



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR  
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS  
ETANÓLICOS E METANÓLICOS DE *Costus cf. arabicus* L**

FRANCISCO ASSIS BEZERRA DA CUNHA

CRATO – CEARÁ  
2010

**FRANCISCO ASSIS BEZERRA DA CUNHA**

**AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS  
ETANÓLICOS E METANÓLICOS DE *Costus cf. arabicus* L**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de Concentração: Bioprospecção Molecular

Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais

Orientador: **Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**

CRATO – CEARÁ  
2010

Francisco Assis Bezerra da Cunha

11111

**Q8a** Avaliação antibacteriana de extratos etanólicos e metanólicos de *Costus cf. arabicus* L / Francisco Assis Bezerra da Cunha– Crato, 2010.

79 p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho  
Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

1. *Costus cf. arabicus* 2.atividade moduladora de antibiótico  
3. Atividade Antimicrobiana

**CDD: 83.166**

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de Concentração em Bioprospecção Molecular, outorgado pela Universidade Regional do Cariri, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Pós-Graduação do Centro de Ciências da referida Universidade.

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

---

**Francisco Assis Bezerra da Cunha**

Dissertação aprovada em: 25/ 03/ 2010.

Examinadores:

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**  
Universidade Regional do Cariri-URCA  
(Orientador da Dissertação)

---

**Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa**  
Universidade Regional do Cariri-URCA  
(Avaliador interno)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima**  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB  
(Avaliador externo)

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Marta Regina Kerntopf**  
Universidade Regional do Cariri-URCA  
(Avaliador interno - Suplente)

---

**Prof. Dr. Flávio Ferreira Furtado**  
Universidade de Ciências Dr. Leão Sampaio - FALS  
(Avaliador externo- Suplente)

A *Scientia amabilis* é realmente uma  
"caixinha de surpresa" !!!

Dr. João Marcelo Alvarenga Braga (Pesquisador do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro), frase dita ao descobrir ser a espécie de *Costus*, aqui estudada, uma possível variedade ou espécie nova.

Aos meus pais, **Antônio Leopoldino da Cunha** (*in memoriam*), e **Marina Bezerra da Cunha** (*in memoriam*), por todo o seu esforço na criação e educação dos seus filhos;

Á toda minha família, que invariavelmente torceu por mim ao longo deste percurso, em especial a **Advanda Araújo Lima da Cunha**, **Leandro Cunha**, **Cunha Neto**, **Frances Marina**, **Frederico Haeckell**, querida esposa e filhos, por estarem sempre presentes em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a **Deus** pelo dom da vida e razão da nossa existência;
- ao **Santo Padre Cícero**, pela sua obra, seu exemplo e sua proteção. “*A bença meu Padim !!!*”;
- ao amigo **Antonio Correia**, por ter me apresentado a espécie vegetal aqui estudada. “**Muito obrigado !!!**”
- ao **Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**, meu orientador, pela amizade e esforço dedicados a mim durante o trabalho;
- ao **Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa** da Universidade Regional do Cariri, pelo incentivo e valiosas sugestões que foram muito importantes no decorrer de todo projeto;
- à **Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf**, da Universidade Regional do Cariri, pela amizade, incentivo e pelo apoio;
- às **coordenadoras do Mestrado em Bioprospecção Molecular Profas. Dras. Sirleis Rodrigues Lacerda e Imeuda Peixoto Furtado**, da Universidade Regional do Cariri, pelas informações e incentivos;
- aos **professores do Curso de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular** da Universidade Regional do Cariri, pelas informações e incentivos;

- ao Herbário Cariense Dardano de Andrade Lima – URCA, na pessoa da curadora **Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa**, pela preparação da excicata e ao **Prof. Dr. João Marcelo Alvarenga Braga**, pesquisador do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que foi muito importante na identificação preliminar botânica da espécie de “*Costus* cf. *arabicus* L.” aqui estudada. A *Scientia Amabilis* é realmente uma "caixinha de surpresa“ !!!;
- ao **Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes** da Universidade Regional do Cariri, pela amizade, incentivo e sugestões durante esta pesquisa;
- a **Prof. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima** da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, pela contribuição a microbiologia e sua contribuição na banca examinadora.
- ao **Prof. Dr. Flávio Ferreira Furtado da** Universidade de Ciências Dr. Leão Sampaio – FALS, pela presteza em atender ao convite de participação da banca examinadora
- à secretária do curso de Pós-Graduação **Maria Andecieli Rolim de Brito**, pela amabilidade e cooperação em algumas dificuldades burocráticas;
- aos **alunos de iniciação científica** pela contribuição, pela amizade e pelos momentos de diversão;
- aos **colegas da pós-graduação**, pela estima, pelo ambiente de agradável convivência, em especial a **Elizângela Beneval Bento, Felipe Silva Ferreira e Samuel Vieira Brito**;
- a amiga **Jaqueline Alencar Tavares** pelo estimo e dedicação as atividades acadêmicas e profissionais por mim desenvolvidas nesta instituição;
- a todas as pessoas, que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente no transcorrer desta Dissertação;
- a todos aqueles que lutaram e lutam por uma Universidade pública, gratuita e de qualidade, fundamental em minha formação;

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO.....	2
<b>CAPITULO 2.....</b>	<b>7</b>
2. ESTADO DA ARTE.....	8
2.1. Generalidades.....	8
2.1.1. Biodiversidade e etnofarmacologia.....	
2.1.2. Microrganismos selecionados para estudo e sua importância na saúde.....	14
2.1.2.1. Resistência Bacteriana e Terapêutica Atual.....	16
2.1.2.2. Resistência a aminoglicosídeos.....	19
2.1.2.3. Atividade modificadora da ação antibiótica.....	20
2.1.2.4. Atividade fotossensibilizante.....	22
2.2. Revisão bibliográfica do gênero <i>Costus</i> .....	24
2.2.1. Etnofarmacologia e botânica do gênero <i>Costus</i> .....	24
2.2.2. Revisão sobre a química e a farmacologia do gênero <i>Costus</i> .....	26
<b>CAPITULO 3.....</b>	<b>31</b>
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
<b>CAPITULO 4.....</b>	<b>33</b>
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Material Botânico (Origem e Obtenção do Extrato Vegetal).....	34
4.2. Prospecção Fitoquímica.....	36
4.3. Preparo da Solução Inicial e das Soluções de Teste.....	36
4.4. Microrganismos e meios de cultura.....	36

4.5. Meios de cultura.....	37
4.5.1. Preparo e padronização de inóculos bacterianos.....	37
4.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	57
4.6.1. Preparo dos inóculos bacterianos.....	39
4.6.2. Execução e leitura dos ensaios.....	40
4.7. Atividade fotossensibilizante dos constituintes dos extratos de <i>Costus</i> .....	40
4.8. Avaliação da interferência dos extratos na resistência aos antibióticos aminoglicosídeos.....	42
4.8.1. Execução e leitura do ensaio.....	43
<b>CAPITULO 5.....</b>	<b>44</b>
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Análise da Prospecção Fitoquímica.....	45
5.2. Atividade fototóxica.....	46
5.3. Análise da atividade antibacteriana dos extratos frente as linhagens ATCC multiresistentes <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
5.4. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica.....	47
5.4.1. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Etanólico do Caule de <i>Costus</i> sp (EECC).....	47
5.4.2. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Etanólico das Folhas de <i>Costus</i> sp (EEFC).....	48
5.4.3. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Metanólico do Caule de <i>Costus</i> sp (EMCC).....	49
5.4.4. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Costus</i> sp (EMFC).....	50
<b>CAPITULO 6.....</b>	<b>52</b>
6. Discussão .....	53
<b>CAPITULO 7.....</b>	<b>56</b>
7. CONCLUSÕES.....	57
<b>CAPITULO 8.....</b>	<b>58</b>
8. REFERENCIAS.....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b>	Espécie de <i>Costus cf. arabicus</i> L., em (a) pode ser observado as ramas, em (b) a flor do espécime botânico.....	34
<b>Figura 2.</b>	Fluxograma para obtenção dos extratos etanólicos e metanólicos de folhas e caule de <i>Costus cf. arabicus</i> .....	35
<b>Figura 3</b>	Observa-se em (a) a representação de uma placa com um teste de determinação da concentração inibitória mínima CIM e em (b) um teste com atividade moduladora em extratos de <i>Costus</i> .....	38
<b>Figura 4</b>	Fluxograma representativo da metodologia empregada para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de <i>Costus</i> .....	39
<b>Figura 5</b>	Fluxograma representativo da metodologia empregada para a avaliação da atividade fototóxica dos extratos de <i>Costus</i> .....	41
<b>Figura 6</b>	Fluxograma representativo da metodologia empregada para avaliação da modulação da resistência à aminoglicosídeos em extratos de <i>Costus</i> .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b>	Relação das espécies de <i>Costus</i> , tipo de extrato, classe e/ou constituintes químicos, atividades farmacológicas e/ou outras registrados na literatura.....	27
<b>Tabela 2</b>	Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais do <i>Costus</i> cf. <i>arabicus</i> L.....	45
<b>Tabela 3</b>	Atividade fototóxica apresentada pelos extratos de <i>Costus</i> sp. EECC, EEFC, EMCC e EMFC frente as linhagens ATCC e multirresistentes de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	46
<b>Tabela 4</b>	Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EECC ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	48
<b>Tabela 5</b>	Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EEFC( $\mu\text{g/mL}$ ).....	49
<b>Tabela 6</b>	Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EMCC ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	50
<b>Tabela 7</b>	Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EMFC, com os antibióticos canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina. Resultados em $\mu\text{g/mL}$ .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAC – *Aminoglycoside Acetyltransferase*

ANT - *Aminoglycoside Nucleotidetransferase*

APH – *Aminoglycoside phosphotransferase*

BHI – *Brain and Heart Infusion*

C1 ~ EMCC - Extrato Metanólico das Folhas de Costus

C2 ~ EMCC - Extrato Metanólico do Caule de Costus

C3 ~ Extrato Etanólico do Caule de Costus

C4 ~ EEFC - Extrato Etanólico das folhas de Costus

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CDB – Convenção da Diversidade Biológica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CPZ – Clorpromazina

DMSO – Dimetilsulfóxido

ESBL – *Extended Spectrum*  $\square$  – *Lactamase* ( $\square$  – Lactamase de Espectro estendido)

LPPN – Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais

LPS – Lipopolissacarídeo

mm – milímetro

nm – nanômetro

URCA – Universidade Regional do Cariri

UVA – Ultra Violeta tipo A

## RESUMO

A Convenção da Diversidade Biológica, constitui-se no principal avanço da Rio-92 e pode-se afirmar que dentre seus postulados, a Bioprospecção constitui-se no mais novo marco regulatório para a investigação das moléculas biologicamente ativas, com crescente uso da indústria, nutracêutica e farmacologia. A etnobotânica, ou mais precisamente a etnofarmacologia do grupo Zingiberales, tem apontado para importantes usos clínicos. A família Costaceae, ou mais precisamente o gênero *Costus* tem uma ampla utilização na medicina popular: especialmente com aplicação hipoglicemiante, hipolipemiante, urolítica, antiinflamatória, analgésica e antibacteriana.

Neste trabalho, a avaliação de atividades biológicas de *Costus cf. arabicus* gerou resultados que demonstraram a ação moduladora de antibióticos frente a variedades multiresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e que apontam para os múltiplos mecanismos de ação antimicrobiana, que de forma sinérgica podem estar envolvidos, na potencialização dos antibióticos testados: amicacina, canamicina, gentamicina e neomicina; dos quatro extratos testados quanto à capacidade de fotoativação na potencialização da atividade antimicrobiana. Todos os extratos de folhas, tanto etanólicos, quanto metanólicos foram eficazes, quer seja para *S. Aureus* quanto para *E. Coli* e o extrato metanólico do caule também foi fotoativo contra *E. coli*. O que sugere que novas pesquisas sejam realizadas, uma vez que Estratos de Folhas de *Costus cf. arabicus* L se mostraram eficientes tanto para bactérias gram positivas, quanto gram negativas. Por se tratar de extratos se faz necessário o isolamento dos substâncias fitoconstituintes, visando precisar se ocorre uma atuação sinérgica das substâncias destes compostos ou se a sua ação se deve a constituintes isolados. Em face dos resultados obtidos, as pesquisas visando novas estratégias de controle de bactérias multiresistentes, no combate a multiresistência a antibióticos, bem como coadjuvante na antibioticoterapia e fototerapia utilizando esta espécie podem ser promissoras.

**Descritores:** *Costus cf. arabicus* L., Costaceae, modulação da atividade antibiótica, fotossensibilização, UV-A, antibióticos, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The Convention on Biological Diversity, constitutes the main advance of the Rio-92 and can be stated that among its postulates, the Bioprospecting constitutes the most new regulatory framework for the investigation of biologically active molecules, with increasing use in industry, nutraceutical and pharmacology. The ethno botany, or more precisely the ethnopharmacology Zingiberales group, has pointed to other important clinical uses. The family of Costaceae, or more precisely the genus *Costus* is a wide use in folk medicine: with particular application hypoglycemic, hypolipidemic, uroliths, anti-inflammatory, analgesic and antibacterial. In this work, the evaluation of biological activities of *Costus cf. arabicus* generated results that demonstrated the modulating action of antibiotics against multiresistant *Staphylococcus* varieties. aureus and *Escherichia. coli* and related to the multiple mechanisms of antimicrobial action, so that may be involved synergistically in potencialização of antibiotics: amikacin, kanamycin, gentamicin and neomycin. Of the four extracts tested for their ability to photoactivation in the potentiation of antimicrobial activity. All extracts of leaves, either ethanol, methanol as were effective, whether for *S. Aureus* and for *E. coli* and methanol extracts of the stem was also photoactive against *E. Coli*. This suggests that more research is done, since Strata Sheet *Costus cf. arabicus* L were effective for both Gram-positive bacteria, as Gram negative. Because it is necessary to extract the isolation of phytochemicals substances, seeks to specify if there is a synergistic action of these compounds or substances if their action is due to individual constituents. Before results, the research aiming at new strategies for control of multiresistant bacteria, to combat multidrug resistance to antibiotics, as well as assisting in the antibiotic therapy and phototherapy using this species may be promising.

