as Gram negativas (Chandrasekaran *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 1996). A morfologia das membranas dessas bactérias é certamente responsável pela diferença dessa atividade. Gram negativos têm uma membrana fosfolipídica externa, em que se encontram componentes estruturais conhecidos como lipopolissacarídeos, além das porinas que constituem barreira seletiva para solutos hidrofílicos com limite de exclusão em torno de 600 daltons (Palombo *et al.*, 2001). As bactérias Gram positivas são mais

susceptíveis por terem apenas uma camada de peptidoglicanos, que não é uma barreira efetiva para impedir a entrada de drogas (Grosvenor *et al.*, 1995).

Há muito tempo, algumas plantas são utilizadas para tratar doenças infecciosas, como a uva ursi (*Arctostaphylos uva-ursi*) e a cranberry juice (*Vaccinium macrocarpon*) no tratamento de infecções urinárias; a melissa (*Melissa officinalis*) e alho (*Allium sativum*) com ação antibiótica de amplo espectro (Heinrich *et al.*, 2004). Existe um grande interesse pelos compostos fenólicos por apresentarem grande atividade microbicida (Tura, 2002; Duthie, 2000; Harbone, 2000), sobretudo em bactérias Gram positivas, devido ao aumento da prevalência de resistência em infecções Gram positivas (Hancock, 2005) e pela maior facilidade da droga penetrar nessas bactérias. Foi detectado que fenóis e taninos de 45 plantas eram os constituintes ativos sobre as cepas de *S. aureus* (Ahmad *et al.*, 2001). Dados demonstram que os flavonóides possuem atividade sobre cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* (Mori, 1987; Nishino, 1987). Flavonóides extraídos de espécies da família Asteraceae, como a quercetagentina- 7-arabidosil galactosídeo do extrato aquoso das folhas de *Tagetes minuta*, demonstraram boa atividade sobre *E. coli*, em relação ao controle clorafenicol (Tereschuk *et al.*, 1997). Foram isoladas e testadas flavonas de *Piper crassinervium* sobre *Cladosporium cladosporiades* e *C. sphaerospermum* e essas apresentaram a mesma atividade antifúngica dos controles nistatina e miconazol (Danelutte *et al.*, 2003). Um estudo etnobotânico realizado a partir de 13 plantas medicinais utilizadas pela população brasileira revelou importante atividade antimicrobiana, justificada pela presença dos flavonóides e taninos nas plantas: *Piper regnellii* (pariparoba), que mostrou excelente atividade sobre *S. aureus* e *B. subtilis* e moderada sobre *P. aeruginosa*; *Punica granatum* (romã), *Psidium guajava* (goiaba), *Mikania glomerata* (guaco), *Arctium lappa* (bardana) e *Eugenia uniflora* (pitanga) mostraram-se ativas sobre alguns dos microorganismos testados, entretanto *P. guajava*

foi a mais ativa sobre o fungo *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Holtez *et al.*, 2002).

A família Bignoniaceae contém várias espécies tropicais utilizadas na medicina tradicional e seus compostos químicos mais comuns são as naftoquinonas e iridóides, utilizados como anti-séptico e no tratamento de tumores; além de sesquiterpenos com potencial antifúngico (Cowan, 1999). A *Tabebuia avellanadae* é rica em naftoquinonas com atividades antimicrobiana (Pereira, 2006), antifúngica (Portillo, 2001), antiviral (Lagrotta, 1986) e antineoplásica (Lee, 2005). Foi descrita a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das naftoquinonas isoladas de *T. avellanadae* e observado que esses reagem com as proteínas das enzimas celulares, no citoplasma e na parede celular, com maior atividade para o extrato bruto, provavelmente devido a ação sinérgica dos compostos (D'Albuquerque, 1968). Terpenóides e flavonóides de Bignoniaceae do Cerrado apresentaram atividade protetora sobre patógenos e radiação UV (Alcerito *et al.*, 2002), sendo que a espécie *Arrabidaea brachypoda* (Bignoniaceae) demonstrou atividade antifúngica sobre *Cladosporium sphaerospermum*; resultando no isolamento dos três flavonóides ativos: cirsimaritina, cirsilol e 3',4'-dihidroxi-5,6,7 trimetoxiflavona (Alcerito *et al.*, 2002). A luteolina, flavonóide isolado das sementes de *Senna petersiana* (Fabaceae) mostrou atividade sobre três bactérias Gram positivas (Tshikalange, 2005).

A família Zingiberaceae possui espécies com atividades antioxidante e antimicrobial (Haraguchi *et al.*, 1996) e alguns constituintes apolares extraídos dessas espécies, como curcuminóides, kava pirnes e gíngerois, apresentaram atividades antifúngica, antioxidante, inseticida e antiinflamatória (Tawata *et al.*, 1996). O diterpeno ácido 15-hidroxi-7-labden-17-oico isolado do extrato hexânico de *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae), mostrou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*; porém, o extrato bruto foi mais ativo

que a substância isolada, demonstrando um possível sinergismo entre as moléculas presentes no extrato hexânico (El-Seedi, 2002).

O composto alquil-galato isolado de *Caesalpinia spinosa* (Caesalpinioideae) apresentou atividade antimicrobial sinérgica com β -lactâmicos em cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Essa ação sinérgica é bastante estudada e estes compostos recebem o nome de intensificadores de susceptibilidade de β -lactâmicos em MRSA. Relatos sobre o assunto apontam a propriedade anfifílica da membrana celular de *S. aureus* como alvo de ação desses compostos. As flavonas e seus derivados têm ação sinérgica com os β -lactâmicos, aumentando a ação sobre MRSA e *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina (MSSA) (Shibata *et al.*, 2005).

O fenômeno quorum-sensing (QS) foi elucidado em uma bactéria luminescente marinha o *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). QS é um sistema de comunicação entre as bactérias com a difusão de pequenas moléculas sinalizadoras, denominadas autoindutoras, através das membranas bacterianas. Essa linguagem permite que as bactérias coordenem seus comportamentos em relação ao meio ambiente. Assim, quando a densidade bacteriana aumenta, a quantidade dessas moléculas cresce até atingir um pico que provoca a ativação ou repressão de certos genes no conjunto de bactérias. Entre esses genes estão os envolvidos na virulência, regulação do crescimento da colônia e produção de antibióticos pelas cepas. A interrupção do QS, ou comunicação célula-a-célula, é um exemplo de efeito antipatogênico. Novas terapias bloqueando o QS parecem promissoras. Esses inibidores têm um modo de ação diferente dos antibióticos e, em princípio, não levam à resistência (Adonizio *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2006; Le Berre *et al.*, 2006; Fuqua *et al.*, 2002). A atividade anti-QS de plantas medicinais, utilizadas popularmente como anti-infecciosos no sudeste da Flórida, foi testada sobre as bactérias *Chromobacterium violaceum* e *Agrobacterium tumefaciens*, que são capazes de produzir um pigmento quando

induzidas por autoindutores, demonstrando atividades moduladas por quorum sensing. Seis plantas apresentaram atividade inibindo a produção desse pigmento, demonstrando atividade anti-QS (Adonizio *et al.*, 2006). As furanonas isoladas de uma alga marinha, *Delisea pulchra* (**Figura 2**), inibem o QS - regulado por genes em bactérias entéricas como *E. coli* e *Salmonella*, sendo promissoras para aplicações médicas (Givskov, 1997). Além das furonas, outras substâncias extraídas de plantas também já demonstraram inibir o QS (**Figura 2**).

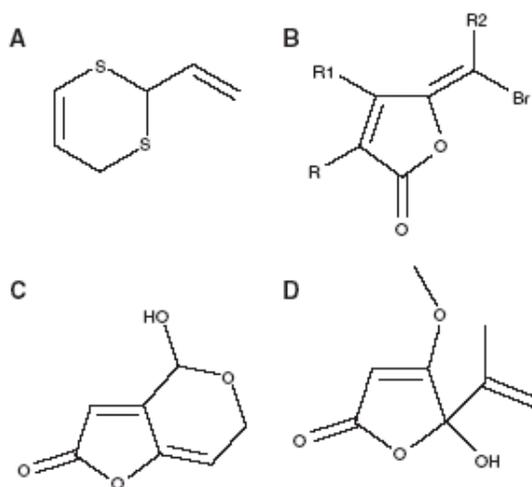


FIGURA 2: Substâncias naturais que inibem o QS. A - isolado de alho, B- furanona de *Delisea pulchra*, C - patulina, D - ácido penicílico (Rasmussem *et al.*, 2006)

O biofilme, uma comunidade multicelular envolvida por uma matrix exopolissacarídica, que tem a capacidade de impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente, é outra estratégia adotada pelos microorganismos bacterianos. O biofilme é responsável por causar doenças crônicas, alta resistência a antibióticos e a outros sistemas de defesa do hospedeiro (Fux, 2005; Lewis, 2001).

Muitas plantas têm sido foco de estudos na busca de compostos antimicrobianos e anti-biofilme (Schachter, 2006). O potencial anti-biofilme da substância salvipisona, extraída de *Salvia sclarea* (Lamiaceae), foi analisado sobre *Staphylococcus* resistentes e observou-se uma drástica diminuição do número de células viáveis, sendo essa a primeira vez que uma molécula derivada de planta, não antibiótico, tem atividade direta sobre biofilmes de *Staphylococcus* (Kuzma *et al.*, 2006). Dessa maneira, é especulado que substâncias de baixo peso molecular têm a capacidade de desestabilizar a matrix do biofilme bacteriano e interferir na comunicação celular (QS) (Lewis, 2001; El Azizi, 2005).

O interesse em se investigar novas moléculas eficazes no tratamento de infecções inclui o potencial microbicida de compostos extraídos de plantas e o Brasil oferece diversas possibilidades, pois a grande variedade climática e de solos permite a existência de vários tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal. O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, com uma área de 2 milhões de Km² e 44 % da flora endêmica (Klink & Machado, 2005).

1.3 O Cerrado

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma da América do Sul, superado apenas pela Amazônia e ocupa 24% da área total do Brasil (Machado, 2004). O desafio atual é garantir a manutenção das espécies desse vasto bioma, a sua capacidade de gerar riquezas, contribuindo para a produção de alimentos, fibras, outros produtos e de promover o desenvolvimento integrado e sustentável, garantindo qualidade de vida para a população (Ratter, 1997; Souza Brito, 1993). Algumas espécies do Cerrado como pequi, baru, cagaita, jatobá, araticum, mangaba, buriti, cajuzinho-do-cerrado tiveram sua atividade biológica estudada, porém a diversidade genética, ecológica e química das espécies é pouco explorada.

Várias plantas são utilizadas pela medicina tradicional (Napolitano *et al.*, 2005; Ahmad, 1998), inclusive para o tratamento de doenças como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções por fungos e bactérias (Matos, 1994), indicando a possibilidade de encontrar nessas plantas moléculas promissoras para a terapia medicamentosa.

Neste trabalho, o Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado/Laboratório de Farmacognosia/UnB possibilitou a investigação da atividade de extratos e substâncias vegetais sobre bactérias e fungos patogênicos a seres humanos. A espécie *Tabebuia caraiba* foi selecionada como nosso objeto de estudo, devido a importante atividade antimicrobiana demonstrada nos ensaios.

1.4 *Tabebuia caraiba*



Figura 3: *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau

Nome científico: *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bureau (**Figura 3**)

Família: Bignoniaceae

Sinonímia científica: *Tecoma caraiba*

Nomenclatura popular: ipê-amarelo-do-cerrado, carobeira, caraiba, caraúba, caraubeira, paratudo, pau d'arco do campo

Bioma: Cerrado

Ecossistema: Mata ciliar

Árvore pequena de casca espessa, acinzentado-escuro e fendida, ramos muito grossos, cilíndricos ou subquadrangulares, folhas longo-pecioladas, folíolos longo-peciolados, oblongos

Albernaz L.C.

ou lanceolado-oblongos, obtusos ou retusos no ápice, coriáceos, reticulado-enervados na página inferior. Flores amarelas, aromáticas. O fruto é uma cápsula lanceolada, acinzentado-ferruginea. A casca é amarga e febrífuga, de uso pre-colombiano, as folhas contém um alcalóide, a carobina (Pio Corrêa, v. II).

Apesar de sua utilização na medicina tradicional, a literatura não relata dados fitoquímicos da madeira do caule da espécie *Tabebuia caraiba*, o que nos levou a selecionar o extrato hexânico desse órgão em nossos estudos químicos biomonitorados, a fim de isolar compostos microbicidas com potencial medicamentoso.

2. Objetivos

A linha de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia/UnB é desenvolvida a partir de um banco de extratos de plantas do Cerrado. A ação biológica desses extratos brutos, suas frações e substâncias isoladas é verificada a fim de se obter novas moléculas ativas como opções de tratamento ou controle de vetores (atividade inseticida) de doenças negligenciadas como leishmaniose, doença de Chagas, malária e dengue. Além disso, também é verificada a ação sobre células cancerosas, bactérias e fungos.

Objetivo Geral

Realizar o estudo químico biomonitorado *in vitro* de extratos de plantas do bioma Cerrado sobre bactérias (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*) e fungo (*Candida albicans*) causadores de infecções hospitalares e comunitárias.

Objetivos Específicos

- Identificar extratos de plantas do Cerrado com atividade antimicrobiana
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e dos compostos ativos
- Purificar e identificar os compostos antimicrobianos
- Determinar o espectro de ação dos compostos ativos

3. Materiais e Métodos

3.1 Material botânico e produção dos extratos brutos

As plantas foram coletadas no bioma Cerrado, no entorno de Brasília/DF, juntamente com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula (UnB). Excicatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB). Os diferentes órgãos vegetais (400 g) foram separados, dessecados, estabilizados, pulverizados em moinho de facas e submetidos ao processo de extração por maceração (**Figura 4**), por contatos múltiplos (4 x 1 semana), em hexano (4 x 2 L), seguido de etanol 95% (4 x 2 L). As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. Os extratos brutos hexânicos e etanólicos foram mantidos à temperatura de -20 °C. Cada extrato foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de soluções testes à 1 mg/mL.



Figura 4: Processo de extração por maceração com hexano seguido de etanol 95%.

3.2 Microorganismos

Foram utilizadas cepas da American Type Culture Collection (ATCC), adquiridas no Laboratório de Microorganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz/RJ, para a realização das avaliações antimicrobianas. As bactérias foram mantidas em ágar Muller Hinton inclinado à temperatura de 4 °C. O fungo *Candida albicans* foi mantido em meio inclinado Sabouraud em temperatura ambiente. Foram escolhidas três espécies de bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028) e duas espécies de bactérias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e um fungo: *Candida albicans* (ATCC 10231).

O subgrupo ativo identificado foi testado sobre as bactérias: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (isolado clínico), *Serratia marcescens* (isolado clínico) e *Citrobacter Koseri* (isolado clínico).

Para os ensaios foram utilizadas culturas de 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata e o resultado foi obtido pela média aritmética da medida dos halos de inibição.

3.3 Teste de susceptibilidade à ação antimicrobiana dos extratos vegetais

3.3.1 Teste antibacteriano - Método de difusão em ágar

Foi utilizada a metodologia adotada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M2-A8, 2003) na realização deste trabalho, que é descrita como se segue. Os isolados foram cultivados em ágar com infusão de cérebro e coração (Difco®) por 18 a 24 h a 37 °C. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina e a concentração foi ajustada de acordo

com o padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi inoculada em uma placa de ágar Mueller Hinton (Difco®), na qual, após secagem por 15 min, foram aplicados os discos e impregnados com 7 µL da solução de extrato. As placas foram incubadas por 18 a 24 h a 37 °C. A susceptibilidade foi verificada por meio da leitura do diâmetro dos halos de inibição. O diâmetro da zona em que não houve crescimento (zona de inibição), incluindo o diâmetro do disco, foi medido com o auxílio de um paquímetro. Gentamicina e ampicilina foram utilizadas como controles positivos e DMSO como controle negativo.

3.3.2 Teste Antifúngico - Método de difusão em ágar

Foi utilizada neste trabalho a metodologia adotada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M2-A8, 2003), que é descrita a seguir. Os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud (Difco®) por 18 a 24 h a 23 °C. O inóculo de *C. albicans* foi suspenso em solução salina e a concentração foi ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi inoculada em placa de ágar Sabouraud (Difco®), na qual após secagem por 15 min, foram aplicados os discos e impregnados com 7 µL da solução de extrato. As placas foram incubadas por 24 a 36 h a 23 °C. A susceptibilidade foi verificada por meio da leitura do diâmetro dos halos de inibição. Tioconazol foi utilizado como controle positivo e DMSO como controle negativo.

3.3.3 Autobiografia

A atividade dos grupos oriundos do fracionamento químico do extrato ativo foi avaliada por autobiografia (Slusarenko, 1998) com placas de cromatografia de camada delgada (CCD). As placas de CCD eluídas foram colocadas em placas de Petri estéril; e foi adicionado em seguida o meio Mueller Hinton. As espécies *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, em uma *Albernaz L.C.*

concentração de 0,5 da escala Mc Farland foram inoculadas sobre o meio. As placas de Petri foram incubadas por 18 a 24 h a 37 °C. A atividade dos grupos foi verificada por meio do halo de inibição formado sobre as substâncias separadas na CCD.