**Keywords:** *Costus cf. Arabicus* L. Costaceae, flavonide, alkaloids Modulation of antibiotic activity, photosensitization, UV-A, Antibiotics, Antimicrobial Activity.

---

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram descobertas pelo homem através da procura por alimentos, e desde então, foram aplicadas empiricamente para o tratamento de patologias (WAGNER; WISENAUER, 2006).

Essas informações sobre os usos de plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram sendo acumuladas durante séculos, e muito desse conhecimento empírico se encontra disponível atualmente. De domínio público, o conhecimento sobre as plantas medicinais representou e ainda representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (DI STASI, 1996).

Durante a última parte do século XX a prática da fitoterapia tornou-se difundida por todo o mundo. Isto é suficiente, em parte, para o reconhecimento do valor dos sistemas de medicina tradicional e a identificação de plantas medicinais; que têm mostrado um significativo poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (ELVIN; LEWIS, 2001).

O conhecimento sobre plantas medicinais significa muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que apresentam, apesar de muitos não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL et al., 2002). Atualmente, estudos etnofarmacológicos registram imenso número de aplicações de plantas que obtiveram confirmações de atividades farmacológicas, comprovando assim o conhecimento popular que deu origem a vários medicamentos fitoterápicos a partir de uso empírico (ELIZABETSKY, 1993).

A medicina do século XX trouxe a descoberta de grupos de compostos produzidos por microrganismos capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos e até destruí-los, ou seja, a era da “antibiose”, iniciada a partir da descoberta e do isolamento da penicilina do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming. Porém, devido a utilização incorreta e indiscriminada destes compostos, surgiu o problema da resistência microbiana e a partir daí, cresceu o interesse sobre infecções pelo aumento do número de casos, da própria resistência aos tratamentos e da alta mortalidade (RODRIGUES et al., 1997).

Em épocas posteriores à descoberta das sulfonamidas e da penicilina era rara a realização de provas de sensibilidade dos microrganismos às drogas. Os pacientes eram tratados de forma empírica, pois os microrganismos não apresentavam resistência. Só após o surgimento de linhagens resistentes os microbiologistas passaram a realizar testes de sensibilidade que forneciam resultados quantitativos da concentração do agente antimicrobiano necessário para inibir o desenvolvimento de um determinado microrganismo. Este método tornou-se a base para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), parâmetro indispensável para o estabelecimento da dose terapêutica efetiva do agente antimicrobiano. Esta dose é geralmente definida em cerca de quatro vezes a CIM *in vitro*, embora isto nem sempre seja possível ou necessário na prática (BAILEY; SCOTT, 1996).

Nas últimas décadas, devido a crescente incidência de efeitos adversos associados às drogas convencionais, aliadas ao aumento da resistência microbiana aos antibióticos, germicidas e desinfetantes e a importância clínica dada às infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos, os pesquisadores buscam cada vez mais produtos que apresentam eficiência no tratamento destas infecções, bem como apresentem baixa toxicidade para os pacientes. Neste contexto, o estudo de produtos naturais de origem vegetal com atividade antimicrobiana tem apresentado amplas perspectivas (RECIO; RIOS, 1989; PAULO et al., 1992).

A substâncias naturais compreendem atualmente cerca de 11,5% do total de prescrições na medicina moderna e metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo sejam, direta ou indiretamente, oriundos de produtos naturais de plantas. Assim, as companhias farmacêuticas, como também os herboristas, dependem em grande parte da natureza para a produção de drogas com fins comerciais (SIMÕES et al., 2002).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350000 e 550000 espécies. Várias destas espécies são endêmicas de uma região e ainda não foram avaliadas sobre o ponto de vista fitoquímico e farmacológico (SIMÕES et al., 2002). Isto significa que uma grande quantidade de compostos bioativos pode não ter sido descoberta, indicando uma grande possibilidade da obtenção de produtos com destacáveis propriedades farmacológicas.

A busca de princípios ativos mais eficazes e menos agressivos ao homem, tem colocado a pesquisa sobre plantas medicinais num importante patamar científico e tem aberto perspectivas para estudos de etnofarmacologia, fitoquímica e microbiologia entre outros, principalmente motivada pela existência de: 1) enfermidades endêmicas ou não para as quais ainda não foi encontrada uma abordagem terapêutica efetiva; 2) doenças decorrentes de novos agentes infecciosos; 3) procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos, muito sujeitos a infecções e 4) da poluição ambiental e das alterações no ambiente, favorecendo a disseminação de infecções, como por exemplo, por via hídrica (RECIO; RIOS, 1989).

Diversas plantas têm sido avaliadas não apenas para demonstrar seu potencial antimicrobiano de forma direta, mas também como fontes de substâncias com potencial de serem agentes capazes de modificar a ação antibiótica (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Diversos compostos químicos de origem sintética, como fenotiazinas, ou de fonte natural, como flavonóides, terpenos e outros, além de poderem apresentar atividade antibacteriana direta, também aumentam a atividade de antibióticos específicos, revertendo

a resistência de alguns tipos bacterianos a determinados antibióticos, promovendo a eliminação de plasmídios que carregam determinantes de resistência e inibindo as funções de transporte da membrana plasmática de algumas classes de antibióticos. O aumento da atividade antibiótica ou a reversão da resistência através de antibióticos não convencionais naturais ou sintéticos os identificam como agentes modificadores da ação antibiótica (MOLNAR et al., 2004; WOLFART et al., 2006).

Existe também um interesse crescente nos aspectos referentes à fotoquímica e fotobiologia deste produtos naturais, de forma a avaliar seu potencial uso como agentes terapêuticos (DALLA VIA; MAGNO, 2001; LOPEZ et al., 2001). Isso se deve a um ao fato de trabalhos terem demonstrado a atividade biológica de produtos naturais mediada por luz (TOWERS et al., 1997). Porém, os estudos de atividade antibacteriana ativada pela luz em produtos naturais são praticamente inexistentes (BOONYATAVEJ et al., 1983; TIP-PYANG et al., 2000). Muitas plantas apresentam substâncias que, uma vez expostas à luz visível ou luz UV apresentam fototoxicidade (atividade biológica tóxica ativada pela luz), sendo denominadas de fototoxinas ou substâncias fotossensibilizadoras. Uma grande variedade de plantas e fungos apresentam substâncias desse tipo, possivelmente funcionando como uma defesa natural contra insetos, nematóides e contra herbivoria (TOWERS et al., 1997; KANG et al., 2007). Esta atividade se deve basicamente a dois mecanismos: da produção de radicais livres ou afetando diretamente as células (FOOTE, 1991). Compostos como polienos, tiofenos, tiorubrininas, quinonas, alcalóides, furocromonas e porfirinas são largamente distribuídos em diversas famílias botânicas e podem ser fofotóxicos (TOWERS et al., 1997).

Alguns compostos com atividade fototóxica já demonstraram atividade biológica após fotoativação. Hipericina e hipocrelina, isoladas respectivamente de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) e *Hypocrella bambuase* (Ascomycete), apresentaram atividades anti – HIV, antitumoral e antibacteriana após exposição à luz (TAYLOR et al., 1995; KANG et al., 2007).

Neste aspecto, o Brasil tem a vantagem de contar com uma flora exuberante e uma grande área fértil. Isso permite indicar que, qualquer que seja a política nacional com relação à pesquisa científica, ela deve sempre levar em consideração a necessidade de estudar os fitocompostos presentes na nossa diversidade vegetal e animal, além de garantir a preservação tanto das espécies que já são objeto de prospecção científica quanto para aquelas que podem, no futuro, apresentar potencial para isso.

Devido isso, o estudo e a descoberta de produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antibacteriana intrínseca ou combinada, seja com antibióticos de uso comum ou com luz, podem representar uma nova forma de fazer frente aos microrganismos multiresistentes, além de impedir o contato destes microrganismos com os antibióticos, diminuindo o risco de selecionarmos novos ou melhores mecanismos de resistência bacteriana. Dessa forma, poderíamos redirecionar a indústria farmacêutica de forma a favorecer a produção e o uso de fitoterápicos como adjuvantes de determinados tratamentos contra agentes infecciosos ou outras doenças. Além disso, a falta de estudos sobre as propriedades farmacológicas de plantas em regiões de alta diversidade com o Cariri Cearense, mais especificamente a Chapada do Araripe, pode abrir uma nova perspectiva para estas pesquisas, bem como possibilitar a descoberta de uma ampla possibilidade de novas substâncias.

Capítulo

2

---

## ESTADO DA ARTE

## **2. ESTADO DA ARTE**

### **2. 1. Generalidades**

#### **21.1. Biodiversidade e etnofarmacologia**

Biodiversidade pode ser entendida como a associação de ecossistemas, comunidades, populações e espécies num espaço geográfico definido, tendo como uma das principais características a distribuição relativamente desigual de seus componentes (DOBSON, 1996).

Dados estatísticos mostram que os artrópodos constituem a maior parcela de biodiversidade da terra (75,4%) e só os insetos compreendem 62% da diversidade global. Apesar deste número, este grupo permanece relativamente intacto como fonte de novos compostos. Baseado no número de espécies conhecidas, as plantas representam a segunda maior diversidade (15%) (HAMMOND, 1995). Estimativas revelam que entre 20 e 55 mil espécies de plantas têm sido utilizadas na medicina, das quais apenas uma pequena quantidade foi investigada para a busca de novas drogas. Entre as que foram pesquisadas estão espécies que produzem drogas importantes como quinina, reserpina, vimblastina, vincristina, atropina e morfina (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). No geral, apenas 15 a 20% das plantas terrestres foram avaliadas quanto ao seu potencial farmacêutico. Conseqüentemente, plantas, incluindo as de uso medicinal que ainda não foram investigadas, continuam a representar uma fonte significativa de matéria-prima para a descoberta de novas drogas. Entre 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica, 25% foram desenvolvidos a partir de plantas. Embora apenas 10% da diversidade mundial tenha sido estudada, 140 mil metabólitos secundários, originados principalmente de plantas superiores e de microrganismos foram isolados e identificados, mas ainda não foram avaliados biologicamente (SOEJARTO et al., 2005).

A maior biodiversidade do mundo, concentrada em território brasileiro, é estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, com mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas, de um total estimado em cerca de 550 mil espécies, o que o torna alvo de países do hemisfério Norte, ricos em tecnologia (ELISABETSKY; COSTA CAMPOS, 1996). Apesar desta biodiversidade, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos, das quais 1100 espécies foram avaliadas quanto às suas propriedades medicinais (GARCIA et al., 1996) e destas, apenas 590 foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (ORTEGA et al., 1989).

O mercado mundial de medicamentos obtidos de produtos naturais atinge hoje vários bilhões de dólares. Embora o mercado brasileiro de fitomedicamentos tenha alcançado o equivalente a 5,9% do mercado interno de medicamentos, o panorama atual nesta área mostra que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais. Estas informações apontam para a necessidade de buscar alternativas para superar a dependência externa, principalmente quando comparamos os preços praticados no Brasil e nos países desenvolvidos (BERMUDEZ, 1995).

Com valor econômico incalculável em diversas atividades, o maior potencial da biodiversidade brasileira está, atualmente, na área de desenvolvimento de novos fármacos. A terapêutica atual, com medicamentos de ações específicas sobre receptores, canais iônicos e enzimas não teria sido alcançada sem a contribuição dos produtos naturais de plantas, das toxinas animais e dos microrganismos (CRAGG et al., 1997; PANDEY, 1998; SHU, 1998). O interesse pela biodiversidade para a produção de medicamentos cresceu visivelmente com a conclusão do seqüenciamento do genoma humano, já que o número de possíveis alvos terapêuticos aumentou de aproximadamente 500 para mais de 6 mil (VERPOORTE, 1998).

Embora esteja entre os países detentores de megadiversidade, na década de 80, o Brasil foi responsável por 28% das perdas de florestas tropicais e por 14% de outros tipos de florestas na América do Sul, alcançando um patamar de devastação praticamente irrecuperável, dada a complexidade dos ecossistemas tropicais e tendo como consequência a perda da diversidade genética associada à destruição, fragmentação dos ecossistemas e o estresse ambiental associado, como a poluição e mudanças microclimáticas (SOULÉ, 1991). Outro aspecto relevante associado a devastação das florestas tropicais é a perda do conhecimento acumulado sobre o uso medicinal das plantas destas florestas pelas comunidades que nelas viviam. A devastação provoca migração destas comunidades para outras regiões, rompendo com o fluxo de conhecimento adquirido e acumulado ao longo de gerações (SCHULTES, 1994), trazendo implicações negativas para a identificação de novas drogas através da etnobotânica e da etnofarmacologia (BUENZ, 2005).

Estas razões demonstram a necessidade do estabelecimento de políticas e ações de caracterização, conservação e proteção da diversidade genética vegetal, como também a criação de indústrias de base tecnológicas, além da formação e qualificação de recursos humanos. Não menos importantes são as ações relacionadas à propriedade intelectual e industrial, cujas leis vigentes são passíveis de alterações para melhor adequação ao panorama atual, visando oferecer melhor controle e vigilância os processos de bioprospecção no território nacional. Nesse sentido, a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada na cidade do Rio de Janeiro em junho de 1992, deu ensejo a uma ampla discussão sobre o assunto. A CDB têm como objetivos a conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável de seus componentes e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos, mediante o acesso a estes recursos e a transferência de tecnologia da forma adequada, levando em conta todos os direitos sobre tais recursos e tecnologias através do financiamento adequado (STROBL, 2000).

A região do Cariri, localizada ao Sul do Estado do Ceará, tem sua geografia marcada pela Chapada do Araripe, com uma área de proteção ambiental e uma floresta nacional. Esta região, com mais de oitenta municípios na chamada mesorregião do Araripe, compreendendo, além do Estado do Ceará, os Estados do Piauí, Pernambuco e Paraíba, sendo as cidades de Crato, Juazeiro do Norte e Barbalha o seu centro de desenvolvimento político e econômico (FUNDETEC, 1998).

Na Chapada do Araripe, com área de 55.000km<sup>2</sup>, a exploração de recursos energéticos oriundos de madeira se dá sem manejo adequado, o que levou, em poucas décadas, a uma redução de sua cobertura florestal em 50% (FUNDETEC, 1998; AUGUSTO; GÓES, 2007). A Chapada do Araripe abriga um bioma de características geológicas, geomorfológicas, pedológicas, climáticas, hidrográficas/ hidrológicas e de vegetação bem diversificado. As formações florestais da Chapada do Araripe podem, de maneira simplificada, ser estratificadas em mata úmida, cerradão, cerrado, carrasco e caatinga. Esta variedade de ambientes possibilita uma grande variedade de tipos vegetais, tanto arbóreos quanto arbustivos. Essa produção florestal é absorvida pelos produtores rurais para atender necessidades energéticas e de infra-estrutura dentro das propriedades (entre outras, cercas, construções rurais, cabo de ferramentas agrícolas e portais), representando uma atividade complementar às atividades agropecuárias nos períodos de estiagem no semi-árido nordestino. Além do potencial energético e madeireiro, também há a produção de frutos e produtos obtidos de espécies consideradas não madeireiras e que são utilizados como alimentos e como remédios na medicina tradicional tais como: araçá (*Psidium araçá Raddi*), cajuí (*Anacardium humile*), pitanga (*Eugenia michelli*), pequi (*Caryocar coriaceum*), janaguba (*Himatanthus drasticu*), faveira (*Dimorphandra gardneriana*), jatobá (*Hymenaea stignocarpa*) e pau de óleo ou copaíba (*Copaifera langsdorffii*), que apresentam valor econômico e cultural para a região (FUNDETEC, 1998).

O consumo de plantas medicinais baseado em informações terapêuticas, acumuladas durante séculos em todo o mundo é uma prática que tem se intensificado nas últimas décadas, embora o uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades seja tão antigo quanto a espécie humana. No Brasil, só na região amazônica, cerca de 1200 plantas são comercializadas no mercado Ver-o-Peso, em Belém do Pará e 260 espécies nativas e cultivadas já foram catalogadas em comunidades que vivem às margens da Baía de Marajó. Este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em áreas multidisciplinares abrangendo botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas buscam ampliar o conhecimento sobre a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

A etnofarmacologia, uma divisão da etnobiologia, é uma disciplina voltada para o estudo do complexo conjunto de relações entre plantas, animais e sociedades humanas presentes ou pretéritas (BERLIN, 1992). Como estratégia na investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto às comunidades que fazem uso da flora local com estudos químicos e farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Neste aspecto, a seleção etnofarmacológica de espécies vegetais para pesquisa e desenvolvimento baseados na informação de um efeito terapêutico, pode se constituir num valioso atalho para descoberta de fármacos. Por se basear em informações de utilidade terapêutica, a etnofarmacologia pode levar a identificação de produtos com mecanismos de ação completamente desconhecidos, ao contrário da abordagem mecanicista, que se baseia na interferência dos produtos em teste com mecanismos farmacodinâmicos predeterminados (ELISABETSKY, 1993).

A indústria farmacêutica aceita como razoável a relação de 1:10000 entre compostos comercializados/estudados. As que aplicam procedimentos de triagem associados à química combinatória, clonagem de receptores e automação consideram razoável 1:250.000. Mesmo quando se conhece o mecanismo de ação desejado e se tem o ensaio *in vitro* apropriado para detectá-lo, a maior parte dos compostos é descartada por ausência de biodisponibilidade ou por toxicidade elevada para o homem. De cada dez compostos descobertos, quatro seguem, para a fase de desenvolvimento e desses, 50%

apresentam toxicidade e/ou efeitos adversos antes mesmo de completarem os estudos de fase clínica I (HARVEY, 2002).

Os resultados dos estudos com plantas medicinais podem apresentar desdobramentos em vários níveis. Individualmente, a descoberta de novos fármacos ou fármacos acessíveis pode determinar uma melhoria na qualidade de vida no caso de doenças crônicas ou na sobrevivência do paciente. Socialmente, a descoberta de fontes naturais locais de compostos químicos que são normalmente importados junto ao desenvolvimento de fitomedicamentos de fabricação nacional pode ter conseqüências econômicas significativas, possibilitando também que cada país tenha autonomia para gerir as suas políticas de saúde. Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do decreto Nº 5.831, de 22 de junho de 2006, tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Com esta iniciativa, o Brasil, com seu amplo patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem em suas mãos uma oportunidade para estabelecer um modelo de gerenciamento próprio e soberano na área de saúde com o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando o uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeitando os princípios éticos e os compromissos internacionais assumidos, notadamente a Convenção da Diversidade Biológica (CDB) (BRASIL, 2006).

No plano de desenvolvimento das diretrizes da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, destaca-se o fomento à pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população (BRASIL, 2006). É nesse contexto que a etnobotânica e a etnofarmacologia assumem o papel de importantes mediadores entre o conhecimento tradicional e sua utilização comercial, já que essas disciplinas resgatam e organizam os conhecimentos tradicionais de maneira utilizável por processos de desenvolvimento tecnológico (ELISABETSKY; MORAES, 1989).

A despeito das questões que se apresentam, o uso de produtos naturais bioativos na investigação de processos moleculares e farmacológicos de organismos vivos irá continuar em condições até mais sofisticadas, graças aos avanços alcançados pela biologia molecular. Unindo a capacidade tecnológica que a biologia molecular oferece com a diversidade química, o futuro da descoberta de novas drogas a partir de produtos naturais é mais promissor do que nunca. Os produtos naturais descobertos até hoje têm desempenhado um papel fundamental na melhoria da qualidade de vida das populações humanas e esse papel continuará a existir enquanto houver fontes inexploradas para novos produtos naturais (CLARK, 1996). Segundo SOEJARTO et al. (2005), “a biodiversidade mundial continuará a ser um alvo atrativo para a realização de bioprospecção em massa no futuro”.

### **2.1.2. Microrganismos selecionados para estudo e sua importância na saúde.**

Uma característica comum entre as bactérias Gram – negativas é a presença de uma membrana externa que circunda a camada de peptidoglicano e é constituída de lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídios. Esta membrana tem funções especializadas: sua forte carga negativa é um fator importante para que a bactéria escape da fagocitose e da ação do sistema complemento, dois componentes da defesa do hospedeiro; a membrana externa também constitui uma barreira à certos antibióticos, enzimas, detergentes, metais pesados, saia biliares e a certos corantes. Parte de sua permeabilidade é devido a proteínas na membrana, as porinas, que formam canais os quais permitem a passagem de moléculas. O componente LPS é responsável por duas características importantes das bactérias Gram – negativas. Primeiro, a porção polissacarídica é composta por açúcares que funcionam como antígenos e permitem a identificação de espécies e sorotipos, como no caso da *E. coli* O157:H7. Segundo, a porção lipídica do LPS, chamada de lipídio A, é uma endotoxina que uma vez liberada na corrente sanguínea ou no trato intestinal do hospedeiro desencadeia um quadro de febre e choque. Essas endotoxinas, complexos de alto peso molecular, constituem a maior fonte de pirogênicos para a indústria farmacêutica, tornando a sua detecção e eliminação um desafio à produção de medicamentos e outros produtos de uso parenteral (TORTORA et al., 1998).

Uma das espécies de bactérias Gram – negativas utilizadas nesta pesquisa pertence à família Enterobacteriaceae. Do ponto de vista médico, alguns microrganismos desta família constituem um grupo importante de agentes causais de enfermidades no trato gastrointestinal e em outros órgãos. Destes, *Escherichia coli* é o microrganismo mais comum no trato intestinal do homem, onde sua presença é benéfica por auxiliar na produção de certas vitaminas e por promover a quebra de alimentos não digeríveis. Devido ao conhecimento obtido sobre a bioquímica e genética deste microrganismo, talvez ele seja o organismo mais conhecido na microbiologia e uma ferramenta importante na pesquisa biológica. Sua presença na água ou em alimento é um importante indicador de contaminação fecal. Embora não seja classicamente considerado um microrganismo patogênico, *Escherichia coli* pode ser uma causa comum de infecções urinárias. Algumas cepas podem ainda produzir enterotoxinas não invasivas causadoras da “Diarréia dos Viajantes” e de diarreia infantil em países em desenvolvimento. Menos comuns são os casos provocados por cepas invasivas de *E. coli* que tem como alvo a parede intestinal causando inflamação, febre e disenteria. As linhagens produtoras de toxinas enterohemorrágicas são a causa de graves surtos de enfermidades associadas à ingestão de carne e leite bovino. A linhagem mais virulenta deste grupo, *Escherichia coli* O157:H7, é habitante ocasional do trato intestinal de bovinos, onde não têm efeito patogênico, mas é responsável pelo quadro de colite hemorrágica no homem, acarretando altas taxas de mortalidade infantil (TORTORA et al., 1998).

A bactéria Gram – positiva selecionada para o estudo, *Staphylococcus aureus*, é um dos cocos de interesse médico. Este patógeno cresce relativamente bem em condições de alta pressão e baixa umidade, o que explica em parte a sua capacidade de crescimento e sobrevivência nas cavidades nasais e em certos alimentos que, pelas referidas condições de pressão e umidade, tendem a inibir outros microrganismos. Devido a uma considerável resistência ao calor, células vegetativas de *S. aureus* podem tolerar até 60°C por 30 minutos. Sua resistência à dessecação e a radiação também auxiliam a sua sobrevivência na superfície da pele, para onde são carregadas a partir das cavidades nasais do hospedeiro. *S. aureus* produz muitas toxinas que aumentam a sua capacidade de invadir e causar danos teciduais. As infecções mais comuns envolvem a pele e feridas em sítios diversos. Algumas

infecções são agudas, piogênicas e podem disseminar para outros tecidos, provocando focos metastáticos. Quadros mais graves como bacteremia, pneumonia, endocardite, miocardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais são descritos com frequência (LOWY, 1998). Uma causa muito comum de gastroenterite é a ingestão de enterotoxina produzida por este microrganismo, que afeta o trato intestinal de forma semelhante à toxina da cólera: a formação de AMP cíclico a partir do ATP no citoplasma das células epiteliais induz uma grande liberação de líquidos e eletrólitos, levando a um quadro severo de diarreia e vômito. Quase todas as linhagens de *S. aureus* são produtoras de coagulase, enzima que produz coágulos de fibrina no sangue e que protegem o microrganismo da fagocitose e o mantém isolado de outras defesas do hospedeiro. *S. aureus* é frequentemente um problema em ambiente hospitalar, uma vez que é carregado por pacientes, membros da equipe de trabalho e visitantes. É grande o risco de infecções de pele e feridas cirúrgicas, com o agravante que essas infecções são de difícil tratamento devido a alta resistência desenvolvida pelo microrganismo em decorrência da exposição a muitos antimicrobianos (BLACK et al., 1999)

#### **2.1.2.1. Resistência Bacteriana e Terapêutica Atual**

Durante os primeiros anos da era dos antibióticos, o desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos acompanhou ou ficou a frente da capacidade dos microrganismos clinicamente importantes de desenvolverem resistência. Apesar da disponibilidade de novos antimicrobianos, o ritmo de desenvolvimento de resistência em patógenos Gram – negativos e positivos representa um grande desafio em todo o mundo.

Nos anos 60 e 70, o uso indiscriminado de penicilinas semi – sintéticas resistentes a penicilinas e de cefalosporinas favoreceu o aparecimento de linhagens de *S. aureus* resistentes a metilina e na mesma época, o uso extensivo de ampicilina favoreceu o aparecimento de cepas de *E. coli* ampicilina – resistentes. Entre os anos 70 e 80, as bactérias Gram – negativas eram o grande obstáculo terapêutico, mas no novo milênio, as Gram – positivas passaram também a ocupar um lugar de destaque (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Enquanto a resistência microbiana tem crescido de forma significativa, o número de

antibióticos em pesquisas diminuiu drasticamente nos últimos anos. O percentual de artigos relacionados a novas resistências microbianas publicados no *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* aumentou de 11% no período de 1972-1973 para 34% no período de 1997-1998 (SWARTZ, 2000). Neste contexto, o uso incorreto dos antimicrobianos, uma das principais causas do aparecimento da resistência, pode estar associado a fatores como doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada, esquemas terapêuticos curtos, baixa penetração no local de infecção, conhecimento inadequado das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos para escolha terapêutica, além de fatores relacionados ao paciente, como idade, status imunológico e não – adesão ao tratamento (QUINTILIANI et al., 1994).