3.3.4 Método da diluição - Concentração Inibitória Mínima

No desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado o método recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M7-A6, 2003). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do sub-grupo identificado previamente como ativo, por meio do método de difusão em discos e pela técnica da autobiografia. O sub-grupo foi dissolvido em DMSO a uma concentração de 1 mg/mL e foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 7,8125 µg/mL em uma placa de 96 poços. O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina e a concentração ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL) e inoculado em cada poço da placa contendo as diluições sucessivas do extrato ativo em meio de cultura, e incubado a 37 °C. A leitura foi realizada após 24 h. DMSO foi utilizado como controle negativo e ampicilina, como controle positivo. A concentração do sub-grupo em que não houve crescimento (sem turvação do meio de cultura) foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM). O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.5 Isolamento do sub-grupo ativo

O extrato bruto hexânico (5,3 g) foi submetido a uma partição bifásica com metanol e ciclohexano (50:50), obtendo-se duas frações e um precipitado escuro. Esses foram testados por autobiografia a fim de se identificar a fração ativa. A fração metanólica (3,54 g), considerada ativa, foi fracionada em coluna cromatográfica aberta de sílica gel 60 (100 g) após depósito a

seco, sob gradiente de ciclohexano:acetato de etila (100:0; 97,5:2,5; 95:5; 92,5:7,5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 60:40; 50:50; 30:70; 0:100) e metanol (100). O fracionamento permitiu o recolhimento de frações de 50 mL, que foram reunidas em grupos, conforme o perfil cromatográfico em CCD (placa de sílica gel 60 F254 - Merck) revelada em UV (254 nm) e vanilina sulfúrica seguida de aquecimento a 100 °C.

Os diferentes grupos foram avaliados por autobiografia com *S. aureus* e *E. faecalis* e o grupo ativo foi recromatografado em coluna cromatográfica aberta de sílica gel 60 (9,3 g) sob um gradiente ciclohexano:acetato de etila (100:0; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 50:50; 0:100) e metanol (100). Os grupos gerados foram avaliados por autobiografia com *S. aureus* e *E. faecalis*. O grupo ativo (119,4 mg) foi fracionado em coluna cromatográfica aberta de sílica gel 60 (10 g) sob um gradiente ciclohexano:acetato de etila (100:0; 95:5; 90:10). Esse fracionamento permitiu a obtenção do sub-grupo responsável pela atividade bacteriana.

3.3.6 Caracterização do sub-grupo ativo

O sub-grupo responsável pela atividade foi submetido às técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (^1H e ^{13}C) e bidimensional (2D) (COSY, HSQC, HMBC, NOESY).

4. Resultados

4.1 Screening preliminar - Teste de difusão em ágar

Duzentos e quarenta e dois extratos brutos hexânicos e etanólicos obtidos a partir de 37 espécies pertencentes a 15 famílias de plantas (**Tabela 2**) foram testados *in vitro* sobre três espécies de bactérias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis* e duas espécies de bactérias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e sobre um fungo: *Candida albicans*, para avaliação de suas respectivas atividades, a uma concentração de 1000 µg/mL. Os resultados foram expressos pelo diâmetro da zona de inibição: < 8 mm: extrato inativo; 8-11 mm: extrato parcialmente ativo; 12-16 mm: extrato ativo; ≥ 17 mm: extrato muito ativo.

Dentre os 242 extratos testados a uma concentração de 1000 µg/mL, 19 inibiram o crescimento de uma a duas espécies utilizadas na triagem (**Tabela 3**). As seguintes atividades foram observadas sobre as duas espécies Gram-positivas: 7 extratos ativos sobre *Enterococcus faecalis*; 6 extratos ativos sobre *Staphylococcus aureus* e 4 extratos ativos ao mesmo tempo sobre essas duas espécies. Dois extratos apresentaram atividade sobre a espécie Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Os extratos ativos sobre *Enterococcus faecalis* foram os extratos hexânicos: raiz de *Anemopaegma arvense*; madeira do caule de *Tabebuia caraiba*; caule de *Anemopaegma chamberlaynii*; madeira do caule, casca da raiz e fruto de *Casearia sylvestris* var. *lingua*, raiz de *Pouteria gardneri*; madeira da raiz de *Pouteria torta*; e os extratos etanólicos: folha de *Pouteria torta*; casca do caule e casca da raiz de *Simarouba versicolor*. Os extratos ativos sobre *Staphylococcus aureus* foram os extratos hexânicos: folha de *Xylopia aromatica*; caule e raiz de *Anemopaegma arvense*; madeira do caule de *Tabebuia caraiba*; raiz de *Pouteria*
Albernaz L.C.

gardneri; madeira do caule de *Pouteria ramiflora*; madeira da raiz de *Pouteria torta*; e os extratos etanólicos: folha de *Himatanthus obovatus*; madeira do caule de *Peschiera affinis*; raiz de *Guarea Kunthiana*. Os extratos ativos sobre *Pseudomonas aeruginosa* foram os extratos hexânicos e etanólicos da madeira da raiz de *Casearia sylvestris* var. *lingua*.

Dentre esses 19 extratos ativos, o que apresentou a maior atividade foi o extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba*, sendo ativo sobre as bactérias Gram positivas *Enterococcus faecalis* (halo de inibição de 20 mm; CIM: 31,25 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (halo de inibição de 22 mm; CIM: 500 µg/mL) (**Figura 5**) e não apresentando atividade sobre as espécies de bactérias Gram negativas avaliadas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Outros extratos considerados muito ativos foram os hexânicos do caule de *Anemopaegma arvense* e da madeira do caule de *Pouteria ramiflora* sobre *Staphylococcus aureus* (halo de inibição de 20 e 15 mm respectivamente) (**Tabela 3** e **Figura 5**).

Os controles positivos utilizados nos ensaios com as bactérias foram discos impregnados com 10 µg de Ampicilina ou Gentamicina, que apresentaram atividades com halos de inibição variando de 12 a 26 mm. O DMSO foi utilizado como controle negativo a 100%, não inibindo o crescimento das bactérias (**Tabela 3**).

Esta triagem permitiu constatar ainda que duas famílias vegetais estudadas, Annonaceae e Zingiberaceae, possuem espécies com extratos capazes de inibir a produção de piocianina, pigmento produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Quatro extratos inibidores da piocianina eram pertencentes a família Annonaceae: extratos hexânicos e etanólicos da casca do caule de *Annona crassiflora*; extrato hexânico da madeira do caule de *Cardiopetalum calophyllum*; extrato hexânico da casca da raiz de *Duguetia furfuracea*; e um extrato pertencente a família Zingiberaceae: extrato etanólico da folha de *Renealmia alpinia* (**Tabela 3**).

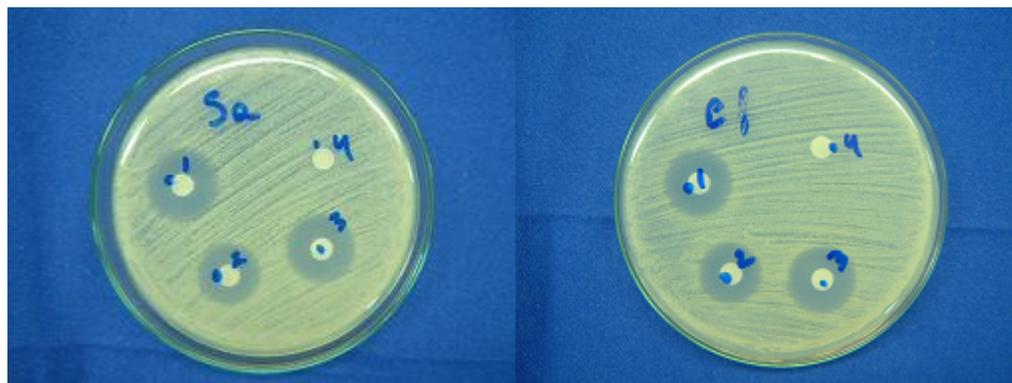


Figura 5: Halos de inibição formados em crescimento bacteriano de *S. aureus* e *E. faecalis*. 1. Extrato hexânico de madeira do caule de *T. caraiba*; 2. Extrato hexânico de madeira do caule de *P. ramiflora*; 3. Fração metanólica do extrato hexânico da madeira do caule de *T. caraiba*; 4. Fração ciclohexânica do extrato hexânico da madeira do caule de *T. caraiba*

Os demais extratos não apresentaram atividade sobre as bactérias ou esta não foi considerada significativa.

Apenas o extrato hexânico do caule de *Guarea guidonea* apresentou-se parcialmente ativo (halo de inibição 9 mm) sobre a cepa do fungo *Candida albicans*. O Tioconazol foi utilizado como controle positivo nos testes com o fungo na concentração de 100 µg/mL e apresentou um halo de inibição de 29 mm (**Tabela 3**). O DMSO foi utilizado como controle negativo a 100%, não inibindo o crescimento do fungo (**Tabela 3**).

Dentre os 242 extratos brutos utilizados nesta triagem, 120 eram hexânicos (H) e 122 etanólicos (E), relativos aos diferentes órgãos vegetais: caule (madeira +casca) 7H e 6E, casca do caule 18H e 21E, madeira do caule 17H e 18E, totalizando 42 extratos hexânicos e 45 etanólicos, somando portanto 87 extratos do caule; raiz (madeira +casca) 7H e 8E, casca da raiz 18H e 18E, madeira da raiz 15H e 15E, totalizando 40 extratos hexânicos e 41 etanólicos, somando portanto

Albernaz L.C.

81 extratos da raiz; folha 30H e 28E; fruto 7H e 7E e inflorescência 1H e 1E. Dentre os 20 extratos que apresentaram atividade sobre as bactérias e o fungo, 13 eram hexânicos e 7 etanólicos, sendo oriundos dos seguintes órgãos vegetais: 8 do caule, 8 da raiz, 3 das folhas e 1 de fruto.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2: Extratos de plantas do bioma Cerrado avaliados sobre os microorganismos

Família	Parte da planta testada	Número de Herbário
Nome científico	(Solvente) ^a	
Annonaceae		
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	F ^b (H,E); CC ^c (H,E); CM ^d (E); RC ^e (E); RM ^f (H)	(UB) 3700
<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schlttdl.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); R ^g (H,E)	(UB) 3703
<i>Duguetia furfuracea</i> (St. Hil.) Benth. & Hoek	F(H,E); C ^h (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3679
<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) M. C. Dias	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3699
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3690
Apocynaceae		
<i>Aspidosperma macrocarpon</i> Mart.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3692
<i>Condylocarpon isthmicum</i> (Vell.) A. D.C.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E)	(UB) 3663
<i>Hancornia pubescens</i> (Nees et Mart.) M. Arg.	F(H);); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3677
<i>Himatanthus obovatus</i> (M. Arg.) Woodson	F(H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3678
<i>Peschiera affinis</i> (M. Arg.) Miers.	CC(H,E); CM (H,E); R(H,E)	(UB) 3717
Asteraceae		
<i>Eremanthus glomerulatus</i> Less.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3721
<i>Piptocarpha macropoda</i> (D. C.) Baker	F(H,E); CC(H,E)	(UB) 3680
<i>Piptocarpha rotundifolia</i> (Less.) Baker	F(H,E); CC(H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3676

<i>Eremanthus sphaerocephalus</i> Baker	I ¹ (H,E)	(UB) 3708
Bignoniaceae		
<i>Anemopaegma arvense</i> Stellf. Ex de Souza	F(H); C(H,E); R(H)	(UB) 3691
<i>Cybistax antisiphilitica</i> (Mart.) Mart.	F(E); C(H); Fr(H,E)	(UB) 3696
<i>Tabebuia caraiba</i> Bureau	F(H,E); CC(E); CM (H,E); RC(H,E); RM(E)	(UB) 3701
<i>Arrabidaea florida</i> D.C.	F(H)	(UB) 3714
<i>Anemopaegma chamberlaynii</i> (Sims.) Dur. Ik.	C(H,E)	(UB) 3715
Burseraceae		
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aublet.) March.	CC(E); CM(E)	(UB) 3689
Flacourtiaceae		
<i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> (Camb.) Eichl.	F(H,E); CC(H,E); CM (H); RC(H,E); RM(H,E); Fr ¹ (H,E)	(UB) 3693
Magnoliaceae		
<i>Talauma ovata</i> A. St.-Hil.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E)	(UB) 3738
Meliaceae		
<i>Guarea guidonea</i> Sleumet.	F(H,E); C(H,E); R(H,E)	(UB) 3712
<i>Guarea Kunthiana</i> A. Juss.	F(H,E); C(H,E); R(E); Fr(H,E)	(UB) 3710
Rubiaceae		
<i>Sabicea brasiliensis</i> Werhm	R(E); Fr(H,E)	(UB) 3709
Sapindaceae		
<i>Cupania vernalis</i> Camb.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3695
<i>Magonia pubescens</i> St. Hil.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); R(H,E); RC(H,E); RM(H,E); Fr(H,E)	(UB) 3702

<i>Matayba guianensis</i> Aublet	CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E)	(UB) 3697
<i>Serjania lethalis</i> St. Hil.	F(H,E); CC(E); CM (H,E); RC(H,E)	(UB) 3716
<i>Chrysophyllum soboliferum</i> Rizzini	F(H,E)	(UB) 3733
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(H,E); CM (H,E); R(H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3672
<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E); RC(H,E); RM(H,E)	(UB) 3671
<i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk.	F(H,E); RC(H); RM(H,E)	(UB) 3674
Simaroubaceae		
<i>Simarouba versicolor</i> St. Hil.	F(H,E); CC(H,E); RC(H,E); Fr(H,E)	(UB) 3724
Zingiberaceae		
<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas.	F(H,E)	(UB) 3719
Monimiaceae		
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	F(H,E); CC(H,E); CM (H,E)	(UB) 3720
<i>Siparuna cujabana</i> A. D.C.	F(H,E); C(H,E); R(H,E); Fr(H,E)	(UB) 3737

^aSolventes utilizados na extração: H: hexano, E: etanol; ^bF: Folha; ^cCC: Casca do caule; ^dCM: Casca da madeira; ^eRC: Casca da raiz; ^fRM: Madeira da raiz ; ^gR: Raiz (madeira + casca); ^hC: Caule (madeira + casca); ⁱI: Inflorescência ; ^jFr: Fruto

Tabela 3: Extratos ativos sobre os microrganismos selecionados, após triagem do Banco de extratos, pelo método de difusão em ágar.

Nome científico	Parte da planta testada	Solvente ^b	Microrganismos ^a					Fungo
			Gram negativos	Gram positivos				
			<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. chloresuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
Controles								
Annonaceae								
<i>Annona crassiflora</i>	CC ^d	H	n	*	n	n	n	n
	CC	E	n	*	n	n	n	n
<i>Cardiopetalum calophyllum</i>	CM ^e	H	n	*	n	n	n	n
<i>Duguetia furfuracea</i>	RC ^f	H	n	*	n	n	n	n
<i>Xylopia aromatica</i>	F ^c	H	n	n	n	10	n	n
Apocynaceae								
<i>Himatanthus obovatus</i>	F	E	n	n	n	9	n	n
<i>Peschiera affinis</i>	CM	E	n	n	n	9	n	n
Bignoniaceae								

<i>Anemopaegma arvense</i>	C ⁱ	H	n	n	n	20	n	n	n
	R ^h	H	n	n	n	12	8	n	n
<i>Tabebuia caraiba</i>	CM	H	n	n	n	22	20	n	n
<i>Anemopaegma chamberlaynii</i>	C	H	n	n	n	n	9	n	n
Flacourtiaceae									
<i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i>	CM	H	n	n	n	n	8	n	n
	RC	H	n	n	n	n	8	n	n
	RM ^g	H	n	8	n	n	n	n	n
	RM	E	n	8	n	n	n	n	n
	Fr ^j	H	n	n	n	n	8	n	n
Meliaceae									
<i>Guarea guidonea</i>	C	H	n	n	n	n	n	9	n
<i>Guarea kunthiana</i>	R	E	n	n	n	9	n	n	n
Sapotaceae									
<i>Pouteria gardneri</i>	R	H	n	n	n	12	10	n	n

<i>Pouteria ramiflora</i>	CM	H	n	n	n	15	n	n
<i>Pouteria torta</i>	F	E	n	n	n	n	10	n
Simaroubaceae	RM	H	n	n	n	12	10	n
<i>Simarouba versicolor</i>	CC	E	n	n	n	n	9	n
Zingiberaceae	RC	E	n	n	n	n	8	n
<i>Renalmia alpinia</i>	F	E	n	*	n	n	n	n
<i>Ampicilina</i> (10 µg)			12	n	18	20	22	n
<i>Gentamicina</i> (10 µg)			28	23	23	26	18	n
<i>Tioconazol</i> (100 µg/mL)			n	n	n	n	n	29
DMSO			n	n	n	n	n	n

^aResultados representados pela medida dos halos em milímetro (mm), determinados a partir de três experimentos independentes;

^bSolventes utilizados na extração: H: hexano, E: etanol; ^cF: Folha; ^dCC: Casca do caule; ^eCM: Casca da madeira; ^fRC: Casca da raiz;

[§]RM: Madeira da raiz; ^hR: Raiz (madeira + casca); ⁱC: Caule (madeira + casca); ^jFr^j Fruto; n: não inibiu; *: inibiu o pigmento piocianina; DMSO: dimetilsulfóxido (controle negativo).

4.2 Fracionamento químico biomonitorado

O extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba*, ativo sobre as bactérias *Enterococcus faecalis* (halo de inibição de 20 mm; CIM: 31,25 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (halo de inibição de 22 mm; CIM: 500 µg/mL) foi selecionado para estudo químico a fim de permitir o isolamento e a identificação do composto bactericida.

4.2.1 Partição bifásica

Uma alíquota de 5,6 g do extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba* foi submetida a uma partição bifásica em ciclohexano e metanol. Foram obtidas as seguintes frações: metanólica (3,54 g), ciclohexânica (1,5 g) e um precipitado de coloração escura (0,56 g).

Após avaliação das três frações pelo teste de difusão em ágar verificamos que a fração metanólica era a responsável pela atividade.

4.2.2. Tratamento cromatográfico da fração metanólica

A fração metanólica (3,54 g) foi cromatografada em coluna aberta de sílica, possibilitando o recolhimento de 498 frações (50 mL cada), que foram analisadas comparativamente por CCD (**Figura 6**) e, posteriormente, reunidas de acordo com suas semelhanças (Rf) para a obtenção de 24 grupos (**Tabela 4**).

O rendimento total dos grupos obtidos foi de aproximadamente 59,87%; portanto, houve uma perda de, aproximadamente, 1,42 g da fração metanólica, que pode ser atribuída às frações desprezadas (com o objetivo de facilitar a purificação) por conterem substâncias intermediárias à dois grupos, além dos procedimentos laboratoriais como a transferência das frações recolhidas de

uma vidraria para outra. G2 apresentou o maior rendimento (em torno de 10,91%), enquanto o G23 apresentou o menor (0,13%) em relação à fração metanólica.

Os testes de atividade desses grupos obtidos foram realizados sobre *S. aureus* e *E. faecalis* pela técnica de autobiografia. O grupo G2 obtido no sistema de eluente ciclohexano:acetato de etila (97,5:2,5) e o grupo G11 obtido em ciclohexano:acetato de etila (92,5:7,5) (**Tabela 4**) apresentaram atividade sobre *S. aureus* e *E. faecalis* quando monitorados por autobiografia.

O grupo G2 (386,3 mg) foi escolhido para iniciar os nossos estudos de fracionamento químico biomonitorado, que podem ser contemplados a seguir. O estudo químico de G2 e G11 estão em andamento, porém já obtivemos alguns resultados para G2, incluindo a detecção do subgrupo ativo.

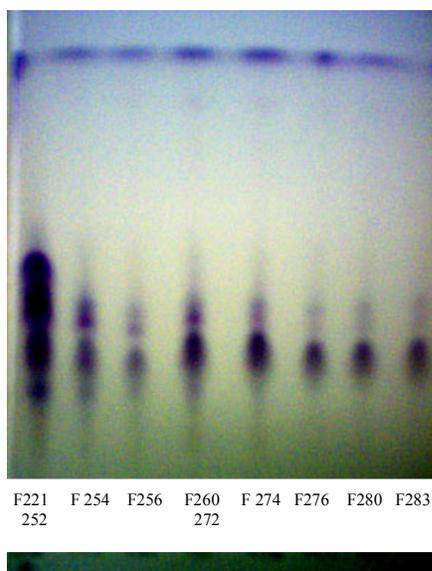


Figura 6: Perfil em CCD (sílica gel 60F₂₅₄, Merck) das frações (F) oriundas da coluna cromatográfica aberta. Eluente CCD - C:AcEt 70:30. Revelador: vanilina sulfúrica.

Tabela 4. Grupos obtidos após reunião das frações

Fração Metanólica	Fração	Eluente ^a		Peso (mg)	Rendimento (%)
		Gradiente de polaridade	Volume total (mL)		
G1	F1-33	C (100)	1700	132,3	3,73
G2	F34-42	C:AcEt (97,5:2,5)	3600	386,3	10,91
G3	F43-45	C:AcEt (97,5:2,5)		35,7	1,0
G4	F46-61	C:AcEt (97,5:2,5)		46,8	1,32
G5	F62-78	C:AcEt (97,5:2,5)		84,9	2,4
G6	F79-110	C:AcEt (97,5:2,5)		82,8	2,34
G7	F111-122	C:AcEt (95:5)		2700	35,3
G8	F123-131	C:AcEt (95:5)	42,4		1,19
G9	F131-147	C:AcEt (95:5)	67,9		1,92
G10	F148-170	C:AcEt (95:5)	63,8		1,8
G11	F171-253	C:AcEt (92,5:7,5)	2900	283,2	8,0
G12	F254-273	C:AcEt (92,5:7,5)		42,1	1,19
G13	F274-291	C:AcEt (90:10)	3000	42,6	1,2
G14	F292-313	C:AcEt (85:15)		64,1	1,81
G15	F314-335	C:AcEt (80:20)	1000	105,3	2,97
G16	F336-355	C:AcEt (75:25)	2500	45,7	1,29
G17	F356-413	C:AcEt (70:30) e (60:40)	1500	74,5	2,1

G18	F414-423	C: AcEt (50:50)	1000	14,5	0,41
G19	F424-443	C:AcEt (30:70)	2500	32,7	0,92
G20	F444-468	C:AcEt (30:70)		31,1	0,88
G21	F469-487	AcEt (100)	1500	19,6	0,55
G22	F488-491	AcEt (100)		20,2	0,57
G23	F492-496	AcEt (100)		4,7	0,13
G24	F497-498	M (100)	1000	360,9	10,19
Total			24900	2119,4	59,87

Coluna cromatográfica 1 - Tratamento da fração metanólica. ^aEluente: C: ciclohexano; AcEt: acetato de etila; M: metanol.

4.2.3 Tratamento cromatográfico do grupo G2

O grupo G2 (386,3 mg) foi recromatografado em coluna aberta de sílica (**Figura 7**) em um gradiente crescente de polaridade: ciclohexano, acetado de etila e metanol, levando à obtenção de 245 frações que, após monitoramento por CCD, foram reunidas em 13 grupos (**Tabela 5**).

O rendimento total do fracionamento foi de 97,3% em relação à G2; portanto, houve uma perda de, aproximadamente, 10,5 mg, que pode ser atribuída às frações desprezadas por conterem substâncias que não se enquadravam no perfil cromatográfico de nenhum dos grupos, além dos procedimentos laboratoriais como a transferência das frações recolhidas de uma vidraria para outra. G2-3 apresentou o maior rendimento (30,89%), enquanto o G2-11 apresentou o menor (2,69%) em relação à G2.

Os testes de atividade desses grupos obtidos sobre *S. aureus* e *E. faecalis* foram realizados pela técnica de autobiografia. O grupo G2-3 recuperado em ciclohexano puro apresentou a

atividade sobre *S. aureus* e *E. faecalis* quando monitorados por autobiografia, e permitiu a continuidade do nosso estudo de fracionamento químico biomonitorado, que pode ser contemplado a seguir.

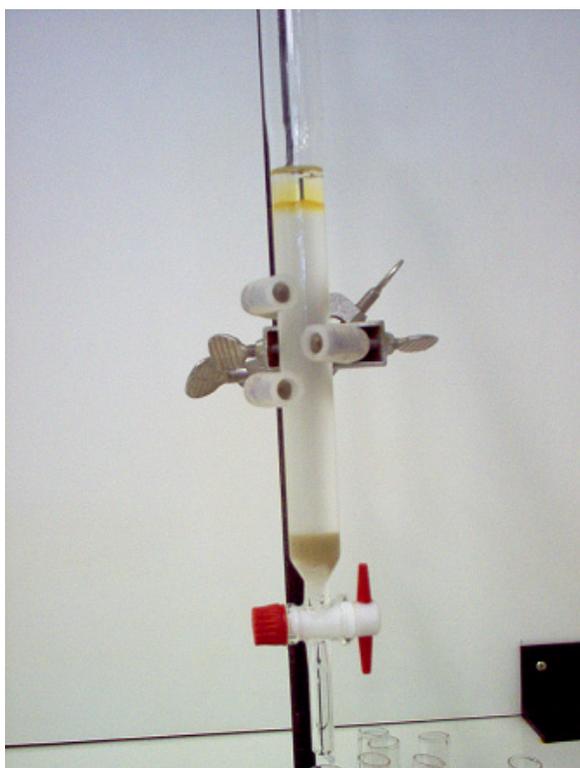


Figura 7: Fracionamento químico do Grupo G2 em coluna cromatográfica aberta de sílica. Incorporação de G2 na sílica.

Tabela 5. Os 13 grupos resultantes do fracionamento de G2 (386,3 mg).

Grupo G2	Fração	Eluente ^a		Peso (mg)	Rendimento (%)
		Gradiente de polaridade	Volume total (mL)		
G2-1	F1-17	C (100)	1600	17,4	4,5
G2-2	F18-28	C (100)		11	2,84
G2-3	F29-95	C (100)		119,3	30,89
G2-4	F96-106	C (100)		11,1	2,87
G2-5	F107-136	C (100)		22,1	5,72
G2-6	F137-140	C:AcEt (95:5)	160	20,8	5,38
G2-7	F141-145	C:AcEt (95:5)		14,4	3,72
G2-8	F146-174	C:AcEt (90:10)	300	21,8	5,64
G2-9	F175-190	C:AcEt (85:15) e (80:20)	200	10,8	2,79
G2-10	F191-197	C:AcEt (50:50)		13,7	3,54
G2-11	F198-201	C:AcEt (50:50)		10,4	2,69
G2-12	F202-206	AcEt (100)	80	12,6	3,26
G2-13	F207-245	M (100)	110	90,4	23,4
Total			2450	375,8	97,3

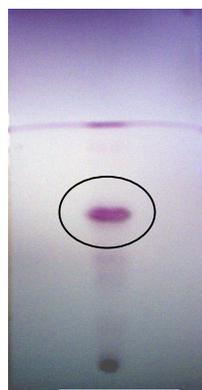
Coluna cromatográfica 2 - Tratamento do grupo G2 ^aEluente: C: ciclohexano; AcEt: acetato de etila; M: metanol.

4.2.4. Tratamento cromatográfico do grupo G2-3

O grupo G2-3 (119,4 mg) foi cromatografado em coluna aberta de sílica em um gradiente de polaridade: ciclohexano e acetato de etila, levando à obtenção de 114 frações que, após monitoramento por CCD, foram reunidas em 7 sub-grupos (**Tabela 6**).

O rendimento total dos grupos obtidos foi de aproximadamente 71,11%; portanto, houve uma perda de, aproximadamente, 34,5 mg do grupo G2-3, que pode ser atribuída às frações desprezadas por conterem substâncias que não se enquadravam ao perfil cromatográfico de nenhum dos grupos, além dos procedimentos laboratoriais como a transferência das frações recolhidas de uma vidraria para outra. O sub-grupo SG2-3-1 apresentou o maior rendimento (32,39%), enquanto o SG2-3-7 apresentou o menor (1,29%) em relação a G2-3.

Foram realizados os testes de atividade desses sub-grupos obtidos sobre *S. aureus* e *E. faecalis* pela técnica de autobiografia. SG2-3-4 recolhido em ciclohexano puro foi o sub-grupo ativo sobre *S. aureus* e *E. faecalis* quando monitorados por autobiografia. O sub-grupo SG2-3-4 teve um rendimento de 11,66%, correspondente a 9,9 mg. O perfil cromatográfico em CCD de SG2-3-4 visualizado em uma única banda, foi submetido à técnicas espectrométricas para determinação de estrutura molecular. O composto ativo, determinado por autobiografia pode ser também observado em SG2-3-5 (**círculo - Figura 8**).



SG2-3-5

Figura 8: Perfil em CCD (sílica gel 60F₂₅₄, Merck) de SG2-3-5 oriundo da coluna cromatográfica aberta G2-3. Eluente CCD: C 100. Revelador: vanilina sulfúrica. Substância detectada como antimicrobiana pela técnica de autobiografia (**círculo**), com presença majoritária em SG2-3-4.

Tabela 6: Os 7 sub-grupos resultantes do fracionamento de G2-3 (119,4 mg).

Grupo G2-3	Eluente ^a		Peso (mg)	Rendimento (%)
	Gradiente de polaridade	Volume total (mL)		
SG2-3-1	C (100)	960	27,5	32,39
SG2-3-2	C (100)		12,9	15,19
SG2-3-3	C (100)		11,0	12,95
SG2-3-4	C (100)		9,9	11,66
SG2-3-5	C (100)		12,1	14,25
SG2-3-6	C:AcEt (95:5)	100	10,4	12,24
SG2-3-7	C:AcEt (90:10)	80	1,1	1,29
Total		1140	84,9	71,11

Coluna cromatográfica 3 - Tratamento do grupo G2-3. ^aEluente: C: ciclohexano; AcEt: acetato de etila.

4.3 Autobiografia

A atividade bactericida dos grupos foi avaliada pela técnica de autobiografia, utilizando as espécies Gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis*, devido à atividade inicial do extrato bruto sobre essas bactérias. O grupo G2 apresentou halo de inibição em CCD eluída com C:AcEt (90:10) em $RF= 0,38$ (**Figura 9**). O grupo G11, em CCD eluída em C:AcEt (80:20) apresentou atividade no ponto de aplicação, ou seja em $RF= 0$.

O grupo G2-3 formou um halo de inibição, em CCD eluída com ciclohexano 100% em $RF= 0,29$. O sub-grupo SG2-3-4 teve um halo de inibição em CCD eluída com ciclohexano 100%, no ponto de aplicação da amostra, ou seja em $Rf= 0$.

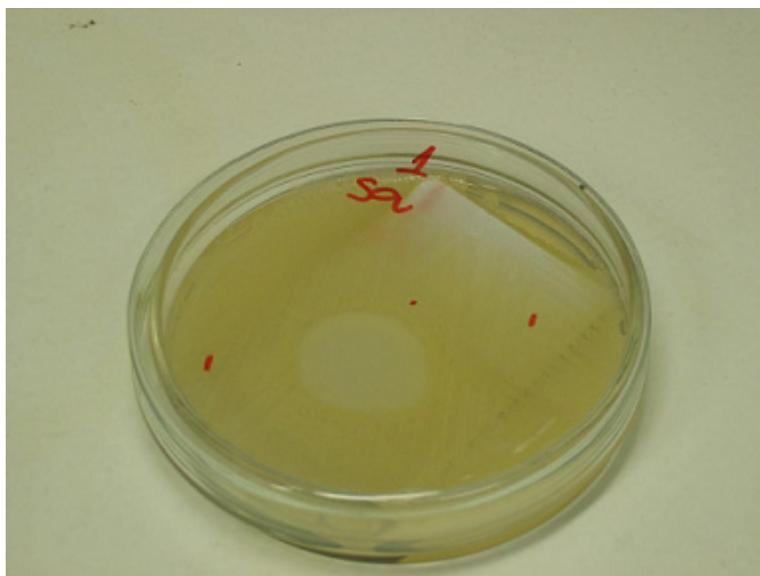


Figura 9: Autobiografia: halo de inibição do grupo G2 em *S. aureus*.

4.4 Determinação da atividade de SG2-3-4 pelo teste de difusão em ágar

O sub-grupo SG2-3-4 foi avaliado na concentração de 1 mg/mL pelo método de difusão em ágar sobre as bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri* e Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis*.

SG2-3-4 apresentou importante atividade sobre as cepas avaliadas com halos de inibição variando entre 20 e 30 mm, não apresentando atividade sobre a cepa do isolado clínico *Serratia marcescens*. Nos controles, foi confirmada a inatividade *in vitro* do DMSO, que não inibiu o crescimento bacteriano. Ampicilina, medicamento utilizado como controle positivo, apresentou atividade apenas sobre as espécies *Salmonella typhimurium* e *Proteus mirabilis*, com halos de inibição de 20 e 24 mm, respectivamente. Os resultados podem ser observados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Atividade de SG2-3-4 na concentração de 1 mg/mL pelo método de difusão em ágar.

Microorganismos	Substância 1	Controle positivo	Controle negativo
	Halo de inibição (mm)	Ampicilina	DMSO
<i>C. koseri</i>	24	0	0
<i>E. aerogenes</i>	22	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	20	0	0
<i>P. mirabilis</i>	22	24	0
<i>S. typhimurium</i>	30	20	0
<i>S. epidermidis</i>	25	0	0
<i>S. marcescens</i>	0	0	0

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de SG2-3-4

A concentração inibitória mínima (CIM) de SG2-3-4 foi determinada sobre *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, espécies previamente utilizadas pelo método autobiografia, para monitorar a atividade bactericida durante o fracionamento químico. Com o objetivo de verificar o espectro de ação deste sub-grupo, a CIM foi também determinada sobre outras bactérias Gram negativas: *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri* e Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis*.

A atividade de SG2-3-4 foi avaliada em diluições seriadas nas concentrações de 1000 a 15, 625 µg/mL, seguidas, quando necessário, de uma segunda série de diluições de 800 a 12,5 µg/mL, inibindo o crescimento de todas as espécies pelo menos nas duas primeiras diluições. A menor CIM 15,625 µg/mL foi observada para a espécie Gram positiva *S. aureus*, seguido do valor de CIM 25 µg/mL sobre a espécie Gram positiva de *S. epidermidis* e CIM 31,25 µg/mL sobre as espécies Gram positiva *E. faecalis* e Gram negativa de *S. choleraesuis*. As espécies Gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* cujo extrato bruto (hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba*) não havia apresentado atividade no teste de difusão em ágar, foram inibidas com CIM de 500 µg/mL para *E. coli* e 400 µg/mL para *P. aeruginosa*. Os resultados podem ser observados na **Tabela 8**.

Os valores de CIM correspondem a menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias.