A situação atual da resistência às drogas tem sua origem em muitos fatores, incluindo a seleção de mutantes resistentes por exposição a agentes antimicrobianos, transferência de determinantes genéticos de resistência entre cepas bacterianas e disseminação clonal de cepas resistentes entre pacientes hospitalizados e entre instituições hospitalares. Como conseqüências estão o aumento da morbi – mortalidade entre pacientes, a redução do número de drogas utilizáveis por futuras gerações de pacientes, além do impacto econômico trazido pelos custos com infecções (McGOWAN JR, 2004).

Entre as bactérias Gram – negativas, cepas de Enterobacteriaceae não – fermentadores começaram a apresentar níveis de resistência cada vez mais expressivos frente à cefalosporinas de 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, o que dificulta a eliminação destes microrganismos nos processos infecciosos. Cepas produtoras de beta – lactamases de espectro ampliado (ESBL), capazes de inativar cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, passaram a ser uma preocupação mundial, causando uma mudança na abordagem terapêutica. A produção de carbapenamases, associada a problemas de permeabilidade da membrana e efluxo, são mecanismos complexos que se apresentam numa freqüência cada vez maior nos hospitais, principalmente nas cepas de microrganismos não – fermentadores como *P. aeruginosa* (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A função catalítica das beta – lactamases, enzimas encontradas em praticamente todas as Enterobacteriaceae, é a causa primária de resistência aos antibióticos beta – lactâmicos e tem sido objeto de estudo na área de microbiologia, genética e bioquímica. Nas bactérias Gram – negativas, a localização periplasmática destas enzimas favorece a sua concentração e atuação mais eficaz contra os antimicrobianos. As betas – lactamases de origem cromossômica ou plasmidial são expressas tanto por enterobactérias quanto por linhagens não – fermentadoras. Em 1965, uma beta – lactamase mediada por plasmídeo (TEM – 1) foi identificada em uma *E. coli* resistente a ampicilina. Ainda em 1969, estas enzimas foram identificadas em *P. aeruginosa*. Segundo relatos, em 1996, a TEM – 1 já ocorria em 60% das *E. coli* de todo o mundo e em 20 -50% de outras enterobactérias. A permeabilidade reduzida para entrada de antibióticos ao nível de membrana plasmática devido a alterações na expressão dos canais de porina, modificando a penetração e a ação dos antibióticos, juntamente com a propriedade de expulsar ativamente o antibiótico para fora da célula (bomba de efluxo), contribuição para uma concentração diminuída e inefetiva do antibiótico podem levar este microrganismo a apresentar uma resistência intrínseca a múltiplas drogas. Atualmente, no tratamento dos microrganismos que apresentam ESBLs, os carbapenêmicos são a primeira opção em casos de infecções graves. Em infecções consideradas menos graves, alguns autores recomendam o uso das quinolonas, dependendo da epidemiologia local (PATERSON; YU, 1999; TENOVER et al., 1999).

*Staphylococcus aureus*, considerado um patógeno oportunista, está freqüentemente associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Portadores e pacientes colonizados por *S. aureus* na mucosa nasal têm sido descritos como fatores de risco para o desenvolvimento de infecções, nas quais 11 a 43% dos pacientes colonizados desenvolvem infecção (LOWY, 1998; FRIDKIN, 2001; NAIMIN et al., 2003).

No início da década de 40, as cepas de *S. aureus* isoladas de processos infecciosos apresentavam sensibilidade á penicilina. Entre 1940 – 1960, a resistência à penicilina devido à produção de beta – lactamases (penicilinasas) passou a ser descrita e a predominar em cepas isoladas de pacientes hospitalizados, acarretando uma limitação do uso da penicilina e de seus derivados. Em 1960, a meticilina passou a ser utilizada como recurso

terapêutico, mas em 1961, surgiram cepas também resistentes à meticilina, denominadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), gerando um problema endêmico em hospitais de diversos países, inclusive no Brasil a partir de 1980. Até 1996, todas as cepas MRSA eram sensíveis aos glicopeptídios. O primeiro isolamento de um *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídios (GISA) foi em 1997 e em 2002 foi relatado o aparecimento de cepas resistentes aos glicopeptídios (GRSA). Até maio de 2004, já haviam sido descritas 3 linhagens portadoras do gene *vanA*, que codifica este perfil de resistência (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

No Brasil, os índices de linhagens MRSA são bastante elevados (40-80%), principalmente para linhagens isoladas de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Alguns trabalhos relatam uma taxa de mortalidade mais alta em pacientes que desenvolvem bacteriemia por MRSA (49-55%) do que por MSSA (20-32%) (ROMERO – VIVAS et al., 1995) e apontam índices de mortalidade 2,5 vezes maiores nos casos de infecção por MRSA em relação a MSSA (RUBIN et al., 1999).

Nas linhagens MRSA, o mecanismo de resistência está associado a alteração de proteínas ligantes de penicilina, codificadas pelo gene *mecA*, que faz com que a meticilina e os compostos penicilina – penicilinase tenham baixa afinidade pelo seu sítio alvo nas bactérias, a parede celular, o que os torna inefetivos. Uma vez detectadas cepas MRSA, as opções terapêuticas tornam-se bastante restritas e, no caso de infecções severas, os glicopeptídios como a vancomicina e a teicoplanina são as drogas de escolha (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

#### **2.1.2.2. Resistência a aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos compõem uma classe de moléculas que apresentam um núcleo aminociclitol que pode ser estreptidina ou a 2 – desóxiestreptamina. O primeiro aminoglicosídeo, estreptomicina, foi descoberto por Waksman e colaboradores em 1944 e foi isolado de *Streptomyces griseus* (JANA; DEB, 2006). A atividade bactericida destes antibióticos se deve a sua capacidade de inibir a síntese protéica por se ligarem à

subunidade ribossomal 30S, incapacitando o ribossomo bacteriano para a tradução, o que resulta em morte celular (KOTRA et al., 2000), sendo ativos prioritariamente contra bacilos Gram – negativos e cocos Gram – positivos aeróbicos (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999). Além disso, os aminoglicosídeos podem causar danos à membrana por alterar sua composição e permeabilidade, alterar as concentrações iônicas da célula e interferir nos processos de replicação e transcrição (FOURMY et al., 1996).

Os principais mecanismos de resistência são: a redução da concentração do antibiótico no interior da célula devido a existência de sistemas de efluxo ativos, alteração do alvo do antibiótico por mutação espontânea e/ou por alteração estrutural ou através de sistemas de inativação enzimática (WALSH, 2000; AZUCENA; MOMBASHERY, 2001; WALMSLEY, 2001).

Existem três tipos de enzimas modificadores de aminoglicosídeos: fosfotransferases (APH), acetiltransferases (AAC) e nucleotidiltransferase (ANT) (JANA; DEB, 2006). Com relação a alterações do sítio alvo, os eventos mais comuns são a metilação do RNAr 16S e mutações no gene *rrs* que codifica a proteína S12 (MEIER et al., 1994; YAMANE et al., 2005). Com relação aos sistemas de efluxo, foi demonstrado que os aminoglicosídeos podem ser substratos de diversos sistemas de fluxo, incluindo as 5 famílias de transportadores bacterianos MF (*Major Facilitator*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxin Extrusion*), RND (*Resistance Nodulation Cell Division*) e ABC (JANA; DEB, 2006).

### **2.1.2.3. Atividade modificadora da ação antibiótica**

Devido a crescente resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, muitas pesquisas têm focado a utilização de plantas com atividades antibacterianas (HERNÁNDEZ et al., 2003; SILVA-SANTOS et al., 2004; DUARTE et al., 2005; GAYOSO et al., 2005; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006 a, b), visto que, desde a antiguidade, filtrados, cataplasmas, infusões, sucos e extratos de plantas têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças (ANNUK et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2003).

Além de suas propriedades antibacterianas intrínsecas, produtos naturais de origem vegetal podem alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo a resistência aos antibióticos convencionais. Compostos que apresentam esta atividade são denominados de Modificadores da Atividade Antibiótica. A utilização destas substâncias pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam antibióticos por ação enzimática ou por sistemas de efluxo (como os aminoglicosídeos e outros antibióticos) (RAJYAGURU; MUSZYNSKI, 1997; TRIGGLE, 1988; CHAKRABARTY et al., 1998; KRISTIANSEN; AMARAL, 1997).

Nenhuma droga isolada foi identificada com a capacidade de reverter à resistência a aminoglicosídeos (JANA; DEB, 2006). Entretanto, exemplos desta possibilidade já foram obtidos com outros antibióticos. Em *S. aureus*, a Augmentin® (formulação combinada de um  $\beta$  – lactâmico com um inibidor de  $\beta$  – lactamase) é uma demonstração de que esta técnica pode funcionar (MAITI et al., 1998).

Com relação a drogas inibidoras de sistemas de efluxo, esses moduladores podem agir de diversas formas: interagindo com um ou mais sítios de ligação na proteína de fluxo, quelando o substrato da bomba; interferindo no gradiente de  $H^+$ ; modificando a conformação da proteína de fluxo devido a interação com a membrana plasmática ou inibindo a expressão gênica do gene responsável pela proteína de efluxo. De qualquer destas formas, os agentes modificadores da atividade antibiótica inibirão a extrusão do antibiótico, aumentando sua concentração intracelular e sua probabilidade de ligação com o sítio alvo e aumentando a eficiência do antibiótico (LOMOVSKAYA; BRUCE et al, 2006; ZLOH et al., 2004; POOLE; LOMOVSKAYA, 2006; MARKHAN et al., 1999).

Diversas substâncias já foram caracterizadas na literatura como Modificadores da Atividade Antibiótica, como as fenotiazinas (GUNICS et al., 2000), diterpenos (NICOLSON et al., 1999), flavonas e seus derivativos (SATO et al., 2004a,b). Em estudos *in vivo* já foi verificado que esta estratégia é promissora contra agentes infecciosos (RENAU et al., 1999; MARKHAN, 1999).

Com relação a produtos naturais, plantas podem ser uma excelente fonte de inibidores de sistemas de efluxo como forma de combater fitopatógenos (TEGOS et al., 2002; LEWIS, 2001; LEWIS; AUSUBEL, 2006), sendo um exemplo a reserpina, um alcalóide isolado das raízes de plantas do gênero *Rauwolfia* sp. (MARKHAN, 1999). Extratos de diversas plantas têm demonstrado atividade modificadora da ação antibiótica, entre eles: *Rosmarinus officinalis* L. (OLUWATUYI et al., 2004), *Lycopus europaeus* L. (GIBBONS, 2004), *Jatropha elliptica* Pohl. (MARQUEZ et al., 2005 OU MARQUEZ, 2005), *Dalea spinosa* A. Grey (BELOFSKY et al., 2006), *Geranium caespitosum* Gray & James (STERMITZ et al., 2003) e outros. Dessa forma, esta pode ser uma fonte potencial de utilização de produtos naturais no controle de agentes infecciosos resistentes à antibióticos.

#### **2.1.2.4. Atividade fotossensibilizante**

Existe um crescente interesse na avaliação de compostos bioativos oriundos de plantas que são ativados pela exposição à luz, com diversos trabalhos que enfocam a área de fotobiologia e fotoquímica demonstrando seu potencial como agentes terapêuticos (AUSTIN *et al.*, 1999; DALLA VIA; MAGNO, 2001; LOPEZ et al., 2001).

Muitos componentes vegetais, uma vez excitados pela exposição à luz, tanto UV quanto visível, apresentam fototoxicidade, sendo denominados de fototoxinas ou fotosensibilizantes. Uma grande variedade de plantas e fungos das mais diversas famílias apresentam substâncias fototóxicas, possivelmente como defesas naturais contra insetos e nematóides ou contra predação ou herbivoria (TOWERS et al, 1997; BERENBAUM, 1995; CHEEPHAM; TOWERS, 2002; KANG et al., 2007; TAYLOR et al., 1995). Esta atividade se deve basicamente a dois mecanismos: produção de radicais livres, pela produção direta de oxigênio *singlet* ou ainda afetando diretamente as células, como no caso das furocumarinas (FOOTE, 1991; SONG; TAPLEY, 1979). Compostos como polienos, tiofenos, tiarubrinas, quinonas, alcalóides, furocromonas e porfirinas são amplamente distribuídos em diversas famílias botânicas como Asteraceae, Hypericaceae, Apocynaceae,

Papaveraceae, Rubiaceae, Liliaceae, Rutaceae, Moraceae, Apiaceae e outras (TOWERS et al, 1997).

Já foi observada a atividade fototóxica de alguns compostos. A hipericina e a hipocrelina, isoladas de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) e *Hypocrella bambuase* (ascomiceto) apresentam atividades anti – HIV e antitumoral (TOWERS et al, 1997), enquanto diversos trabalhos mostram a atividade antibacteriana ativada pela luz (CHEEPHAM; TOWERS, 2002; KANG et al., 2007; TAYLOR et al., 1995).

O mais notório exemplo de composto com atividade fotossensibilizante são as furocumarinas (FC), compostos tricíclicos formados pela fusão linear (psoraleínas) ou angular (isopsoraleínas) de um anel furano com a cumarina (1,2 – benzopirona), os quais representam uma importante classe de compostos fotoativos, principalmente presentes em Rutaceae e Apiaceae (TOWERS et al, 1997). As FC, na presença de luz ultravioleta longa (UVL, ~365 nm) causam letalidade e uma série de outros efeitos biológicos devido a sua fotoreatividade com o DNA e outras macromoléculas e componentes celulares (CIMINO et al, 1985; AVERBECK, 1989; SCHMITT et al, 1995; AVERBECK; AVERBECK, 1998; BARRETO; SIQUEIRA-JUNIOR, 1998; BETHEA et al, 1999; ZAREBSKA et al, 2000). Esta atividade fotossensibilizante das furocumarinas constitui a base do tratamento a base de psoraleno administrado via oral e Luz Ultravioleta A (*Oral Psoralen and UVA – PUVA*), utilizado no tratamento de vitiligo, psoríase e outras doenças de pele (TOWERS et al, 1997).

Os efeitos das FC em combinação com UV curta (UVC, ~254 nm) têm sido bem menos estudados. BRIDGES (1971) mostrou que o pré – tratamento com 8 - metoxipsoraleína (8MOP) protegia as células de *E. coli* contra os efeitos letais da UVC, relatando também que tal FC aumenta a sensibilidade à UVC quando presente em meio de plaqueamento pós irradiação (BRIDGES; MOTTERSHEAD, 1979). Um outro derivado cumarínico, a 5,7-dimetoxicumarina, que não apresenta o anel furânico, também tem propriedade fotossensibilizante e fotoprotetora (BARRETO, 1997).

## 2.2. Revisão bibliográfica do gênero *Costus*

### 2.2.1. Etnofarmacologia e botânica do gênero *Costus*

Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas como diurético, tônico, emenagogo e diaforético, enquanto o suco da haste fresco diluído em água tem uso contra gonorréia, sífilis, nefrite, picadas de insetos, problemas da bexiga e diabetes (ALBUQUERQUE, 1989; VAN DEN BERG, 1993; CORRÊA et al., 1998 e 1994, VIEIRA; MORS et al., 2000). Externamente, sua decocção é empregada para aliviar irritações vaginais, leucorréia e no tratamento de úlceras (BOORHEM, 1999), enquanto que na forma de cataplasma é empregada para amadurecer tumores (MORS et al., 2000). Nas Guianas, o decocto da planta inteira é utilizado para disenteria, cólicas, como carminativa e laxante (GRENAND et al., 1987). Na sua composição química é registrada a presença, além de inulina, de ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens e pectinas (ALBUQUERQUE, 1989; CORRÊA et al., 1998; VIEIRA; ALBUQUERQUE, 1998). Há muitos relatos de que os constituintes das plantas Zinziberáceas da Malásia não apresentam atividades biológicas dos compostos isolados ou extratos brutos (SIRAT, 1994; SIRAT et al., 1994; SIRAT E NORDIN, 1994; SIRAT E LIAMEN, 1995; SIRAT E NORDIN, 1995; SIRAT et al., 1996). Mas sabe-se que, muitas espécies das Zinziberaceae apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (IWU; ANYANWU, 1982; YAMADA et al., 1982; BANDARA et al., 1989; JITOE et al., 1992; HARAGUCHI et al., 1996).

Por meio de estudos fitoquímicos e da combinação de espectroscopia e métodos químicos realizados com as partes aéreas da *Costus* spp, foi descrita a estrutura e o isolamento de dois novos diglicosídeos flavônicos, principalmente nas folhas da cana-do-brejo, como a tamarixetina 3-O-neohesperidosídeo e o canferídio 3-O-neohesperidosídeo. Estes glicosídeos flavônicos das folhas da planta demonstraram apresentar atividade inibidora da produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativados, onde apresentaram atividades antiinflamatórias. Além destes, foram identificados outros compostos muito

conhecidos como quercetina 3-O-neohesperidosídeo, juntos com mais seis outros flavonóides (SILVA et al., 2000).

De acordo com a literatura, muitos polissacarídeos do tipo glicano, encontrados em vegetais, mostraram possuir atividade antiinflamatória (CZARNECKI; GRZYBEK, 1995) e imunomoduladora (TOMODA et al., 1994). Muitos estudos sugerem que os mecanismos de ação desses polissacarídeos podem ser devido a sua ação no sistema retículo-endotelial, com a estimulação fagocitária. Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas como diurético, tônico, emenagogo e diaforético, enquanto o suco da haste fresco diluído em água tem uso contra gonorréia, sífilis, nefrite, picadas de insetos, problemas da bexiga e diabetes (ALBUQUERQUE, 1989; VAN DEN BERG, 1993; CORRÊA et al., 1998; VIEIRA; ALBUQUERQUE, 1998; MORS et al., 2000). Externamente, sua decocção é empregada para aliviar irritações vaginais, leucorréia e no tratamento de úlceras (BOORHEM, 1999), enquanto que na forma de cataplasma é empregada para amadurecer tumores (MORS et al., 2000). Nas Guianas, o decocto da planta inteira é utilizado para disenteria, cólicas, como carminativo e laxante (GRENAND et al., 1987). Na sua composição química é registrada a presença, além de inulina, de ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens e pectinas (ALBUQUERQUE, 1989; CORRÊA et al., 1998; VIEIRA; ALBUQUERQUE, 1998).

A ordem Zingiberales, pertencente às monocotiledôneas, possui 8 famílias: Cannaceae, Costaceae, Heliconiaceae, Lowiaceae, Marantaceae, Musaceae, e Strelitziaceae Zingiberaceae (NAKAI, 1941; CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; KRESS, 1990; APG II, 2003; ARAÚJO, 2007). A família Costacea, antiga Zingiberacea, é constituída por quatro gêneros: *Costus*, *Dimerocostus*, *Monocostus* e *Tapeinocheilas*, os quais são encontrados em áreas tropicais e subtropicais através do Novo e do Velho Mundo, em florestas pluviais e outros ambientes higrófilos.

*Costus* é o gênero com maior número de espécies, possuindo cerca de 175 espécies. Com distribuição pantropical, sendo que a maioria de suas espécies ocorre na Região Neotropical. (MAAS, 1972; STEVENSON; STEVENSON 2004; ARAÚJO, 2007).

A família Zingiberaceae, atualmente Costaceae, tem distribuição pangeográfica, especialmente na região dos trópicos, como no sudeste da Ásia (HOLTTUM,1950). As espécies desta família crescem naturalmente em regiões higrófilas e sombrias, em relevo de planícies ou colinas com declives, com touceiras de plantas espalhadas ou matas. Vários representantes desta família são facilmente reconhecidos pelas suas características botânicas. Especialmente: folhas aromáticas de formas elípticas e elípticas-alongadas e rizomas carnudos. Nessa região, várias espécies são usadas como especiarias, temperos, medicamentos, agentes flavorizantes e como fonte de certos corantes (BURKILL,1966). Muitas espécies do gênero *Alpinia*, *Amomum*, *Curcuma*, *Costus*, *Caempferia* e *Zingiber* estão presentes em ingredientes de tônicos tradicionalmente preparados e chamados de 'Jamu', que estão comercialmente disponíveis.

### **2.2.2. Revisão sobre a química e a farmacologia do gênero *Costus***

Foi realizado um levantamento abordando os aspectos químicos e farmacológicos do gênero *Costus*. As informações coletadas permitiu relacionar as espécies seguintes: *Costus discolor* Rosc.; *Costus dubius*; *Costus igneus* Nak; *Costus lucanusianus*; *Costus megalobactea* K. Schum.; *Costus pictus*; *Costus scaber*; *Costus* sp.; *Costus speciosus*; *Costus spicatus* Swartz; *Costus spiralis* Rosc e *Costus villosissimus*. Os princípios químicos identificados foram diogeninas, dentre elas as sapogeninas, flavonóides e outros constituintes químicos como compostos cumarínicos. Poucos estudos foram realizados sobre a atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas deste gênero *Costus*. As plantas selecionadas da literatura foram divididas e agrupadas em tabelas, onde as linhas *achuriadas* indicam a espécie de *Costus* e as colunas o tipo de extrato, classe e/ou constituintes químicos, atividades farmacognósticas e/ou outras, (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação das espécies de *Costus*, tipo de extrato, classe e/ou constituintes químicos, atividades farmacológicas e/ou outras registrados na literatura

<b>Tipo de extrato (material)</b>	<b>Classe e/ou constituinte químico</b>	<b>Atividade farmacológica e/ou outras</b>	<b>Referência bibliográfica (Autor, ano)</b>
<b><i>Costus discolor</i> Rosc.</b>			
- (Rizomas e Raízes)	-	Antioxidante Antibacteriano CP. Aeruginoso, B. Subtilis Antifúngico (A. ochroceous)	HAFIDH, 2009 HABSAH, 2000
<b><i>Costus dubius</i></b>			
Folhas	-	Uso popular na África contra malária	TITANJI, 2008
<b><i>Costus igneus</i> Nak</b>			
Aquoso (Folhas)	-	Hipoglicemiante	VISHALAKSHI, 2008
<b><i>Costus lacerus</i></b>			
Etanólico (Rizomas)	Diogênina $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside prosapogenina A 3-o-[ $\beta$ -D-glucoopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-[ $\beta$ -D-glucoopyranosyl]	Antioxidante	PRAWAT, 1989
<b><i>Costus lucanusianus</i></b>			
Aquoso (folhas)	-	Atividade contra diarreia em camundongos	OWOLABI, 007
<b><i>Costus megalobactea</i> K. Schum.</b>			
Rizomas e raízes	-	Antioxidante Antibacteriano CP. Aeruginoso, B. Subtilis Antifúngico (A. ochroceous)	HAFIDH, 2009 HABSAH, 2000

**Tabela 1.** (Continuação) Relação das espécies de *Costus*, tipo de extrato, classe e/ou constituintes químicos, atividades farmacológicas e/ou outras registrados na literatura

Tipo de extrato (material)	Classe e/ou constituinte químico	Atividade farmacológica e/ ou outras	Referência bibliográfica (Autor, ano)
<b><i>Costus pictus</i></b>			
- (Rizomas)	-	Ação antiinflamatória Antitumoral Ação antibacteriana Gastroprotetora	RAVOKATRA, 1974 TABATA, 1993 YUN, 1999 RYU, 2000 SUNITHA, 2001 UKIVA, 2002 KATERERE, 2003
Metanólico (folhas)	-	Não tóxico em ratos Hipolipemiante em ratos normais e diabéticos Hipoglicemiante em ratos diabéticos	NANDHA E KUMAR, 2007
Aquoso (folhas)	-	Hipolipemiante Hipoglicemiante Hipotrigliceridemiante	JAYASRI, 2008
<b><i>Costus scaber</i></b>			
Chá (folhas)	-	Hipocolesterolemiante Ação antiséptica urinária Ação hipoglicemiante	LANS, 2006
<b><i>Costus sp.</i></b>			
Hidroalcólico (folhas)		Baixa toxicidade pré-clínica	SÁ, 2008
<b><i>Costus speciosus</i></b>			
- (Rizomas)	Ester metílico do ácido paracumarínico	Ação antimicrobiana Ação antifúngica	BANDARA, 1988
Hidroalcoólico (Rizomas)	Sapodiogeninas	-	GUPTA, 1981
Aquoso (folhas)	Furostanol glicosídeo 2 $\beta$ -o-glucosidase	-	HIROKAZU, 2006

**Tabela 1.** (Continuação) Relação das espécies de *Costus*, tipo de extrato, classe e/ou constituintes químicos, atividades farmacológicas e/ou outras registrados na literatura

Tipo de extrato (material)	Classe e/ou constituinte químico	Atividade farmacológica e/ ou outras	Referência bibliográfica (Autor, ano)
<b><i>Costus spicatus</i> Swartz</b>			
Etanólico (1:5) (caule e folhas)	Diglicosídeos Flavônios Tamaxiretina 3-o-neohesperidosídeo Canferídeo 3-o-neohesperidosídeo Canferídeo 3-o-neohesperidosídeo Quercetina 3-o-neohesperidosídeo	Efeito antioxidante Antimutogênico Antigenotóxico em células eucarióticas	SILVA, 1999
Aquoso (Caule)	Polissacarídeos Trimetilsilato 2-butilglicosídeo D-glucopiranosose Pertrimetilsilato butilglicosídeo	Atividade antiinflamatória Imunomoduladora	SILVA, 2003
Metanólico (rizomas)	3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,25R)-26-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-22-methoxyfurost-5-en-3-yl O-D-apio- $\beta$ -D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[6-deoxy-a-L-mannopyranosyl-( $\square$ $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside  (3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,25R)-26-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-2-methoxyfurost-5-en-3-yl O-D-apio- $\beta$ -D-furanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[6-deoxy-a-L-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopyranoside  3-[[2-O-(6-deoxy-a-L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy]-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one  3-[[2-O-(6-deoxy-a-L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy]-5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one  3-[[2-O-(6-deoxy-a-L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy]-5,7-dihydroxy-2-[3,4-dihydroxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one	-	SILVA, 1999
Etanólico (rizomas)	Sapogeninas Diogênicas	Uso popular diurético	SILVA, 2004