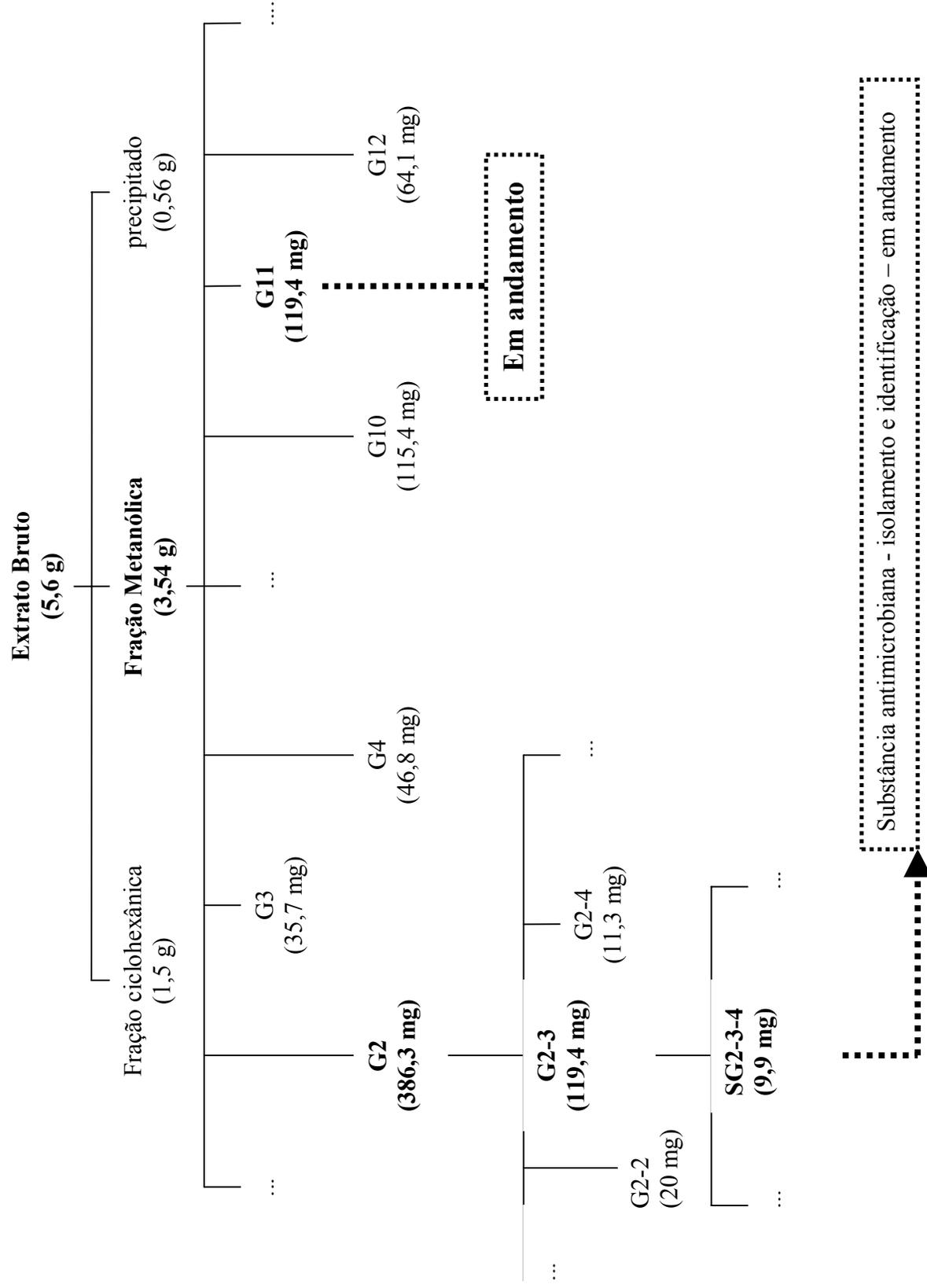
Tabela 8: Valores de CIM do extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba* e de SG2-3-4. Ampicilina: controle positivo; DMSO: controle negativo; (-): não foi testado.

Microorganismos	Extrato bruto (µg/mL)	Substância (µg/mL)	Ampicilina (µg/mL)	DMSO
<i>C. koseri</i>	-	250	7,812	Inativo
<i>E. aerogenes</i>	-	250	15,625	Inativo
<i>E. coli</i>	-	500	31,25	Inativo
<i>E. faecalis</i>	31,25	31,25	7,812	Inativo
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	7,812	Inativo
<i>P. mirabilis</i>	-	500	31,25	Inativo
<i>P. aeruginosa</i>	-	400	62,5	Inativo
<i>S. choleraesuis</i>	-	31,25	15,625	Inativo
<i>S. aureus</i>	500	15,625	7,812	Inativo
<i>S. epidermidis</i>	-	25	15,625	Inativo
<i>S. marcescens</i>	-	400	31,25	Inativo
<i>S. typhimurium</i>	-	250	15,625	Inativo

4.6 Estudos espectrométricos de SG2-3-4

SG2-3-4, obtido a partir de sucessivas colunas cromatográficas abertas do extrato hexânico da madeira do caule de *T. caraiba* (**Figura 10**); apresentou um perfil cromatográfico em CCD em uma única banda, sendo submetido à técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (^1H e ^{13}C) e bidimensional (2D) (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), cujos espectros podem ser observados no **Anexo 1**.

Figura 10 Esquema para a obtenção do sub-grupo SG2-3-4 a partir do extrato hexânico da madeira do caule de *T. caraiba*



A amostra de SG2-3-4 usada na obtenção dos espectros (**Anexo 1**) não permite deduções com a segurança suficiente para estabelecer estrutura compatível com a necessária confiança, mesmo reconhecendo-se a presença das unidades arílicas abaixo descritas (**A** e **B**). A ausência dos demais sinais para completar a estrutura, especialmente de átomos de carbono não hidrogenados (quaternários), não podem ser lidos nos espectros e, conseqüentemente, não temos condições de postular estrutura com a devida segurança, que aparentemente se revela relativamente simples. Pode-se cogitar a possibilidade estrutural da unidade capaz de ligar **A** e **B** (**Figura 11** e **Tabela 9**). Podemos observar também nesses espectros que SG2-3-4 contém ésteres etílico (**I**) e metílico (**II**), sendo o **I** em maior porcentagem (**Figura 12**).

Nessas condições, decidimos prosseguir os processos de purificação de SG2-3-4 para certificação da estrutura molecular.

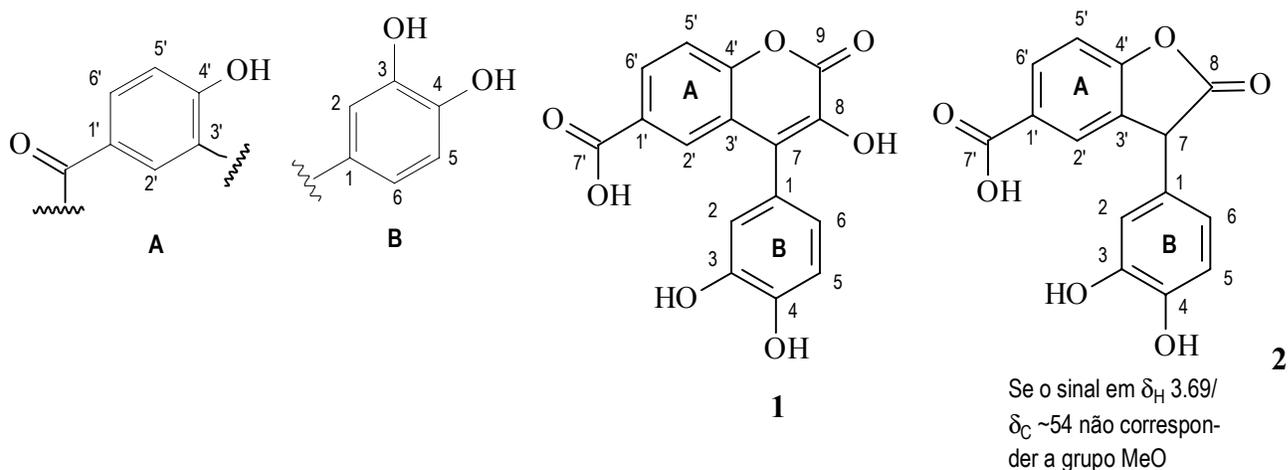


Figura 11: Unidades arílicas (**A** e **B**) reconhecidas. Possibilidade estrutural (**1** e **2**) de SG2-3-4.

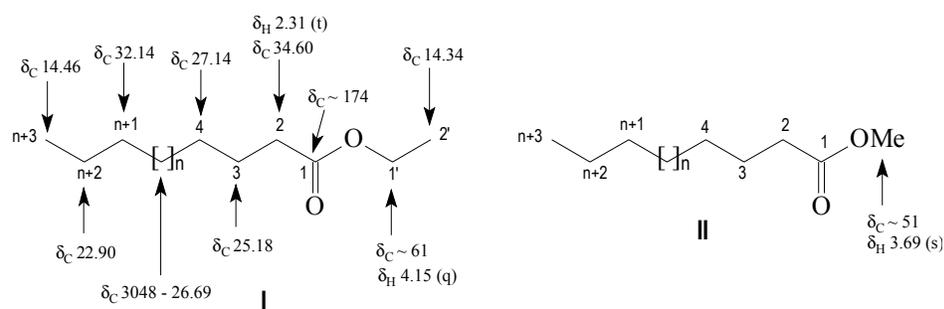
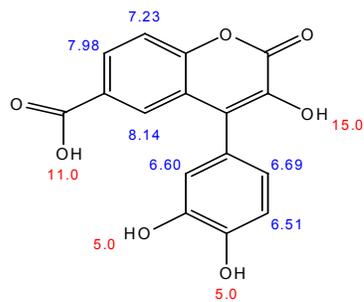


Figura 12: Ésteres etílico (I) e metílico (II) presentes em SG2-3-4.

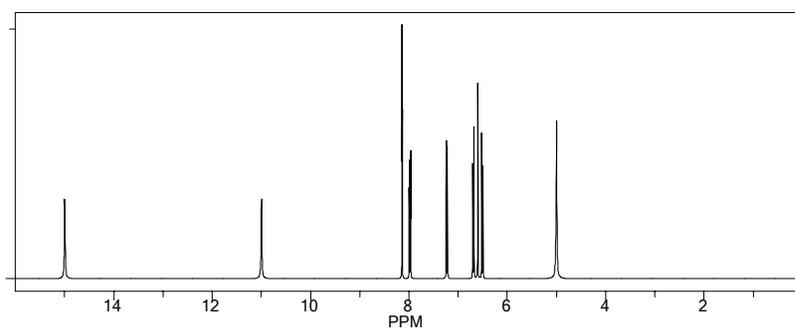
	HMQC	
	δ_C	δ_C
C		
1	125.18	-
3		-
4	151.03	-
1'	134.43	-
3'	147.94	-
4'		-
CH		
2	130.91	7.56 (d, 2.4)
5	120.95	6.96 (d, 8.7)
6	128.48	7.25 (dd, 8.7, 2.4)
2'	117.18	7.09 (d, 2.4)
5'	118.37	6.68 (d, 8.6)
6'	120.83	6.83 (dd, 8.6, 2.4)

Tabela 9: Dados preliminares de RMN.

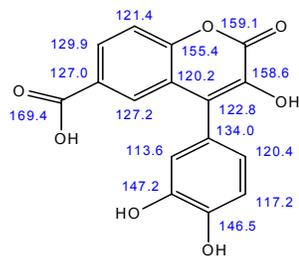
ChemNMR H-1 Estimation



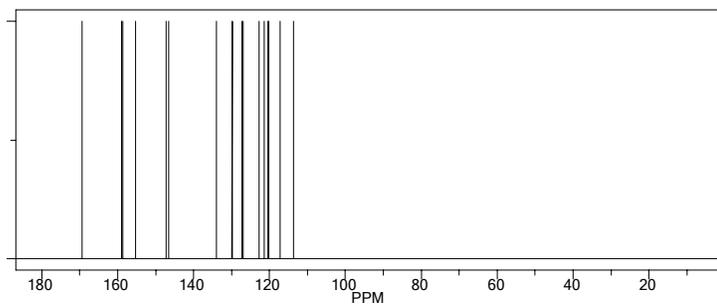
Estimation Quality: blue = good, magenta = medium, red = rough



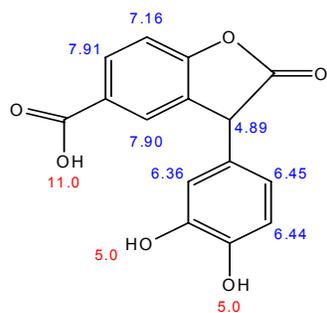
ChemNMR C-13 Estimation



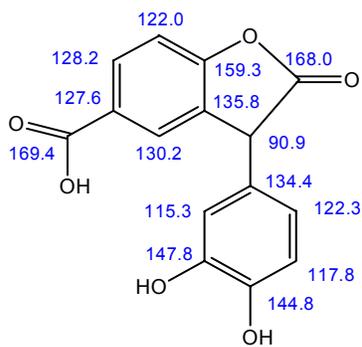
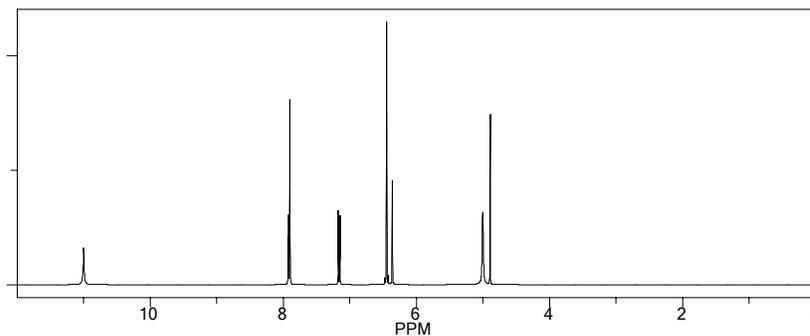
Estimation Quality: blue = good, magenta = medium, red = rough



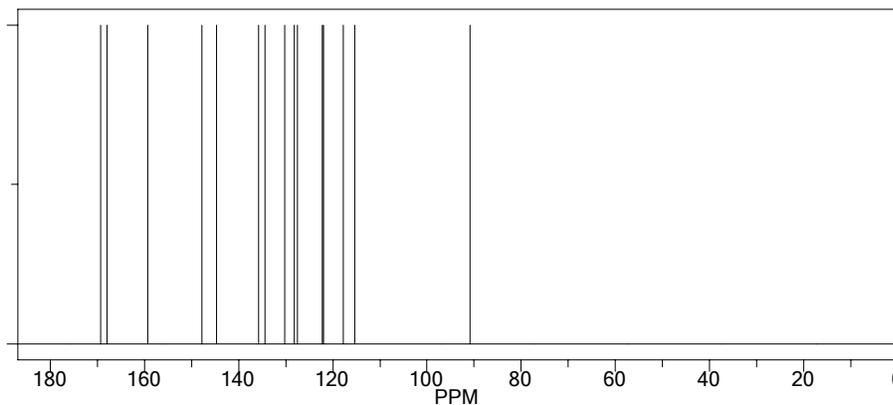
ChemNMR H-1 Estimation



Estimation Quality: blue = good, magenta = medium, red = rough



Estimation Quality: blue = good, magenta = medium, red = rough



5. Discussão

Estudos sobre as disseminações de microorganismos demonstram o aumento da resistência aos antibióticos disponíveis (Lambert, 2005) e a OMS alerta sobre o perigo do surgimento de novas doenças infecciosas, as quais os potentes antimicrobianos atuais não conseguirão combater (Goodman, 2003; OMS, 2000a) especialmente em regiões tropicais e em pacientes imunocomprometidos (OMS, 2000a). Cepas resistentes ou multi-resistentes estão surgindo continuamente (Tshikalange *et al.*, 2005). O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na clínica, seleciona os microorganismos resistentes com alto poder de infecção e disseminação, causando infecções que matam milhões de pessoas por ano (Cunha, 2001). Em efeito, a pressão seletiva de variantes e genes resistentes resulta do extenso uso de antimicrobianos, anti-sépticos e desinfetantes na prática médica, veterinária e agricultura (Jeljaszewicz, 2000). Falhas na terapia antibiótica pode resultar na tolerância das bactérias ao composto, que torna-se apenas bacteriostático e não mais bactericida (Lambert, 2005). O surgimento de cepas bacterianas resistentes como *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA), *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina (VISA), *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Enterococcus* multidrogas resistentes e várias outras impõe o desenvolvimento de novos medicamentos (Lambert, 2005).

A pesquisa com produtos naturais possibilita identificar novos metabólitos com potencial terapêutico, além de que a descoberta de novos modos de ação é uma valiosa alternativa na corrida por novas moléculas com atividade antimicrobiana. Bioprospecções mostram o grande potencial de novos agentes bactericidas oriundos de plantas (Mahady, 2005; Arias *et al.*, 2004). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, com 2 milhões Km² e 44% da flora endêmica (Klink & Machado, 2005). Pesquisas prévias com o Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado/Farmacognosia/UnB confirmam que a grande

diversidade de metabólitos secundários da rica flora do Cerrado possibilita a pesquisa de substâncias ativas (Coelho *et al.*, 2006; Napolitano *et al.*, 2005; Mesquita *et al.*, 2005a, 2005b; Rodrigues *et al.*, 2005; Espindola *et al.*, 2004).