**Tabela 1.** (Continuação) Relação das espécies de *Costus*, tipo de extrato, classe e/ou constituintes químicos, atividades farmacológicas e/ou outras registrados na literatura

Tipo de extrato (material)	Classe e/ou constituinte químico	Atividade farmacológica e/ ou outras	Referência bibliográfica (Autor, ano)
<b><i>Costus spiralis</i> Rosc</b>			
Etanólico à frio (folhas)	-	Ação bactericida a <i>Vibrio cholerae</i>	PÉREZ, 2008
Chá por infusão (folhas)	-	Antiinflamatória Doenças do trato urogenital Doenças venéreas (gonorréia e sífilis), Doenças cardíacas	ARAÚJO, 1999
Aquoso à quente (folhas)	-	Reumatismo Diabetes (uso popular) Ação emolítica em ratos	ARAÚJO, 1999
(Rizomas e raízes)	-	Antioxidante Antibacteriano <i>P. aeruginoso</i> , <i>B. subtilis</i> Antifúngico ( <i>A. ochroceous</i> )	RAVOKATRA, 1974 TABATA, 1993 YUN, 1999 RYU, 2000 SUNITHA, 2001 UKIVA, 2002 KATERERE, 2003
Hidrometanólico (20:80) (rizomas)	-	Antiinflamatória	HIROKAZU, 2006
Metanólico (rizomas)	(3 $\beta$ ,25R)-26( $\beta$ -d-glucopyranosyloxy)-22-hydroxyfurost-5-en-3-yl O-D-apio- $\beta$ -d-furanosyl-(152)-O-[ $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside  (3 $\beta$ ,25R)-26( $\beta$ -d-glucopyranosyloxy)-22-hydroxyfurost-5-en-3-yl Od-apio- $\beta$ -d-furanosyl-(154)-O-[ $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(152)- $\beta$ -d-glucopyranoside	-	SILVA, 2004
<b><i>Costus villosissimus</i></b>			
Rizomas e raízes	-	Antioxidante Antibacteriano CP. Aeruginoso, B. Subtilis Antifúngico ( <i>A. ochroceous</i> )	HAFIDH, 2009 HABSAH, 2000

## OBJETIVOS

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.-Objetivo geral**

Avaliar os extratos etanólicos e metanólicos do caule e das folhas de *Costus cf arabicus* quanto as suas atividades antibacterianas intrínsecas ou combinadas a antibióticos ou a luz UV.

#### **3.2.- Objetivos específicos**

- Identificar a presença dos metabólitos secundários através da fotoquímica experimental;
- Investigar a atividade antibacteriana mediada pela luz UV-A nos extratos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *Costus sp* frente a linhagens bacterianas padrões e isolados clínicos multiresistentes;
- Verificar a capacidade dos extratos de modular a atividade antibiótica de aminoglicosídios.

---

## MATERIAL E MÉTODOS

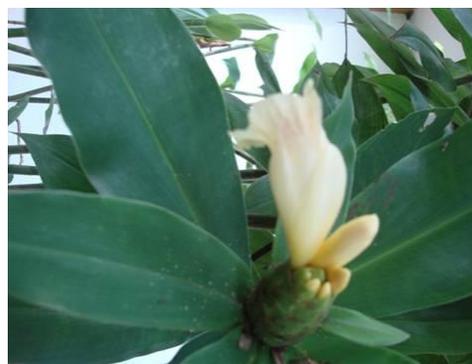
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Botânico (Origem e Obtenção do Extrato Vegetal)

A espécie em estudo, teve sua identificação botânica confirmada, onde o botânico identificador, o Prof. Dr. João Marcelo Alvarenga Braga, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, verificou tratar de uma planta de espécie desconhecida sendo identificado com um híbrido de *Costus arabicus*, híbrido este, ainda não descrito pela ciência. O mesmo sugeriu o nome para esta espécie de “*Costus cf. arabicus* L.”, anexo 1, figura 1.



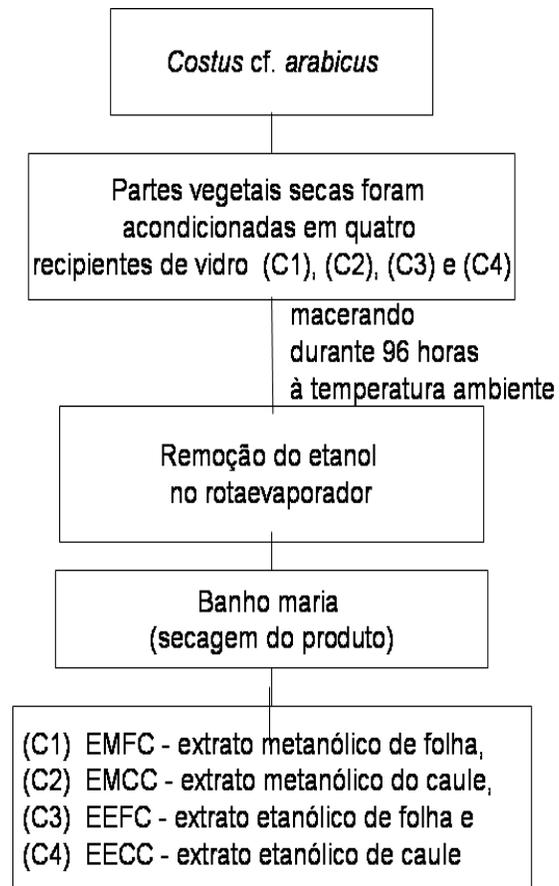
(a)



(b)

**Figura 1.** Espécie de *Costus cf. arabicus* L., em (a) pode ser observado as ramas, em (b) a flor do espécime botânico

O material botânico foi coletado no Horto Botânico do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Os extratos foram preparados com as folhas e caules secos, usando metanos e etanos separadamente, durante 98 horas à frio. Em seguida os solventes foram destilados em um evaporador rotativo a 80°C sob pressão reduzida, sendo os extratos brutos obtidos, pesados e arazenados, os extratos obtidos foram denominados (C1) EMFC - extrato metanólico de folha, (C2) EMCC - extrato metanólico do caule, (C3) EEFC - extrato etanólico de folha e (C4) EECC - extrato etanólico de caule.



**Figura 2.** Fluxograma para obtenção dos extratos etanólicos e metanólicos de folhas e caule de *Costus cf. arabicus*

## **4.2. Prospecção Fitoquímica**

A prospecção fitoquímica para detectar a presença de classes de metabólitos secundários presentes nos extratos, foi realizada segundo o método desenvolvido por (MATOS, 2000). Estes testes se baseiam na observação visual de mudança de coloração ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

## **4.3. Preparo da Solução Inicial e das Soluções de Teste.**

No preparo da solução inicial os extratos foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 10 mg do extrato solubilizados em 1mL de Dimetilsulfóxido DMSO, para obter uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir dessa concentração, foi efetuada uma diluição em água destilada estéril para se obter uma concentração de 1024µg/mL.

## **4.4. Microrganismos e meios de cultura**

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Foram utilizadas duas linhagens de bactérias *Escherichia coli* ATCC10536; *Staphylococcus aureus* ATCC25923, que são linhagens padrões Gram positivas e Gram negativas. As linhagens multirresistentes *S. aureus* (SA358) e *E. coli* (EC27) foram obtidas a partir de amostras clínicas obtidas nas cidades de Juazeiro do Norte- CE e João Pessoa - PB.

#### **4.5. Meios de cultura**

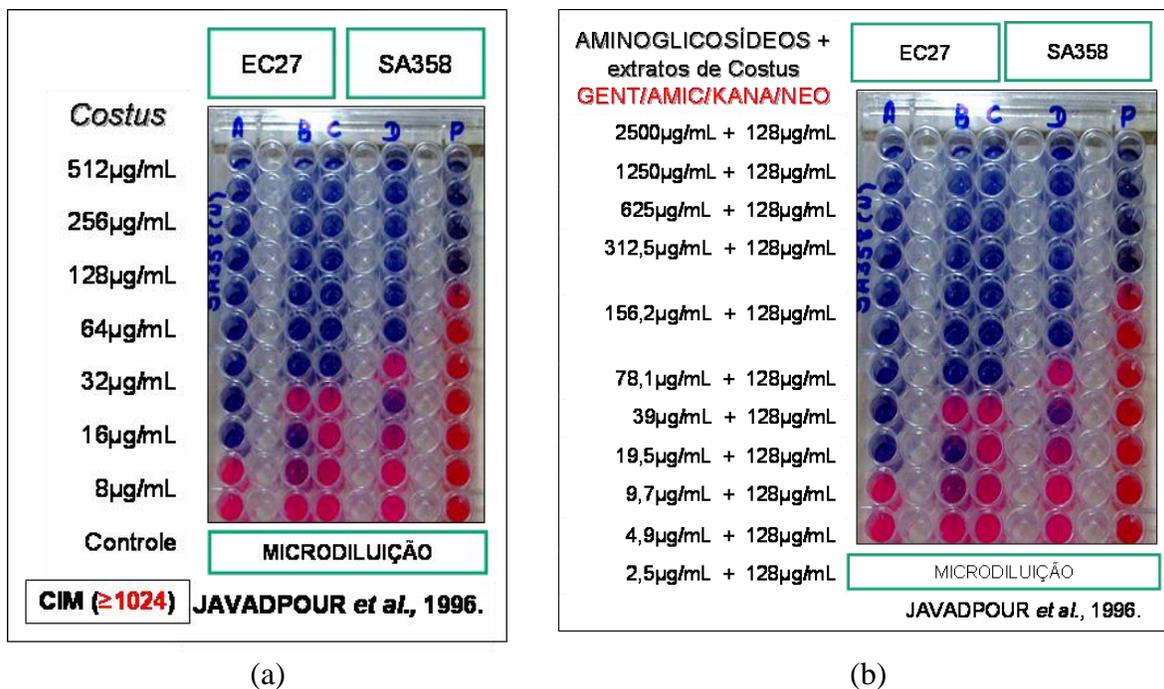
Foram utilizados nos ensaios biológicos os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories Ltda.), Caldo Brain Heart Infusion – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura preparados segundo as especificações do fabricante.

##### **4.5.1. Preparo e padronização de inóculos bacterianos**

Culturas de bactérias foram mantidas a 4°C em *Heart Infusion Agar* (HIA). Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens a serem testadas foram inoculadas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas na mesma situação antes do teste. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas até a obtenção de  $10^5$  células/mL (NCCLS, 2000).

#### **4.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).**

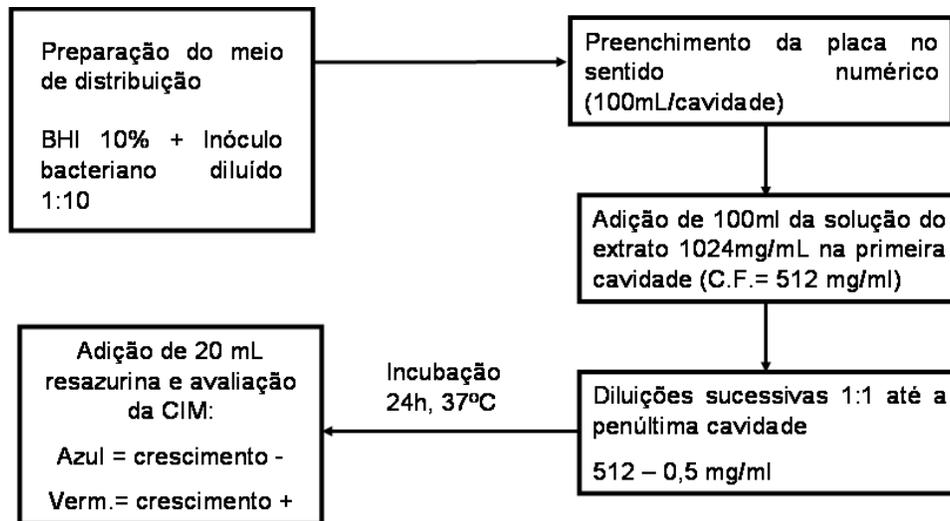
Os ensaios para determinação da CIM dos extratos metanólicos foram efetuados através do método de microdiluição em caldo, com concentrações variando de 512 a 8 µg/mL (512µg/mL, 256µg/mL, 128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL e 8µg/mL).



**Figura 3.** Observa-se em (a) a representação de uma placa com um teste de determinação da concentração inibitória mínima CIM e em (b) um teste com atividade moduladora em extratos de *Costus*

#### 4.6.1.1. Preparo dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas previamente padronizadas foram diluídas 1:10 em caldo BHI para obtenção da concentração final de  $10^5$  céls/mL (NCCLS, 2000).



**Figura 4.** Fluxograma representativo da metodologia empregada para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Costus*

#### 4.6.1.2. Execução e leitura dos ensaios

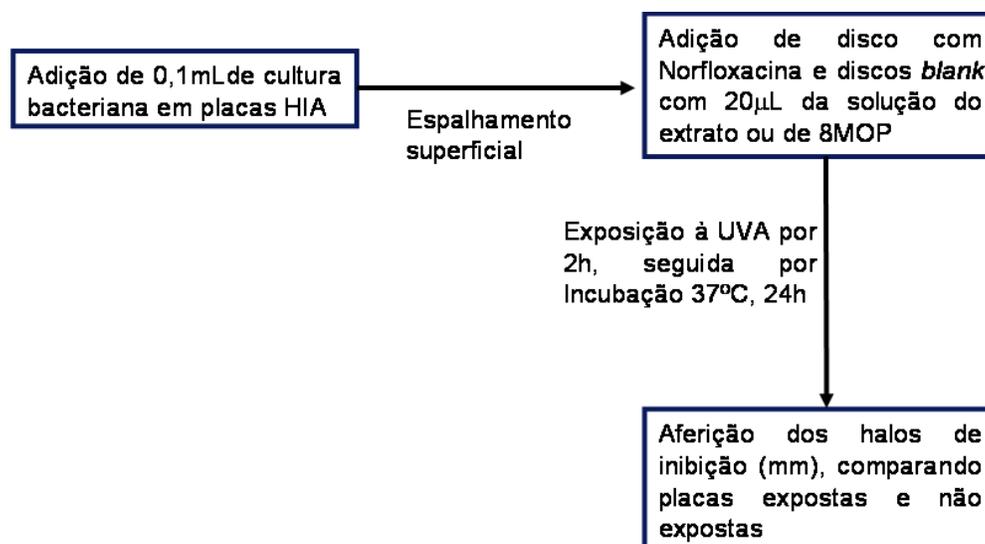
Esse método utiliza pequenos volumes de meio de cultura e de amostra, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. As amostras foram preparadas em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL e posteriormente foram diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura uma amostra suspensão bacteriana diluída 1:10. Controles negativos com o meio de cultura, controles positivos (meio + inoculo) e em concentração de 512 a 8 µg/mL foram incluídos nos ensaios. As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996).

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano (Mann; Markhan, 1998; Palomino et al., 2002), auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

#### 4.7. Atividade fotossensibilizante dos constituintes dos extratos de *Costus*

A possibilidade de interação dos compostos dos extratos de *Costus* com a luz UVA foi testada seguindo procedimentos *in vitro* padronizados por Lopes e cols. (2001), utilizando micro-organismos. O preparo da solução inicial da amostra observou as seguintes proporções: 10 mg de cada um dos quatro extratos de *Costus* que foram solubilizados em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração de 10 mg/mL. Nestes ensaios foram utilizadas as linhagens padrão de *E. coli* e *S. aureus*. O ensaio foi realizado através do método de difusão em ágar, modalidade em disco (*Agar Disk Diffusion*). Foram utilizados como controles positivos discos de norfloxacin (10 µg) e

discos *Blank* com 20 mL de 8-metoxipsoraleína (8-MOP) dissolvida em etanol para fotoativação. Para visualizar o efeito fototóxico, cada placa foi preparada em réplica: uma réplica foi exposta à luz UVA ( $\gamma = 320\text{--}400$  nm, quatro lâmpadas Sylvania F20T12-BLB, emissão máxima: 350 nm) por 2 horas. Após isso, as placas expostas à luz foram incubadas a 37°C por 24 h. A outra réplica foi diretamente colocada na estufa a 37°C para incubação, sem contato com a luz UVA enquanto a outra foi mantida no escuro. A leitura foi realizada através da aferição do tamanho das zonas de inibição (mm) e a atividade fototóxica foi avaliada através da comparação entre as duas réplicas.

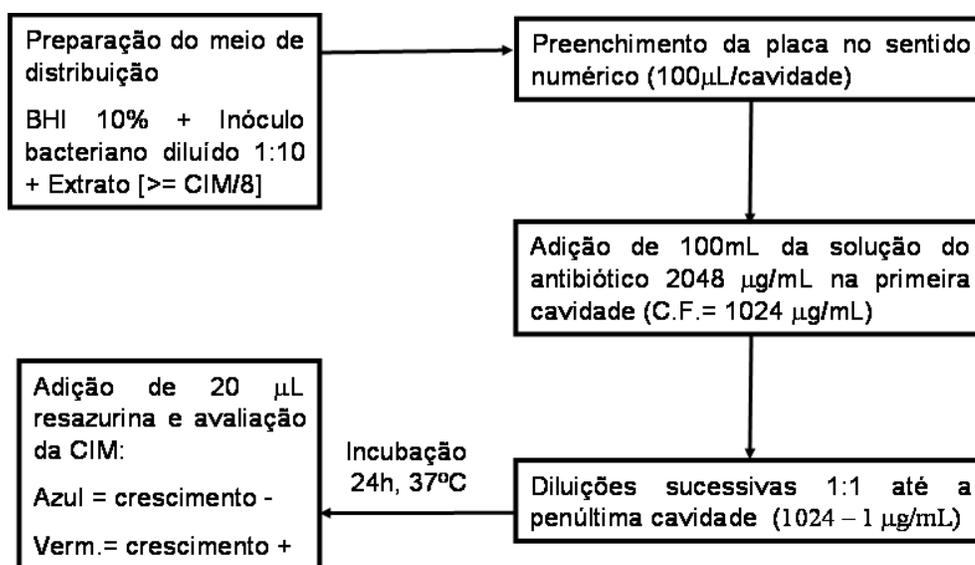


**Figura 5.** Fluxograma representativo da metodologia empregada para a avaliação da atividade fototóxica dos extratos de *Costus*

#### 4.8. Avaliação da interferência dos extratos na resistência aos antibióticos aminoglicosídeos.

Os extratos obtidos de *Costus sp* foram avaliados com relação à sua atividade moduladora da ação antibiótica contra as linhagens multirresistentes de *Escherichia coli* 27 e de *Staphylococcus aureus* 358.

Para avaliar os extratos como moduladores da ação antibiótica, a CIM dos aminoglicosídeos (canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina) foram avaliadas na presença e na ausência de todos os extratos em microplacas estéreis. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a Sigma.



**Figura 6.** Fluxograma representativo da metodologia empregada para avaliação da modulação da resistência à aminoglicosídeos em extratos de *Costus*

#### **4.8.1. Execução e leitura do ensaio**

Os extratos foram misturados em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias. A preparação das soluções de antibióticos realizou-se com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura contendo a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados (SATO et al., 2004, modificado). As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas e a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina sódica como citado antes

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise da Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica revelou a presença de dez metabólitos, distribuídos entre os quatro extratos de *Costus* sp. (EECC, EEFC, EMCC e EMFC), sua distribuição está apresentada na tabela 2.

**Tabela 2.** Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais do *Costus* cf. *arabicus* L

Metabólitos (+) presença; (-) ausência	Extratos de <i>Costus</i> cf. <i>arabicus</i> L			
	EECC	EEFC	EMCC	EMFC
Fenóis	+	-	+	+
Taninos Pirogálicos	-	-	-	-
Taninos Flobatênicos	-	+	-	-
Antocianinas	-	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-	-
Flavonas	+	+	+	+
Flavonóis	+	+	+	+
Xantonas	+	+	+	+
Chalconas	-	-	+	-
Auronas	-	-	+	-
Flavononóis	-	+	+	-
Leucoantocianidinas	+	+	-	+
Catequinas	+	+	+	+
Flavononas	-	-	-	-
Alcalóides	+	+	+	-
Terpenos	-	-	-	-
Esteróides	-	-	-	-
flavononas	-	+	-	+

EMFC - extrato metanólico de folha de *Costus* cf. *arabicus*, EMCC - extrato metanólico do caule de *Costus* cf. *arabicus*, EEFC - extrato etanólico de folha de *Costus* cf. *arabicus* e EECC - extrato etanólico de caule de *Costus* cf. *arabicus*

## 5.2. Atividade fototóxica

A exposição à luz UV-A demonstrou efeito sobre a atividade de dois extratos (EEFC e EMFC) contra *Staphylococcus aureus* e demonstrou também a atividade de três extratos (EEFC, EMCC e EMFC) contra *Escherichia coli*, (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade fototóxica apresentada pelos extratos de *Costus* sp. EECC, EEFC, EMCC e EMFC frente às linhagens ATCC de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923						<i>Escherichia coli</i> ATCC10536					
	1	2	3	4	NOR	8-MOP	1	2	3	4	NOR	8-MOP
UV+	-	12	-	12	35	19	-	13	11	11	40	18
UV-	-	-	-	-	32	-	-	-	-	-	33	-

1- Extrato Etanólico do Caule de *Costus* (EECC), 2- Extrato Etanólico das folhas de *Costus* (EEFC), 3- Extrato Metanólico do Caule de *Costus* (EMCC) e 4-Extrato Metanólico das Folhas de *Costus* (EMCC). NOR- norfloxacina, 8MOP- 8-metoxipsoraleína

Resultados expressos pela ausência (-) ou presença de zona de inibição de crescimento (dado numérico: tamanho do halo em milímetros (mm)em cada placa).

### **5.3. Análise da atividade antibacteriana dos extratos frente as linhagens ATCC e multiresistentes *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

Os extratos de *Costus sp* (EECC, EEFC, EMCC e EMFC) não demonstraram atividade microbiológica frente as linhagens padrão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em face de não apresentarem Concentração Inibitória Mínima – CIM  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ .

### **5.4. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica.**

#### **5.4.1. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Etanólico do Caule de *Costus sp* (EECC)**

Para EECC os quatro antibióticos testados (Amicacina, Canamicina, Gentamicina e Neomicina) sofreram interferência quando associados ao produto natural testados com a linhagem EC27, onde as concentrações inibitórias mínimas foram potencializadas demonstrando sinergismo entre o produto natural e os antibióticos para EC27 (Tabela 03).

Para a linhagem SA358 os testes com o extrato EECC não apresentaram nenhum tipo de interação com os antibióticos testados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EECC ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Antibióticos	CIM EC27	C1 (64 $\mu\text{g/mL}$ ) + antibiótico	CIM SA358	C1 (64 $\mu\text{g/mL}$ ) + antibiótico
C1	$\geq 1024$	-	$\geq 1024$	-
Canamicina	64	16	8	8
Amicacina	16	1	2	2
Neomicina	8	$\leq 0,5$	4	4
Gentamicina	8	2	1	1

C1 (extrato EECC), CIM EC 27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*), CIM AS 358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

#### 5.4.2. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Etanólico das Folhas de *Costus sp* (EEFC)

O extrato EEFC semelhante ao extrato EECC demonstrou sinergismo na sua concentração inibitória mínima com os quatro antibióticos testados frente a linhagem EC27 (Tabela 04).

O extrato EEFC também demonstrou sinergismo com os antibióticos amicacina e neomicina quando testados com a linhagem SA358, os demais antibióticos não demonstraram nenhum tipo de interação frente a essa mesma bactéria (Tabela 5).

**Tabela 5:** Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EEFC( $\mu\text{g/mL}$ ).

<b>Antibióticos</b>	<b>CIM EC27</b>	<b>C2 (64 <math>\mu\text{g/mL}</math>) + antibiótico</b>	<b>CIM SA358</b>	<b>C2 (64 <math>\mu\text{g/mL}</math>) + antibiótico</b>
C2	512	-	$\geq 1024$	-
Canamicina	64	16	8	8
Amicacina	16	4	2	0,5
Neomicina	8	1	4	1
Gentamicina	8	2	1	1

C2 (extrato EEFC), CIM EC 27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*), CIM AS 358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

#### **5.4.3. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Metanólico do Caule de *Costus sp* (EMCC)**

O extrato EMCC semelhante aos extratos anteriores também demonstrou sinergismo com os quatro antibióticos testados frente a linhagem EC27 (Tabela 6).

Quando testado frente a linhagem SA358 o extrato EMCC demonstrou sinergismo apenas com o antibiótico amicacina, os demais antibióticos não apresentaram interações com o extrato (Tabela 05).

**Tabela 6.** Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EMCC ( $\mu\text{g/mL}$ )

<b>Antibióticos</b>	<b>CIM EC27</b>	<b>C3 (64 <math>\mu\text{g/mL}</math>) + antibiótico</b>	<b>CIM SA358</b>	<b>C3 (64 <math>\mu\text{g/mL}</math>) + antibiótico</b>
C3	$\geq 1024$	-	$\geq 1024$	-
Canamicina	64	16	8	8
Amicacina	16	2	2	0,5
Neomicina	8	2	4	4
Gentamicina	8	2	1	1

C3 (extrato EMCC), CIM EC 27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirressistente de *E. coli*), CIM AS 358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirressistente de *S. aureus*).

#### **5.4.4. Teste da atividade moduladora da ação antibiótica do Extrato Metanólico das Folhas de *Costus sp* (EMFC)**

O extrato EMFC demonstrou sinergismo com os antibióticos canamicina e amicacina frente a linhagem EC27 os demais antibióticos não demonstraram interações com o produto natural testado (Tabela 06).

Na linhagem SA358 somente o antibiótico neomicina demonstrou interação com o produto natural (Tabela 7) os demais antibióticos não demonstraram nenhum tipo de interação com o produto natural.

**Tabela 7.** Teste da atividade modificadora da ação antibiótica do extrato EMFC, com os antibióticos canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina. Resultados em  $\mu\text{g/mL}$ .

Antibióticos	CIM EC27	C4 (64 $\mu\text{g/mL}$ ) + antibiótico	CIM SA358	C4 (64 $\mu\text{g/mL}$ ) + antibiótico
C4	512	-	$\geq 1024$	-
Canamicina	64	16	8	8
Amicacina	16	2	2	2
Neomicina	8	8	4	$\leq 0,5$
Gentamicina	8	2	1	1

C4 (extrato EMCC), CIM EC 27 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *E. coli*), CIM AS 358 (concentração inibitória mínima da linhagem multirresistente de *S. aureus*).