Este trabalho utilizou diferentes estratégias químicas e biológicas visando o isolamento de moléculas bactericidas em extratos de plantas. Para tanto, foram conduzidos estudos de triagem do Banco de Extratos de Plantas (Farmacognosia/UnB) sobre bactérias patogênicas a seres humanos: cepas Gram positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e cepas Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*; e sobre o fungo *Candida albicans*. Foi selecionado o extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba*, ativo sobre as bactérias Gram positivas, para o fracionamento químico biomonitorado, objetivando a obtenção de compostos vegetais responsáveis pela atividade. O sub-grupo ativo foi testado sobre as bactérias Gram positivas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram negativas: *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens* (isolado clínico), *Proteus mirabilis* (isolado clínico), *Citrobacter koseri* (isolado clínico); com resultados que definem seu amplo espectro de ação.

A perspectiva é a utilização futura de moléculas promissoras como modelo para fabricação de compostos ativos, que possam conduzir a criação de novos tratamentos bactericidas. Em efeito, esse trabalho é o primeiro de uma linha de pesquisa iniciada em nosso laboratório, que pretende selecionar moléculas com ação bactericida específica, criando assim perspectivas de estudos, que possam contribuir para diminuir a ameaça que representa hoje as doenças bacterianas em humanos. Pretendemos criar um banco de substâncias importante para resguardar as moléculas do Cerrado e propiciar futuros estudos; promover o conhecimento dos metabólitos produzidos pelas plantas deste vasto bioma; obter marcadores químicos

específicos de plantas com atividade bactericida, contribuindo para a sistematização da obtenção de novos compostos; possibilitar o cultivo em larga escala das plantas produtoras das moléculas ativas selecionadas fornecendo matéria-prima para a indústria. Por fim, esperamos em uma próxima etapa, promover o entendimento dos mecanismos de ação de moléculas ativas, com a perspectiva de obtenção de novos medicamentos.

Alguns estudos já demonstraram a atividade antibacteriana de extratos brutos e substâncias puras de plantas do Cerrado (Pimenta *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2000; Alcerito *et al.*, 2002). Nosso estudo permitiu, após a triagem de 242 extratos brutos, identificar 20 extratos que inibiram o crescimento de uma a duas bactérias, dentro as cinco cepas utilizadas na triagem, sendo que, dentre esses 17 inibiram cepas Gram positivas *Enterococcus faecalis* e/ou *Staphylococcus aureus* e 2 inibiram a cepa Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*; e 1 extrato inibiu o crescimento do fungo *Candida albicans*. Dentre esses 20 extratos ativos, 13 eram hexânicos (apolares), sendo 6 provenientes do caule e 5 da raiz; e 7 etanólicos (polares), sendo 2 provenientes do caule e 3 da raiz. Os outros eram 3 extratos de folhas e 1 de fruto. Ou seja, observamos importante atividade dos extratos hexânicos de caule e raiz. Alguns estudos dizem que os extratos metanólicos são mais efetivos, pois este solvente é melhor para extrair substâncias antimicrobianas de plantas quando comparado com outros solventes (Chandrasekaran, 2004; Eloff, 1998).

Bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* são os principais agentes de infecções nosocomiais e comunitárias (Jeljaszewicz, 2000). A apolaridade da maioria dos antimicrobianos disponíveis explica uma maior atividade frente as cepas Gram positivas, tornando-as alvos mais susceptíveis aos antibióticos do que as cepas Gram negativas, que apresentam resistência mecânica (Jeljaszewicz, 2000; Tavares, 2001). Isto se deve a diferença química e morfológica da parede celular dessas bactérias. A parede celular de Gram negativas é constituída por uma ou mais camadas semipermeáveis de

peptídeoglicanos, de aspecto bastante complexo, e ainda uma membrana externa, onde se encontram os lipopolissacarídeos (LPSs), fosfolipídeos e poros por onde substâncias polares ou de baixo peso molecular conseguem entrar mais facilmente. Os LPSs servem como uma barreira eficiente contra a rápida penetração de antibióticos lipofílicos e impedem a entrada de substâncias hidrofílicas, conferindo resistência natural a estas cepas (Kuzma, 2006; Lambert, 2002). As Gram positivas, ao contrário, possuem apenas uma única camada de peptídeoglicanos, espessa e permeável, organizada de forma homogênea que usualmente facilita a rápida penetração dos fármacos antimicrobianos (Lambert, 2002). Após a triagem do banco pelos testes de difusão em ágar, o extrato que escolhemos para esse estudo, apolar (extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba*), foi ativo sobre as Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e inativo sobre as Gram negativas. Porém, o sub-grupo SG2-3-4 deste extrato, também apolar, após triagem sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentou amplo espectro de ação, tanto nos testes de difusão em ágar, como nos testes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O sub-grupo apolar conseguiu atravessar facilmente a camada de peptídeoglicanos e então agir nas cepas Gram positivas. Já em Gram negativas, podemos supor uma entrada lenta do sub-grupo através da membrana externa de lipopolissacarídeos, permitindo sua ação. Além disso, o sub-grupo contém o composto ativo concentrado, diferentemente de sua concentração no extrato bruto, que é uma mistura de substâncias que podem interagir entre si de forma sinérgica ou antagonista. Os halos de inibição obtidos com a ampicilina, controle positivo em *E. faecalis* (22 mm) e *S. aureus* (20 mm) foram similares aos resultados obtidos com o extrato bruto (20 e 22 mm respectivamente).

Observamos também que 4 extratos brutos, pertencentes a família Annonaceae e Zingiberaceae, que não inibiram o crescimento das bactérias utilizadas na triagem, foram capazes de formar um halo incolor em volta do disco de papel, no teste de difusão em ágar

com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Em efeito, a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) produz um pigmento azul denominado piocianina, que em meio ágar Müller Hinton possui coloração verde. Portanto esse halo incolor correspondia a inibição da produção do pigmento produzido por essa bactéria, mas não à inibição do crescimento da bactéria, que continuava a ser visualizada nesse halo. A literatura descreve que 6 a 10% do genoma de *P. aeruginosa* é controlado por quorum-sensing, sendo a maioria desses genes de virulência (Le Berre *et al.*, 2006). Ou seja, a inibição da produção de piocianina pela *P. aeruginosa*, indica bloqueio do quorum-sensing, que é um sistema de comunicação entre as bactérias com a difusão de pequenas moléculas sinalizadoras através das membranas bacterianas. Essa linguagem permite que as bactérias coordenem seus comportamentos em relação ao meio ambiente. Assim, quando a densidade bacteriana aumenta, a quantidade dessas moléculas crescem até atingir um pico que provoca a ativação ou repressão de certos genes no conjunto de bactérias. Entre esses genes estão os envolvidos na virulência e regulação do crescimento da colônia. Novas terapias bloqueando o quorum-sensing parecem promissora. Esses inibidores tem um modo de ação diferente dos antibióticos e a princípio não levam a resistência (Adonizio *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2006; Le Berre *et al.*, 2006; Fuqua *et al.*, 2002; Neilson *et al.*, 1970).

A piocianina penetra facilmente em membranas biológicas e causa entre outros problemas a inibição da liberação de prostaciclina pelas células endoteliais e induz a apoptose em neutrófilos via radicais livres (Denning *et al.*, 1998). A inibição da piocianina, indica inibição da virulência, o que poderá ajudar o sistema imune do hospedeiro a combater a infecção. Assim, esse é um alvo atrativo para a ação de novos compostos antimicrobianos. O mecanismo pelo qual um composto inibe a produção de piocianina e assim o quorum-sensing ainda não foi elucidado. Entretanto, algumas possibilidades são citadas como a degradação ou inibição da síntese do sinalizador 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS); ou o impedimento do

receptor do PQS; ou a inibição da expressão do sistema que sintetiza o sinalizador (Le Berre *et al.*, 2006).

A literatura sugere que se um extrato ou composto vegetal diminui o crescimento ou inibe algum fator de virulência controlado por quorum-sensing, pode indicar que estes estejam afetando a síntese do sinalizador, diminuindo dessa forma os sinais indutores (Le Berre *et al.*, 2006), visualizados no nosso experimento pela inibição do pigmento. Na literatura poucos são os trabalhos que observaram a inibição do pigmento produzido pelas bactérias. Já foram relatados atividade anti quorum-sensing do extrato etanólico das folhas de *Conocarpus erectus*, *Bucida burceras*, *Callistemon viminalis*, *Tetrazygia bicolor*, *Quercus virginiana*, do extrato etanólico da inflorescência de *Callistemon viminalis* e do extrato etanólico de partes aéreas de *Chamaesyce hyperricifolia* (Adonizio *et al.*, 2006). Substâncias extraídas do alho e as furanonas de *Delisea pulchra* já demonstraram inibir a cascata de produção dos autoindutores, responsáveis pelo quorum-sensing (Persson, 2005). O extrato metanólico da semente de *Pisum sativum* inibiu a violaceína, um pigmento roxo de *Chromobacterium violaceum*; , porém induziu a produção de autoindutores de outras cepas como *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, indicando aumento da atividade de quorum-sensing (Teplitki, 2000).

Os compostos obtidos da casca de espécies de *Tabebuia* ssp., conhecida como pau d'arco é utilizado tradicionalmente para tratamento de úlceras, sífilis, problemas gastrointestinais, candidíase, câncer, diabetes, prostatites, constipação e alergias (Park, 2006). Substâncias antimicrobianas já foram isoladas de *T. impetiginosa* (**Figura 13**).

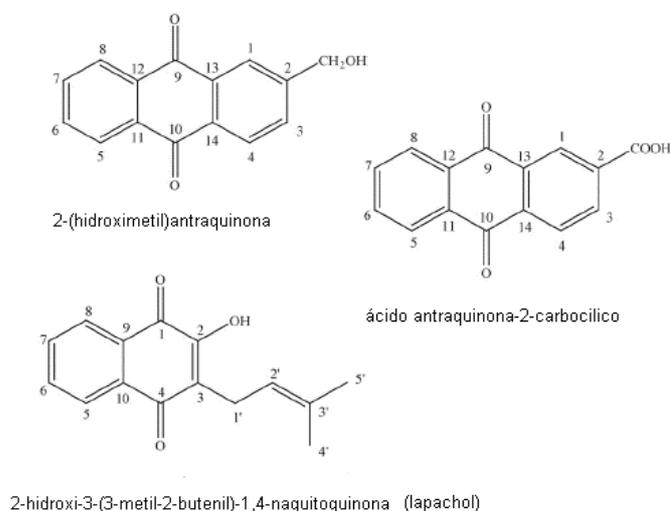


Figura 13: Constituintes da madeira do caule de *Tabebuia impetiginosa* com atividade antimicrobiana (Park, 2006).

Tabebuia avellanedae é bastante conhecida pela presença de lapachol, importante naftoquinona com atividade antimicrobiana comprovada (Pereira, 2006). Esse composto não foi detectado no nosso extrato hexânico da casca do caule de *Tabebuia caraiba*, pelo método de cromatografia em camada delgada, revelada com potassa alcóolica, revelador específico de naftoquinonas. Estudo da casca do caule de *T. aurea* (Barbosa Filho *et al.*, 2004) identificou a presença dos compostos β -sistosterol; metilcinamato; etil p-hidroxi-cinamato; ácido betulínico; ácido veratríco; 3,4',5-trihidroxi-7-metoxi flavona, todos, com excessão do ácido betulínico, ativos sobre *S. aureus* e *E. faecalis*. E o composto etil p-hidroxi-cinamato apresentou atividade sobre a cepa Gram negativa *E. coli* e sobre o fungo *C. albicans*. As estruturas químicas dos compostos podem ser observados na **Figura 14**.

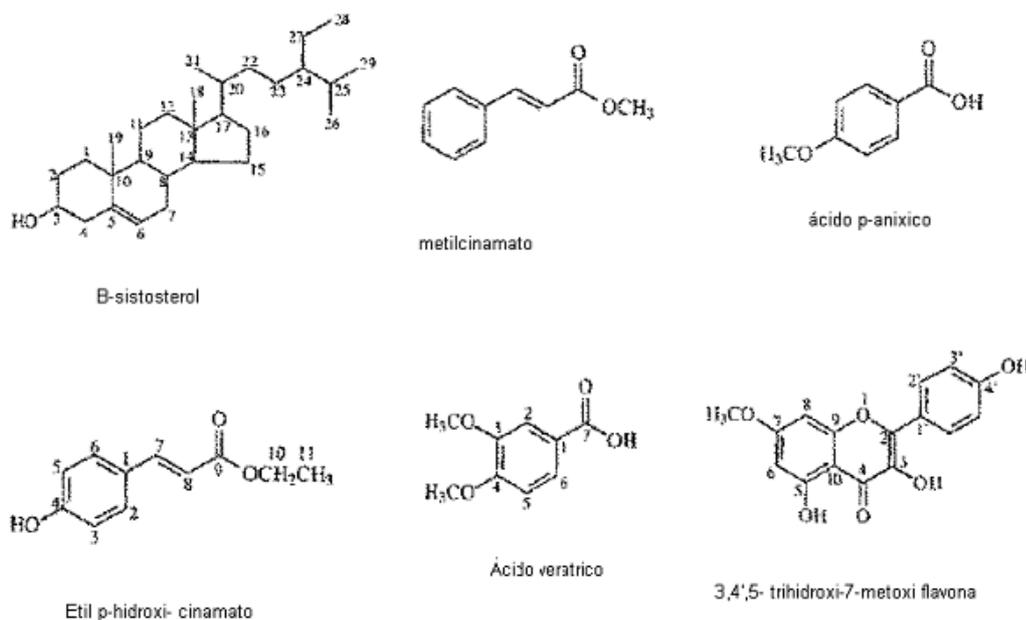


Figura 14: Compostos antimicrobianos extraídos da casca do caule de *Tabebuia aurea*

Alves (2000) realizou uma triagem com extratos de plantas do Cerrado sobre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Bacillus cereus*. Entre as espécies avaliadas estavam *Pouteria torta*, *Anonna crassiflora*, *Xylopia aromatica* e *Tabebuia caraiba*. Nenhuma atividade foi atribuída para o extrato de *T. caraiba*. Os extratos metanol-diclorometano (1:1) e aquoso da folha de *A. crassiflora* foram ativos sobre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. O extrato metanólico da folha de *P. torta* mostrou-se ativo sobre *S. aureus*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*. Os extratos metanol-diclorometano (1:1) e aquoso da casca do caule de *X. aromatica* foram ativos em *S. aureus* e *B. cereus*, e o aquoso foi também ativo sobre *P. aeruginosa*. Essas quatro espécies avaliadas por Alves (2000), em nossa triagem não apresentou atividade, certamente devido a menor concentração (1 mg/mL) do extrato utilizada em nosso estudo. Apenas o nosso extrato etanólico da folha de *P. torta* foi parcialmente ativo sobre *E. faecalis*, mas não foi ativo sobre *S. aureus*.

As substâncias aromáticas, como os flavonóides e cumarinas (**Figura 15**), são metabólitos secundários produzidos pelas plantas para se defenderem de predadores como *Albernaz L.C.*

fungos e bactérias fitopatogênicas, e são o maior grupo de substâncias extraídas de vegetais com atividade antimicrobiana relatada. Polifenóis lipofílicos complexam com proteínas presentes na parede celular, e conseguem rompê-la dessa maneira (Cowan, 1999). O subgrupo ativo SG2-3-4 do extrato hexânico da madeira do caule de *Tabebuia caraiba*, parece corresponder a uma aril-cumarina, com anel de 6 membros (**1 – Figura 11**) ou a uma benzo-furanona, com anel de 5 membros (**2 – Figura 11**).

Anemopaegma arvense, espécie pertencente a família Bignoniaceae, como *T. caraiba*, teve seus extratos hexânicos do caule e raiz ativos sobre *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, com halos de inibição de até 20 mm. Não existem relatos sobre a atividade desta planta como bactericida, sendo apenas reportada a sua utilização popular em todas as regiões do Cerrado como afrodisíaco (Lorenzi, 2002). Uchino (2004) relatou a atividade protetora de compostos isolados de *Anemopaegma mirandum*, catequina e cinchonina I e II, sobre a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio em ensaios com β -hexosaminidase.

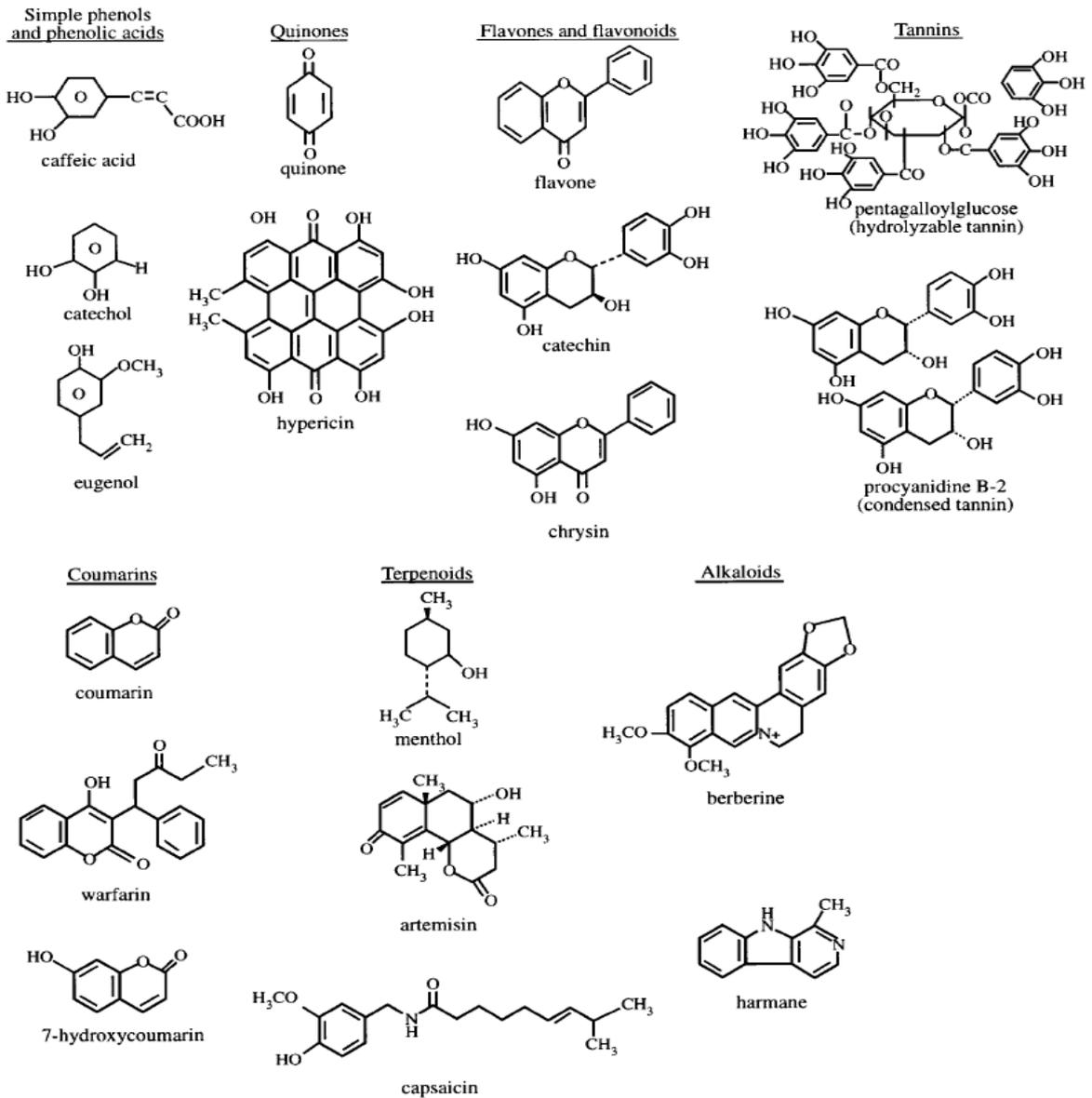


Figura 15: Estruturas de substâncias antimicrobianas extraídas de plantas (Cowan, 1999)

6. Conclusão

Estudos de triagem do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado (Farmacognosia/UnB) sobre três espécies Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028) e duas espécies Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e um fungo: *Candida albicans* (ATCC 10231), permitiram selecionar o extrato hexânico de madeira do caule de *Tabebuia caraiba*. Esse extrato apresentou atividade nos testes *in vitro* sobre as bactérias Gram positivas, com halos de inibição de 22 mm em *S. aureus* e 20 mm em *E. faecalis*. O extrato não foi ativo sobre as bactérias Gram negativas e sobre o fungo.

O fracionamento químico biomonitorado possibilitou a obtenção de 24 grupos reunidos de acordo com sua semelhança identificada por cromatografia em camada delgada. Esses foram testados por autobiografia em *S. aureus* e *E. faecalis*.

Os grupos mais ativos foram G2 e G11, dos quais temos resultados promissores para o G2. A purificação do grupo G2 possibilitou a obtenção do sub-grupo SG2-3-4 com rendimento de 11,66%. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de SG2-3-4, indicando um amplo espectro de ação, com a obtenção de atividade bastante significativa para *Salmonella choleraesuis* (CIM= 31,25 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (CIM= 31,25 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM= 15,625 µg/mL) e *Staphylococcus epidermidis* (CIM= 25 µg/mL).

O sub-grupo SG2-3-4 apresenta unidades arílicas, cujos espectros permitem cogitar a possibilidade estrutural da unidade capaz de ligá-las. Observamos ainda a presença de ésteres etílico (I) e metílico (II). SG2-3-4 encontra-se em processo de purificação para decisão da estrutura molecular.

Nosso estudo constatou ainda que duas famílias vegetais estudadas, Annonaceae e Zingiberaceae, possuem espécies com extratos capazes de inibir a produção de piocianina, pigmento produzido pela bactéria *P. aeruginosa*; o que pode ser um indicativo de inibição do mecanismo de quorum-sensing, responsável pela produção do pigmento.

7. Perspectivas

- ✓ Finalizar estudo químico de SG2-3-4 para confirmação da estrutura molecular.
- ✓ Prosseguir estudo químico de G11.
- ✓ Obter dados de atividade antimicrobiana de compostos isolados de G11.
- ✓ Elucidar as substâncias bactericidas de G11 por meio de técnicas espectrométricas (IV, UV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , EM).
- ✓ Submissão de artigo sobre a atividade antimicrobiana dos compostos ativos de *Tabebuia caraiba* sobre diferentes bactérias Gram positivas e Gram negativas.
- ✓ Finalizar o estudo químico biomonitorado dos extratos hexânicos do caule de *Anemopaegma arvense* e da madeira do caule de *Pouteria ramiflora*.
- ✓ Realizar o estudo químico biomonitorado dos extratos inibidores de piocianina.

8. Bibliografia

ADONIZIO, A.L; DOWNUM, K; BENNETT, B.C; MATHEE, K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105 (3), p.424-435, 2006

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 62, p. 173-182, 1998

AHMAD, I ; BEG, A. Z. Antimicrobial and Phytochemistry studies on 45 Indian medicinal plants against mult-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p.113-123, 2001

ALCERITO, T ; BARBO, F.E ; NEGRI, G. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 677-683, 2002

ALVES, T.M.A ; SILVA, A.F ; BRANDÃO, M. Biological Screening of Brazilian Medicinal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000

ÂNGULO, F ; JOHNSON, D ; TAUXE, R ; COHEN, M. Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Microbial Drug Resistance*, v. 6(1), p. 77-83, 2000

ARIAS, M.E; GOMEZ, J.D; CUDMANI, N; VATTUONE, M.A; ISLA, M.I. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extract of *Acacia aroma* Gill ex Hook et. *Life Science*, v. 75, p. 191–202, 2004

BARBOSA-FILHO, J. M; LIMA, C.S.A; AMORIM, E.L.C; DE SENA, K.X.F.R; ALMEIDA, J.R.G.S; DA-CUNHA, E.V.L; SILVA, M.S; AGRA, M.F; BRAZ-FILHO, R. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. *Phyton*, p.221-228, 2004

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC/FDA/USDA. National antimicrobial Monitoring System 1996-1999. Annual Report, Atlanta, GA. Disponível em : www.cdc.gov/narms/publicações. Acessada em 13 de março de 2006

CEREDA, R.F ; SADER, H.S ; JONES, R.N ; SEJAS, L ; MACHADO, A.M ; ZANATTA, Y.P ; REGO, S.T.M.S ; MEDEIROS, E.A.S. *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA Phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 5, p. 40-46, 2001

CHANDRASEKARAN, M; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 105-108, 2004

COELHO, A.A.M; DE PAULA, J.E; ESPÍNDOLA, L.S. Insecticidal Activity of Cerrado Plant Extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under Laboratory Conditions. *Neotropical Entomology*, v.35, p.133-138, 2006

- CORRÊA, P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Agricultura, 1969 a 1978, v. II, p. 66
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 564-582, 1999.
- CUI, L; IWAMOTO, A; LIAN, J; NEOH, H; MARUYAMA, T; HORIKAWA, Y; HIRAMATSU, K. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50 (2), p.428-438, 2006
- CUNHA, B. A.; Antibiotic resistance. Control strategies. *Crit Care Clinical*, v. 14, p. 309-327, 1998
- CUNHA B.A. Antibiotic resistance. *The Medical clinics of North America*, v. 84, p. 1407-1429, 2000
- CUNHA B.A. Effective antibiotic-resistance control strategies. *The Lancet*, v. 357, p. 1325-1326, 2001
- D'ALBUQUERQUE, I.L. Termorreação da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butanil)-1,4- naftoquinona. In: In vitro activity of Brazilian Medicinal Plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 21, p. 279-284, 2003
- DANELUTTE, A.P; LAGO, J.H; YOUNG, M.C.M; KATO, M.J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, v. 64, p. 555-559, 2003
- DENNING, G.M; RAILSBACK, M.A; RASMUSSEN, G.T; COX, C.D; BRITIGAN, B.E. *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *American Journal Physiology*, v. 274(6), p. L893-L900, 1998
- DUTHIE, G ; CROZIER, A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, v. 11, p. 43-47, 2000
- EL-AZIZI M ; RAO S ; KANCHANAPOOM T ; KHARDORI N. In vitro activity of vancomycin, quinpristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of *Staphylococci*. *Annals Clinical Microbiological Antimicrobial*, v. 4, p. 1-9, 2005
- ELOFF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.60, p.1-8,1998
- EL-SEEDI, H.R; OHARA, T; SATA, N; NISHIYAMA, S. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 293-296, 2002.

ESPINDOLA, L.S; VASCONCELOS, J.R.J; MESQUITA, M.L; MARQUIE, P; DE PAULA, J.E; MAMBU, L; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Medica*, v.70, p.1093-1095, 2004

FERRARI, L; LAVARONE, L; BRAGGIO, S; DI MODUGNO, E. *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetics-pharmacodynamics of GV143253A, a novel trinem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 770-776, 2003

FIGLIOLINI, C ; ACAR, J.F. Quelle attitude avoir face aux résistances bactériennes aux antibiotiques en médecine interne. *La Revue de médecine interne*, v. 19, p. 233-235, 1998

FUQUA, C; GREENBERG, P.E. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews*, v.3, p.685-695, 2002

FUDA, C; SUVOROV, M; VAKULENKO, S.B; MOBASHERY, S. The basis for resistance to B-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2^a (PBP2a) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological and Chemistry*, v. 279 (39), p. 40802-40806, 2004.

FUX, C.A ; STOODLEY, P ; HALL-STOODLEY, L ; COSTERTON, J.W. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 1, p. 667-683, 2005

GEST, H. The Discovery of Microorganisms Revisited. *ASM News*, v. 70 (6), p.269-274, 2004

GIVSKOV, M; EBERL, L; MOLIN, S. Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 148, p. 115-122, 1997

GOODMAN & GILMAN. *As bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10^a. Ed., Editora: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003

GROSVENOR, P.W; SUPRIONO, S; GRAY, D.O. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2, Antibacterial and Antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 97-111, 1995

HANCOCK, R.E.W. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infectious Diseases*, v. 5, p. 209-218, 2005

HARAGUCHI, H; KUWATA, Y; INADA, K; SHINGU, K; MIYAHARA, K; NAGAO, M; YAHI, A. Antifungal activity from *Alpinia galanga* and the competition for incorporation of unsaturated fatty acid in cell growth. *Planta Médica*, v. 62, p. 308-313, 1996.

HARBORNE, J. B ; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000

HEINRICH, M; BARNES, J; GIBBONS, S; WILLIAMSON, E. M; Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy In: *Medicinal plants and antimicrobial activity*, Rios, J.L.; Recio, M.C. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80-84, 2004

HERRERA, R.M; PEREZ, M; MARTIN-HERRERA, D.A; LOPEZ-GARCIA, R; RABANAL, K.M. Antimicrobial activity of extrats from plants endemics to the Canary Islands. *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 364-366, 1996

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1, p. 147-155, 2001

HOLTEZ, F.B ; PESSINI, G.L ; SANCHES, W.R ; CORTEZ, D.A.G ; NAKAMURA, C.V ; DIAS, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. *Memórias do instituto Oswaldo Cruz*, v. 97(7), p. 1027-1031, 2002

HOOPER, D.C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Update*, v. 2, p. 38-55, 1999

JELJASZEWICZ, J; MLYNARCZYK, G; MLYNARCZYK, A. Current threats of antibiotic resistance in bacteria. *Blok Operacyjny*, v. 3 (4), p. 49-55, 1998

JELJASZEWICZ, J; MLYNARCZYK, G; MLYNARCZYK, A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, p.473-478, 2000

KLINK C.A. & MACHADO R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1, 147-155, 2005

KURAZONO, M; IDA, T; YAMADA, K; HIRAI, Y; MARUYAMA, T; SHITARA, E; YONEZAWA, M. In vitro activities of ME1036 (CP5609), a novel parenteral carbapenem, against methicilin-staphylococci. *Antimicrobibial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 2831-2837, 2004.

KUZMA, L ; ROZALSKI, M ; WALENCKA, E ; ROZALSKA, B ; WYSOKINSKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine*, *in press/on line*, 2006

LAGROTA, M.H ; WIGG, M.D ; AGUIAR, A.N. Antiviral activity of naphthoquinones I-Lapachol derivateves against enteroviruses. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 28, p. 221-226, 1986.

LAMBERT, P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied microbiology Symposium Supplement*, v. 92, p. 46S-54S, 2002

LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57 (10), p. 1471-1485, 2005

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents Chemoterapy*, v. 45, p. 999-1007, 2001

LE BERRE R; FAURE K; NGUYEN S; PIERRE M; ADER F; GUERY B. Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*? *Médecine et Maladies Infectieuses*, *in press/on line*, 2006

LEE, J.H ; CHEANG, J ; PARK, Y.M ; CHOI Y.H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacological Research*, v. 51, p. 553-560, 2005

LIVERMORE, D.M. The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology Infectious*, v. 10(4), p. 1-9, 2004

LIZAWADA, Y; NAGAI, J; ISHIKAWA, T; HASHIGUCHI, M; NAKAO, M; MIYAKE, A; OKONOGLI, K. In vitro antimicrobial activity of t-91825, a novel anti-MRSA cephalosporin, and in vivo anti-MRSA activity of its prodrug, TAK-599. *The Journal Infectious Chemotherapy*, v.10, p.: 146-156, 2004.

LORENZI, H ; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2002

MACHADO, R.B., M.B. RAMOS NETO, P.G.P. PEREIRA, E.F. CALDAS, D.A. GONÇALVES, N.S. SANTOS, K. TABOR E M. STEININGER. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>. Acesso em 20 de maio de 2006.

MAHADY, G.B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial. *Current Pharmaceutical Design*, v.11 (19), p.2405-2427, 2005

MATOS, F.J.A. Farmacias Vias, EUFC, Fortaleza, p.179, 1994

MEAD, P.S ; SLUTSKER, L ; DIETZ, V ; MCCAIG, L.F ; BRESEE, J.S ; SHAPIRO, C ; GRIFRM, P ; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 5, p. 607-625, 1999

MELLENDEZ, P.A; CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, v. 13 (4), p. 272-276, 2005

MENG, J.C; ZHU, Q.X; TAN, R.Y. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soreseris hookeriana* subsp. Erysimoids. *Planta Médica*, v. 66, p. 541-544, 2000.

MESQUITA, M.L., DESRIVOT, J., BORIES, C., FOURNET, A., DE PAULA, J.E., GRELLIER, P., ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100 (7), p.783-787, 2005a

MESQUITA, M.L., GRELLIER, P., BLOND, A., BROUARD, J.-P., DE PAULA, J.E., ESPINDOLA, L.S; MAMBU, L. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p.4499-4506, 2005b

MORENS, D.M; FOLKERS, G.K; FAUCI, A.S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, v.430, p.242-249, 2004

MORI, A; NISHINO, C; ENOK, N; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2231-2234, 1987

NAPOLITANO, D.R; MINEO, J.R; DE SOUZA, M.A; DE PAULA, J.E; ESPINDOLA, L.S; ESPINDOLA, F.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.37-41, 2005

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6. Wayne, Pennsylvania, 2003

NEALSON, KH; PLATT, T; HASTINGS, J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *The Journal of Bacteriology*, v.104 p.313-322, 1970

NISHINO, C; ENOKI, N; TAWATA, S; MORI, A; KOBAYASHI, K; FUKUSHIMA, M. Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 51, p. 139-143, 1987

ORDÓÑEZ, A.A; CUDMANI N.M; GOMEZ D; VATTUONE M.A; ISLA M.I. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq) Swartz. *Microbiology Ecology in Health and Disease*, v.15, p.33-39, 2003

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS/WHO), 1998. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Geneve.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS/WHO), 1999. Medicines are losing their effectiveness, chapter 12. Disponível em: <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/ch12text.html>. Acessado em 20 de abril de 2006

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). World Health Report on Infections Disease, 2000a - Vencendo a resistência microbiana, 2000. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html>. Acessada em 14 de fevereiro de 2006

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - Statistical Information System (WHOSIS), 2000b. Disponível em: www.who.int/child-adolescent-health/OVERVIEW/CHILD_HEALTH/child_resistance.htm. Acessado em 10 de janeiro de 2006

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS/WHO), 2003. Disponível em: www.who.int/childadolescenthealth/OVERVIEW/CHILD_HEALTH/child_resistance.htm

PALOMBO, E. A; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 151-57, 2001

PARK, B.S; LEE, H.K; LEE, S.E; PIAO, X.L; TAKEOKA, G.R; WONG, R.Y; AHN, Y.J; KIMA, J.H. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105, p. 255-262, 2006

PEREIRA, E.M; MACHADO, T.B; LEAL, I.C.R; JESUS, D.M; DAMASO, C.R.A; PINTO, A.V; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M.; KUSTER, R.M; DOS SANTOS, K.R.N. Methicillin-resistant Staphylococcal cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 5, 2006

PERSSE, T; HANSEN, T.H; RASMUSSEN, T.B; SKINDERSO, M.E; GIVSKOV, M; NIELSEN, J. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 3, p. 253-262, 2005

PIMENTA, F.C ; DA SILVA, H.H.G ; ITO, I.Y ; GUIMARÃES, V.P ; DA SILVA, I.G. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de *Magonia pubescens* St.Hil (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*, v. 29(1), p. 35-43, 2000.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 44(9), p. 2233-2241, 2000

PORTILLO, A; VILA R; FREIXA, B; ADZET, T; CAÑEGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 93-98, 2001

RASMUSSEN, T.B ; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, p. 149-161, 2006

RATTER, J.A; RIBEIRO, J.F; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany*, v. 80, p. 223-230, 1997

RODRIGUES, A.M.S; DE PAULA, J.E; ROBLOT, F; FOURNET, A; ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia*, v.76, p.755-757, 2005

SALVAT, A; ANTONNACCI, L; FORTUNATO, R.H; SUAREZ, E.Y; GODOY, H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, p. 293-297, 2001

SASTRY, V; BRENNAN P. J; LEVY M.M; FISHMAN, N; FRIEDMAN, A.L; NAJI, A; BARKER, C.F; BRAYMAN, K.L. Vancomycin-resistant enterococci: an emerging pathogen in immunosuppressed transplant recipients. *Transplant Proc*, v. 27, p. 954-955, 1995

SALMONELLA SUBCOMMITTEE OF NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MICROBIOLOGY (1900). The Genus *Salmonella* Lignières JHY8, v.34, p.333-350

SCHACHTER, B. Slimy Business - the biotechnology of biofilms in: Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine, in press/on line*, 2006

SCHWARZ, S ; KEHRENBURG, C. Old dogs that learn new tricks : Modified antimicrobial agents that escape pre-existing resistance mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology, in press/on line*, 2006

SEVERIN, A; TABEL, K; TENOVER, F; CHUNG, M; CLARKE, N; TOMASZ, A. High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal mec A and the enterococcal van A gene complex. *The Journal of Biological and Chemistry*, v. 279, p. 3398-3407, 2004

SHIBATA, H; KONDO, K; KATSUYAMA, R; KAWAZOE, K; SATO Y; MURAKAMI, K; HIGUTI, T. Alkyl Gallates, Intensifiers of B-lactam Susceptibility in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, v. 49 (2), p. 549-555, 2005

SLUSARENKO, A.J ; LONGLAND, A.C ; WHITEHEAD, I.M. Convenient, sensitive and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. *Botanica Helvetica*, v. 99 (2), p. 203-207, 1998

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

SRINIVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P.L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 217-220, 2001

TAVARES, W. Manual de antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos, 3ª. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001

TAWATA, S; TAIRA, S; KOBAMOTO, N; ISHIHARA, M; TOYAMA, S. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-de-hydrokawain derivatives. In: Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and atioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 403-410, 2000

TEPLITKI, M ; ROBINSON, J.B ; BAUER, W.D. Plants secrete substances that mimic bacterial n-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 13, p. 637-648, 2000.

TERESCHUK, M.L; RIERA, M.V.Q; CASTRO, G.R; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, p. 227-232, 1997

TSHIKALANGE, T.E; MEYER, J.J.M; HUSSEIN A.A. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v.96, p.515-519, 2005

TONOVER, F.C; WEIGEL, L.M; APPELBAUM, L.K; MCDUGAL, S.E; CHAITRAM, J; MCALLISTER, S; CLARK N; KILLGORE, G; O'HARA, C.M ; JEVITT, L ; BETEL, J.B ; BOZDOGAN, B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 48, p. 75-80, 2004

TURA, D ; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. Review. *Journal of Chromatography Agents*, v. 975, p. 71–93, 2002.

UCHINO, T; KAWAHARA, N; SEKITA, S; SATAKE, M; SAITO, Y; TOKUNAGA, H; ANDO, M. Potent protecting effects of Catuaba (*Anemopaegma mirandum*) extracts against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Toxicology in vitro*, v.18, p. 255-263, 2004

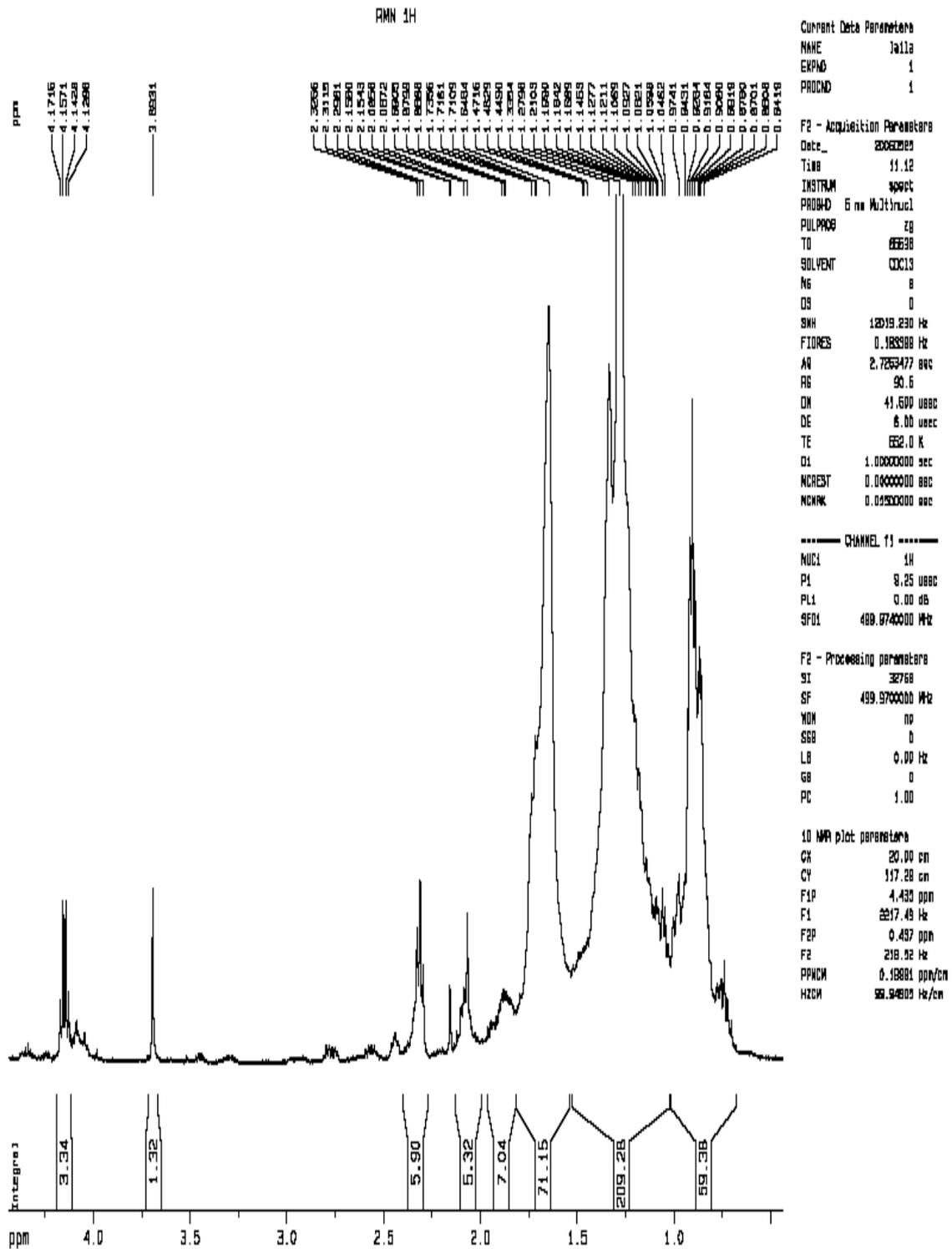
VOUILLAMOZ, J; ENTENZA, J.M; HOHL, P; MOREILLON, P. LB11058, a new cephalosporin with high penicillin-binding protein 2^a affinity and activity in experimental endocarditis due to homogerically methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy*, v.48, p.,4322-4327, 2004

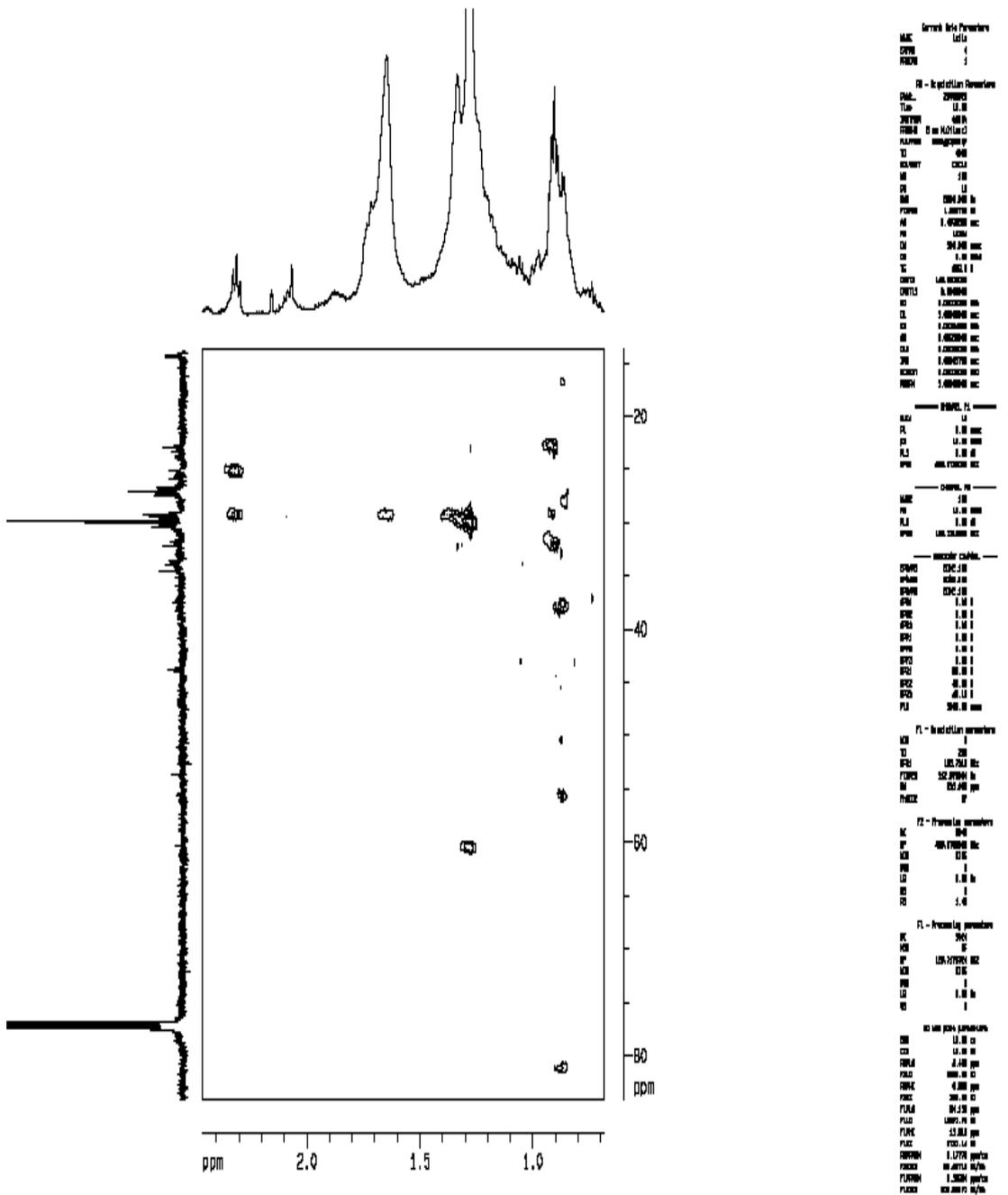
WEIGEL, L.M; CLEWELL, D.B; GILL, S.R; CLARK N.C; MCDUGAL, L.K; FLANNAGAN, S.E; KOLONAY, J.F; SHETTY, J; KILLGORE, G.E; TONOVER F.C. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, v. 302, p. 1569-1571, 2003

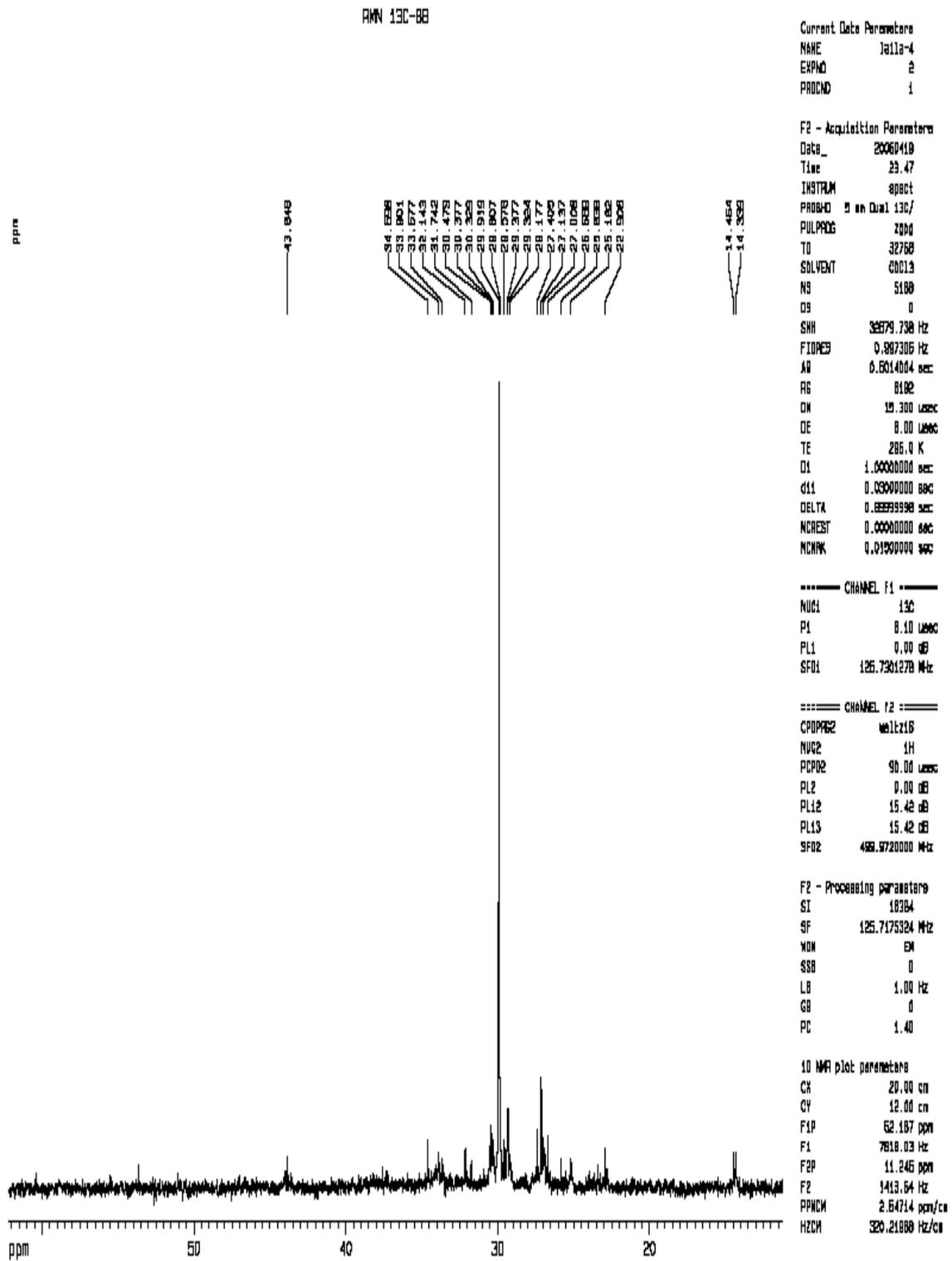
WHITMAN, W.B; COLEMAN, D.C; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *The National Academy of Science*, v. 95, p. 6578-6583, 1998

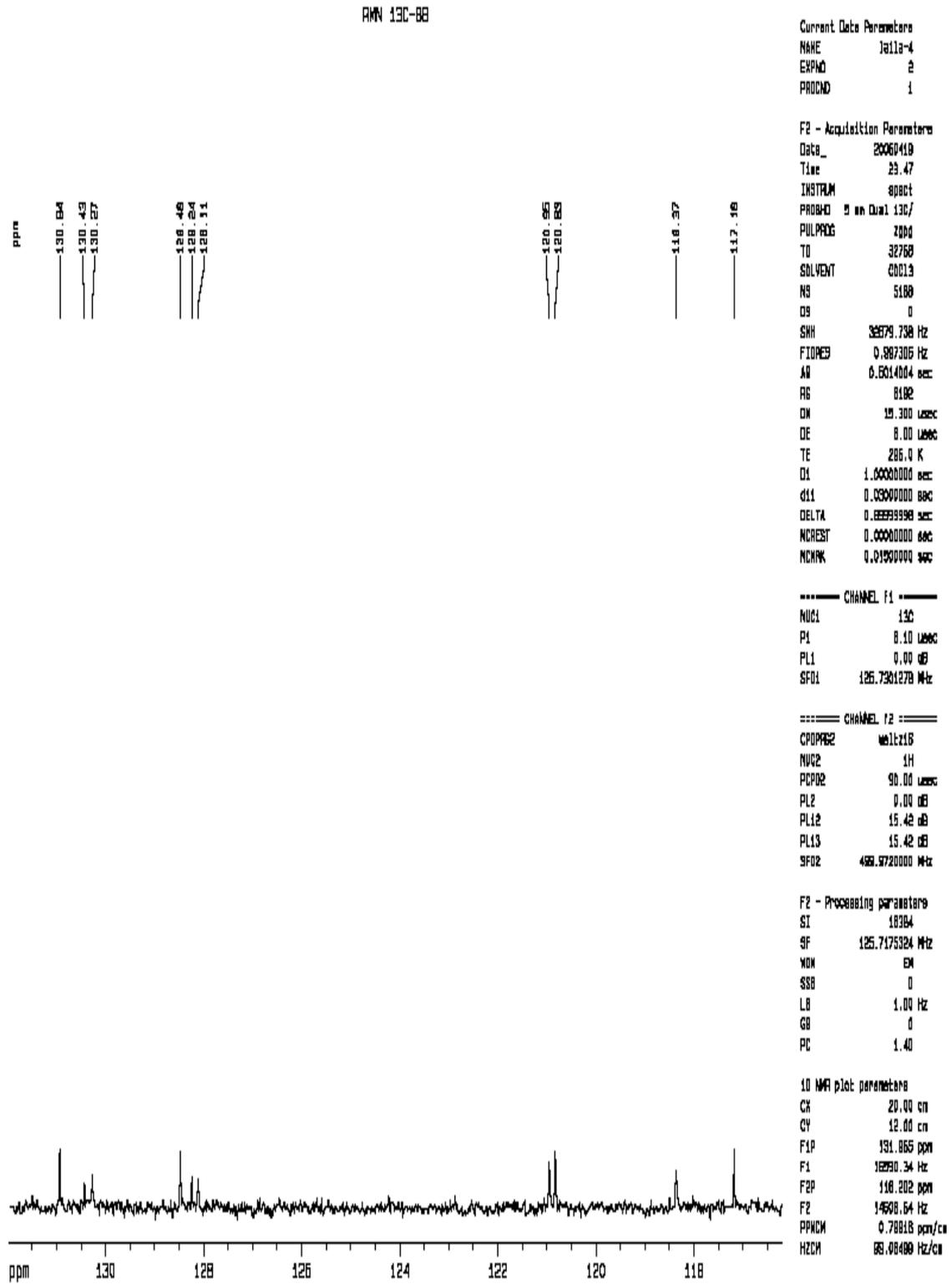
9. Anexos

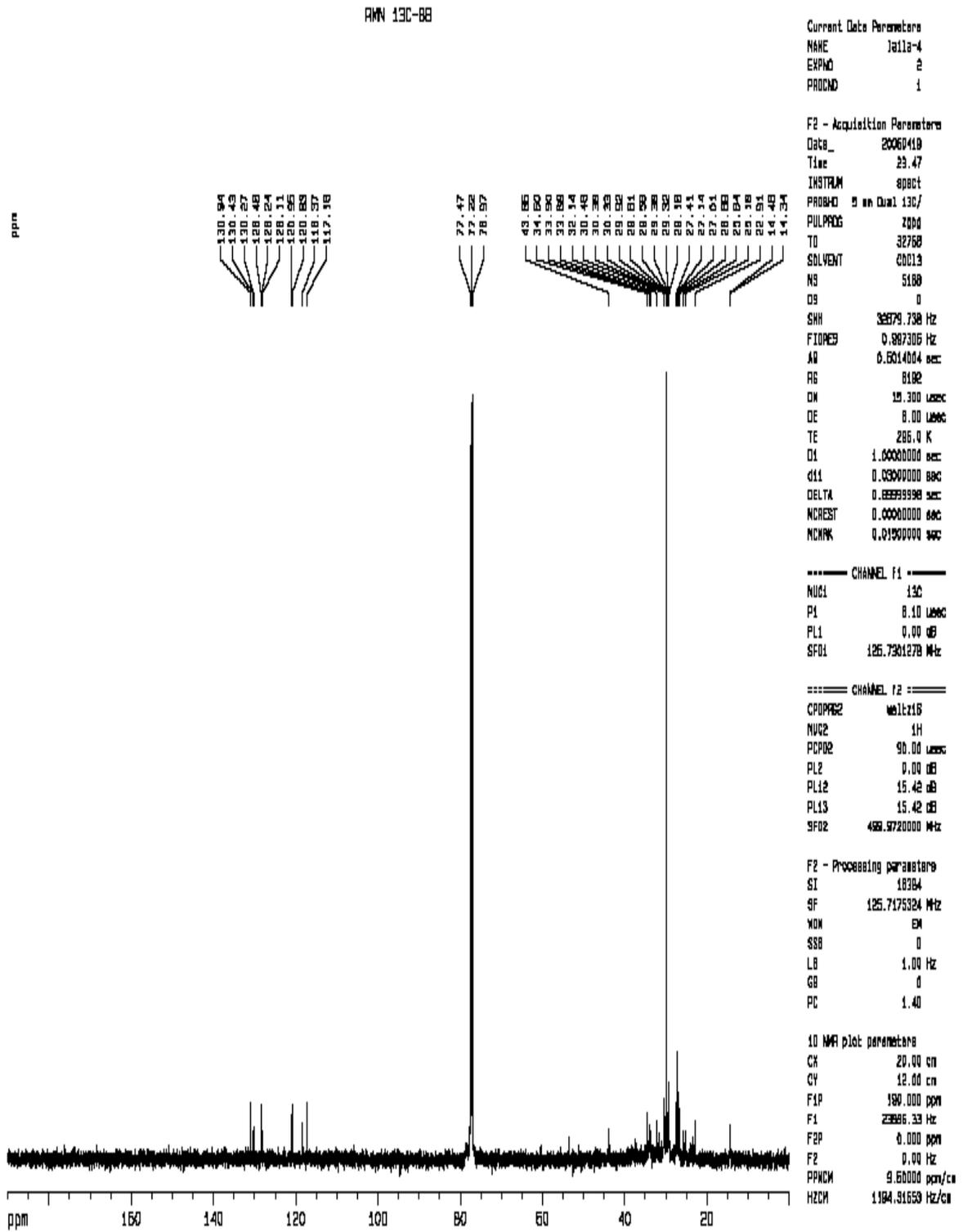
ESPECTROS RMN

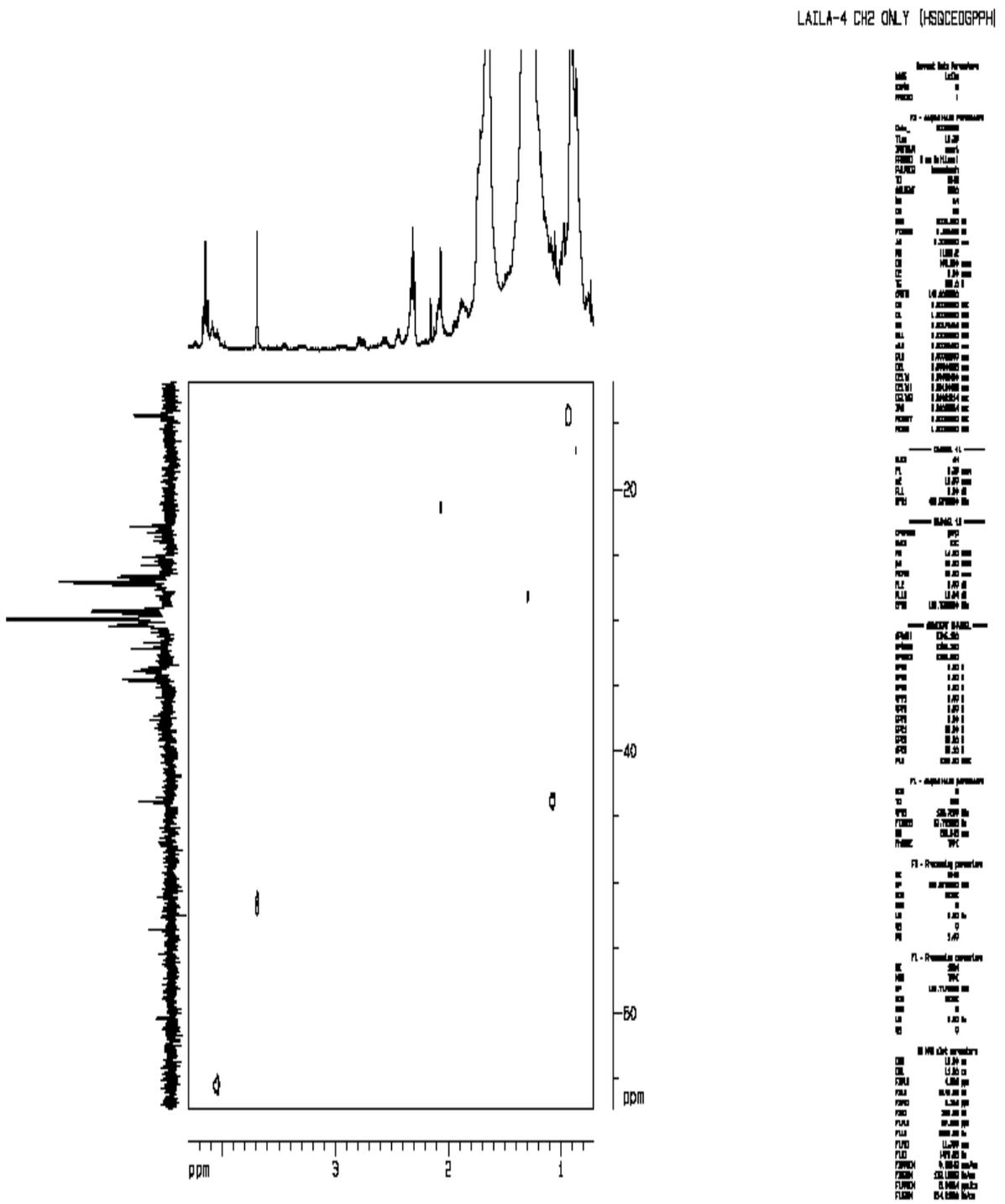




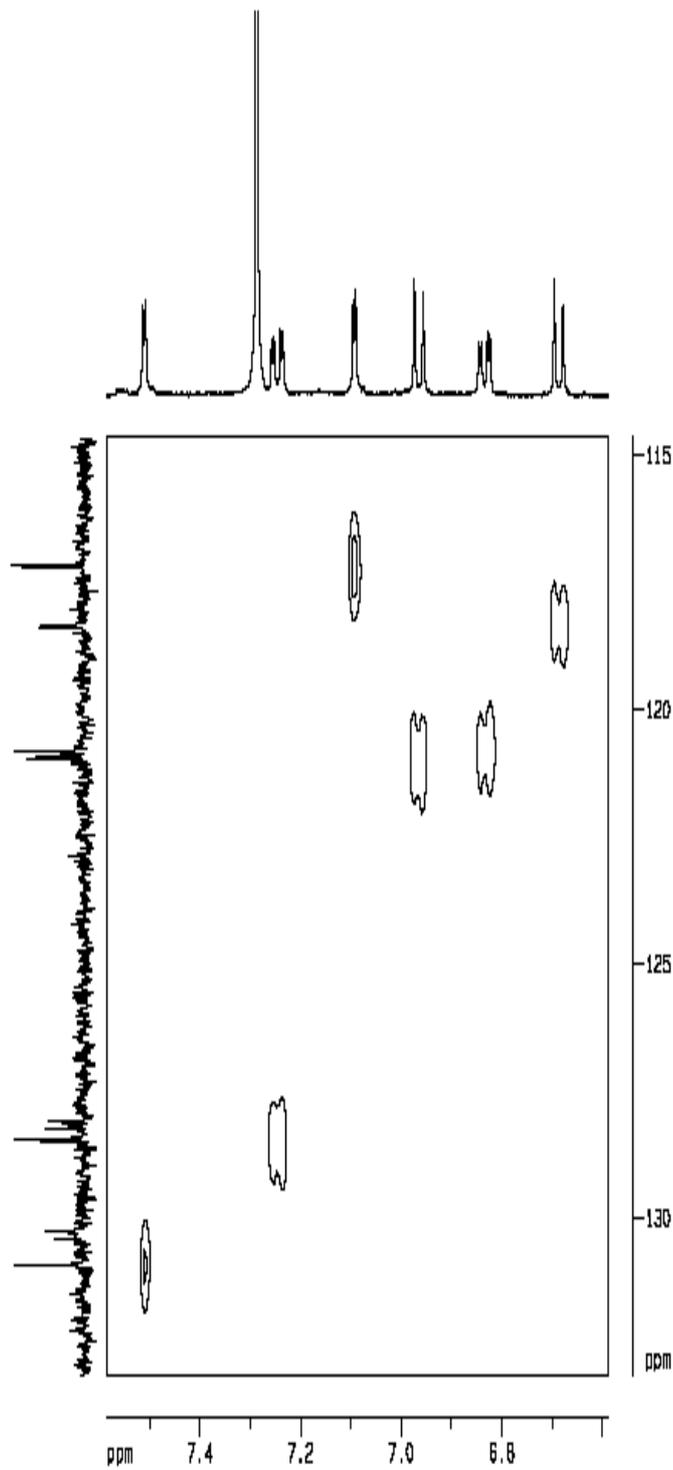








LAILA-4 CH2 ONLY (HSQCDEGPPH)



General Data Parameters

NAME	LAILA-4
EXPNO	1
PROCNO	1

FT - Acquis Parameters

Date_	20080808
Time	13:20
INSTRUM	nmr1
PROBHD	5 mm QNP 1H/13
PULPROG	zgpg30
TD	65536
AQ	0.050000
RG	327
SI	327
SD	1
WDW	EM
SSB	0
LB	3.000000
GB	0
PC	1.000000
DC	0
BLK	0
BR	1
BU	0
BU2	0
BU3	0
BU4	0
BU5	0
BU6	0
BU7	0
BU8	0
BU9	0
BU10	0
BU11	0
BU12	0
BU13	0
BU14	0
BU15	0
BU16	0
BU17	0
BU18	0
BU19	0
BU20	0
BU21	0
BU22	0
BU23	0
BU24	0
BU25	0
BU26	0
BU27	0
BU28	0
BU29	0
BU30	0
BU31	0
BU32	0
BU33	0
BU34	0
BU35	0
BU36	0
BU37	0
BU38	0
BU39	0
BU40	0
BU41	0
BU42	0
BU43	0
BU44	0
BU45	0
BU46	0
BU47	0
BU48	0
BU49	0
BU50	0
BU51	0
BU52	0
BU53	0
BU54	0
BU55	0
BU56	0
BU57	0
BU58	0
BU59	0
BU60	0
BU61	0
BU62	0
BU63	0
BU64	0
BU65	0
BU66	0
BU67	0
BU68	0
BU69	0
BU70	0
BU71	0
BU72	0
BU73	0
BU74	0
BU75	0
BU76	0
BU77	0
BU78	0
BU79	0
BU80	0
BU81	0
BU82	0
BU83	0
BU84	0
BU85	0
BU86	0
BU87	0
BU88	0
BU89	0
BU90	0
BU91	0
BU92	0
BU93	0
BU94	0
BU95	0
BU96	0
BU97	0
BU98	0
BU99	0
BU100	0

FT - Processing parameters

SI	327
WDW	EM
SSB	0
LB	3.000000
GB	0
PC	1.000000
DC	0
BLK	0

FT - Presentation parameters

SI	327
WDW	EM
SSB	0
LB	3.000000
GB	0
PC	1.000000
DC	0
BLK	0

FT - Acquisition parameters

Date_	20080808
Time	13:20
INSTRUM	nmr1
PROBHD	5 mm QNP 1H/13
PULPROG	zgpg30
TD	65536
AQ	0.050000
RG	327
SI	327
SD	1
WDW	EM
SSB	0
LB	3.000000
GB	0
PC	1.000000
DC	0
BLK	0
BR	1
BU	0
BU2	0
BU3	0
BU4	0
BU5	0
BU6	0
BU7	0
BU8	0
BU9	0
BU10	0
BU11	0
BU12	0
BU13	0
BU14	0
BU15	0
BU16	0
BU17	0
BU18	0
BU19	0
BU20	0
BU21	0
BU22	0
BU23	0
BU24	0
BU25	0
BU26	0
BU27	0
BU28	0
BU29	0
BU30	0
BU31	0
BU32	0
BU33	0
BU34	0
BU35	0
BU36	0
BU37	0
BU38	0
BU39	0
BU40	0
BU41	0
BU42	0
BU43	0
BU44	0
BU45	0
BU46	0
BU47	0
BU48	0
BU49	0
BU50	0
BU51	0
BU52	0
BU53	0
BU54	0
BU55	0
BU56	0
BU57	0
BU58	0
BU59	0
BU60	0
BU61	0
BU62	0
BU63	0
BU64	0
BU65	0
BU66	0
BU67	0
BU68	0
BU69	0
BU70	0
BU71	0
BU72	0
BU73	0
BU74	0
BU75	0
BU76	0
BU77	0
BU78	0
BU79	0
BU80	0
BU81	0
BU82	0
BU83	0
BU84	0
BU85	0
BU86	0
BU87	0
BU88	0
BU89	0
BU90	0
BU91	0
BU92	0
BU93	0
BU94	0
BU95	0
BU96	0
BU97	0
BU98	0
BU99	0
BU100	0