# DISCUSSÃO

## 6. Discussão

Nos últimos anos, a frequência de resistência microbiana e a associação desta resistência com doenças infecciosas graves têm aumentado de forma progressiva (JONES, 2001). Muitos organismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional, quanto contra os antibióticos de última geração, causando graves problemas de saúde pública e prejuízos econômicos (AUSTIN et al., 1999; PRATES; BLOCHJÚNIOR, 2001; JONES, 2001). Esse fato torna imperativo o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de lidar efetivamente com as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram, em face de todo o tipo de situação adversa.

Em vista do problema mundial com relação ao surgimento de bactérias multiresistentes á antibióticos, faz-se necessário que a indústria farmacêutica consiga produzir, testar, avaliara e liberar drogas para o uso como antibióticos. Como este processo é muito demorado, os produtos naturais na composição de fitoterápicos podem representar uma interessante abordagem para este problema.

Em aplicações cutâneas, substâncias fotossensíveis (capazes de se tornarem tóxicas após exposição à luz ultravioleta A (UVA) podem desencadear reações cutâneas indesejáveis, desencadeando lesões locais e inflamação (TISSERAND & BALACS, 1995). A exposição à luz UV-A demonstrou efeito sobre a atividade dos extratos EEFC e EMFC, tanto contra *Staphylococcus aureus*, como contra *Escherichia coli* e o EMCC demonstrou atividade contra *E. Coli*. Muitas substâncias quando expostas a luz ultravioleta, são excitadas e exibem fototoxicidade, essas substâncias estão distribuídas ao longo de várias famílias de plantas e fungos, provavelmente desempenham um papel de defesa contra o ataque de insetos e nematódeos ou contra a herbivoria (TAYLOR et al., 1995; BEREMBAUM, 1995; TOWERS et al.,1997; CHEEPHAM; TOWERS, 2002; KANG et al., 2007). Essa atividade consiste basicamente em dois mecanismos: (i) produção de radicais livres, que podem afetar diretamente o crescimento das células bacterianas, como

as furocumarinas; (ii) a formação de isômeros opticamente ativos, que possam ser ativados na presença da luz (SONG; TAPLEY, 1979; FOOTE, 1991). Provavelmente algum dos vários compostos presentes nos extratos de *Costus*, na presença da luz UV tem a propriedade de formar radicais livres ou isômeros que possuem atividade microbiológica. Por outro lado, este trabalho é o primeiro a indicar a atividade fotobiológica de uma planta do gênero *Costus* contra *S. aureus* e *E. Coli* após exposição a radiação UV-A

As plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de outras plantas, microrganismos, insetos fitófagos, e herbívoros predadores de uma maneira geral. Essas defesas são de natureza química e física e podem ser divididas em passivas e ativas. As defesas passivas são as barreiras pré-infeccionais e as ativas são as pós-infeccionais (HARBORNE, 1982; PINTO *et al.*, 2002). A distinção entre as barreiras de pré-infecção e as de pós-infecção não é facilmente estabelecida. A literatura especializada revela que muitas espécies de plantas já exibem a produção de compostos que conferem resistência ao ataque de invasores com o primeiro contato do patógeno, embora a concentração máxima só seja atingida após 24 horas desse contato (UZI *et al.*, 1986).

A Prospecção fitoquímica demonstrou entre outros compostos a presença de Flavonóides e Alcalóides. Flavonóides são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções microbianas, não é surpresa que eles tenham sido encontrados em extratos com expressiva atividade antimicrobiana (DIXON *et al.*, 1983). Sua atividade seria provavelmente devido à capacidade que possuem de complexarem com a parede bacteriana. Flavonóides com características lipofílicas podem também romper a membrana microbiana (TSUCHIYA *et al.*, 1994). Alcalóides com atividade antimicrobiana também já foram descritos. Seu modo de ação pode ser atribuído, entre outros motivos, à capacidade que possuem de interagir com DNA (PHILLIPSON, 2001).

Os flavonóides são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário e compreendem uma das maiores classes de produtos naturais, juntamente com isoprenóides e alcalóides (SHIRLEY, 1996). Estas substâncias podem estar presentes em diferentes órgãos das plantas como nos frutos, onde são particularmente abundantes (UGAZ, 1998), e

são muito estudados devido a suas inúmeras atividades biológicas, como por exemplo: atividade antioxidante, anticarcinogênica, antimicrobiana, ação antiinflamatória e antialérgica (ZUANAZZI, 2000).

Acredita-se que a ação moduladora de antibióticos deve-se a presença de compostos (flavonóides e alcalóides) (ZUANAZZI, 2000), presentes tanto nas folhas, como também no caule. Estes compostos originalmente estão associados ao desenvolvimento de mecanismo de defesa desta planta contra o ataque de microorganismos, de maneira que potencializaram a atividade dos antibióticos testados neste trabalho. Este trabalho é o primeiro relato da atividade moduladora da atividade antibiótica com extratos de plantas da Família Costaceae e de espécies do gênero *Costus* sp., razão pela qual não se encontra literatura sobre o assunto. Outros trabalhos foram desenvolvidos, demonstrando esta bioatividade utilizando tanto produtos naturais de origem animal quanto vegetal (FERREIRA et al., 2009; COUTINHO et al., 2009ab)

Os resultados da Atividade Moduladora da Ação Antibiótica demonstraram haver significantivas diferenças conforme trate de bactérias Gram positivas ou Gram negativas. A Atividade Moduladora da Ação Antibiótica se fez mais marcante frente à variedade EC27 de *Escherichia coli*, que é Gram negativa e menos intensamente quando testada na variedade SA358 de *Staphylococcus aureus*, que é Gram positiva. Os mecanismos de defesa de *S. aureus*, devem estar associados à sua membrana simples e parede celular de peptidoglicano espessa constituída por mureína, ácido teicóico e polissacarídeos ser mais eficiente do que os mecanismos de defesa de *E. Coli*.

Os resultados da potencialização da atividade antibiótica em todos os extratos testados, frente à variedade multiresistente de *Escherichia coli* – EC27 demonstram a grande potencialidade dos constituintes desta planta, que podem estar agindo isolados ou sinergicamente, constituindo-se num grande desafio para futuros testes clínicos, que venham a auxiliar a antibioticoterapia de *E. coli*.

## CONCLUSÃO

## 7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, no presente estudo, com o extratos de *Costus cf. arabicus* L. nos permitiram elaborar as seguintes conclusões:

Tanto o extrato etanólico, como metanólico das folhas de *Costus cf. arabicus* L demonstraram atividade fototóxica;

Os Extratos de *Costus cf. arabicus* L não apresentaram atividade antibacteriana intrínseca relevante do ponto de vista clínico;

Foi identificada a ação moduladora da atividade antibiótica dos extratos, principalmente contra a linhagem Gram negativa multiresistente;

O fracionamento dos extratos utilizados neste estudo, bem como o isolamento dos seus constituintes químicos se afiguram como desafio para novos estudos que visem a identificar as moléculas biologicamente ativas destes extratos, bem como descobrir os mecanismos de ação desta ação moduladora.

## REFERÊNCIAS

## 8. REFERENCIAS

AFOLAYAN, A.J. Extracts from the shoots of *Arctotis artotooides* inhibit the growth of bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v.41 n.1, p. 22-25, 2003.

ALBUQUERQUE, J.M. Plantas Mediciniais de Uso Popular. **ABEAS**, Brasília, 1989.

ANNUK, H.; HIRMO, S.; TURI, E.; MIKELSAAR, M.; ARAK, E.; WADSTROM, T. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, p. 41-45, 1999.

ARAÚJO T.V., DOMINGOS, C, ANA MONTEIRO, P.S., LANDMAN, M.T.R., LAPA, A.J., CADEN, C. .Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 66, Issue 2, August 1999, Pages 193-198

ARAUJO, F.P., OLIVEIRA, P.E.. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Rev. bras. Bot.** [online]. 2007, vol.30, n.1, pp. 61-70.

AUGUSTO, L.G.S.; GÓES, L. Compreensões integradas para vigilância da saúde em ambiente de floresta: O caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 23, sup. 4, p. 5549-5558, 2007.

AVERBECK, D. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. **Photochemistry and Photobiology**, v. 50, p. 859-882, 1989.

AVERBECK, D.; AVERBECK, S. DNA photodamage, repair, gene induction and genotoxicity following exposures to 254 nm UV and 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell system. **Photochemistry and Photobiology**, v.68, p. 289-295, 1998.

AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Update**, v. 4, p.106–117, 2001.

BAILEY & SCOTT. **Diagnóstico microbiológico**. São Francisco: Ed. Medica Panamericana, 1996, 879p.

BANDARA B.M.R., HEWAGE C.M., KARUNARATNE V. ADIKARAM N.K.B. Methyl ester of para-coumaric acid, Antifungal Principle of Rhizome of *Costus speciosus*. (1988), **Planta Med.**, 54(5), 477

BANDARA, B.M.R., FERNANDO, I.H.S., HEWAGE, C.M., KARUNARATNE, V., ADIKARAM, N.K.B., WIJESUNDARA, D.S.A. Antifungal activity of some medicinal plants of Sri Lanka. **Journal of the National Science Council of Sri Lanka** v. 17, p. 1- 13, 1989.

BARRETO, H.M. **Efeitos biológicos fotoinduzidos por derivados monofuncionais da cumarina em *Staphylococcus aureus***. Dissertação de mestrado. UFPB. 1997.

BARRETO, H.M.; SIQUEIRA, J.R. Uma breve revisão sobre a reação das furocumarinas com o DNA na presença de luz ultravioleta longa. **Paradigmas**, v. 11, p. 25-43, 1998.

BELOFSKY, G.; CARRENO, R.; LEWIS, K.; BALL, A.; CASADEI, G.; TEGOS, G. P. Metabolites of the “smoke tree”, *Dalea spinosa*, potentiate antibiotic activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 261-264, 2006.

BERENBAUM, M. Phototoxicity of plant secondary metabolites: insect and mammalian perspectives. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, p. 119-134, 1995.

BERLIN, B. On the making of a comparative ethnobiology. In: *Ethnobiological Classification: principles of categorization of plants and animals in traditional societies*, Princeton, Princeton University 1992.

BETHEA D.; FULLMER B.; SYED S.; SELTZER G.; TIANO J.; RISCHKO C.; GILLESPIE L.; BROWN D.; GASPARRO F.P.SOURCE. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of Dermatological Science**, Volume 1, pp. 78-88(11), 1999

BLACK, G. - *Microbiologia fundamentos e perspectivas*. 4 ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 1999, 323-325 p.

BOONYARATAVEJ, S.; HAYODOM, M.; PRARUGGAMO, S.; VEERACHATO, G.; PYRAMANN, K. Phytochemical Screening Tests in Thai Medicinal Plants III. **Journal of Science Research**, v. 8, p. 93, 1983.

BOORHEM, R.L. Reader's Digest – Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais. **Reader's Digest Brasil Ltda.**, Rio de Janeiro, 1999. 416 p.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 3th ed. Fortaleza:ESAM (Coleção Mossoroense), p. 187. 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRIDGES, B. A.; MOTTERSHEAD, R.P. Inactivation of *Escherichia coli* by near ultraviolet light and 8-methoxypsoralen: different responses of strains B/r and K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 39, p. 454-459, 1979.

BRIDGES, B.A. Genetic damage induced by 254 nm ultraviolet light in *Escherichia coli*: 8-methoxypsoralen as protective agent and repair inhibitor. **Photochemistry and Photobiology**, v. 14, p. 659-62, 1971.

BRUCE R. LEVIN<sup>1</sup> & DANIEL E. ROZEN. Microbiology Non-inherited antibiotic resistance, **Nature Reviews**, 4, 556-562, 2006

BUENZ, E.J. Country development does not presuppose the loss of forest resources for traditional medicine use. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.118-123, 2005.

BURKILL, I.H. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. **Crown Agent**, London, 1966.

CHAKRABARTY, A.N.; DASTIDAR, S.G.; ANNADURAI, S.; THAKURTA, A.G.; GHOSH, K. **Synergism, indifference and antagonism among nonantibiotics, with antibiotics and chemotherapeutic agents**. 1999.

CHEEPHAM, N.; TOWERS, G.H.N. Light – mediated activities of some Thai medicinal plant teas. **Fitoterapia**, v. 73., p. 651-662, 2002.

CIMINO, G.D.; GAMPER, H.B.; ISAACS, S.T.; HEARST, J.E. Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. **Annual Review in Biochemistry**, v. 54, p.1151-1193, 1985.

CLARK, A.M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharmaceutical Research**, v.13, n.8, p. 1133-1141, 1996.

Corrêa MP 1984. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura IBDF

CORRÊA AD, SIQUEIRA-BATISTA R, QUINTAS LE **Plantas Medicinais do Cultivo à terapêutica**. Petrópolis: Ed. Vozes 1998.

COUTINHO DM, VASCONCELLOS A, LIMA MA, ALMEIDA-FILHO GG, ALVES RRN: Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855). **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2009a, **9**:35.

COUTINHO HD, COSTA JG, LIMA EO, FALCÃO-SILVA VS, SIQUEIRA JP JR: Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin—resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2009, **9**:13.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CZARNECKI, R., GRZYBEK, J. Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides from fruit bodies of higher fungi P.I. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 123-127, 1995.

Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T. & Yeo, P.F. The families of the monocotyledons. **Springer-Verlag**, Berlin, 1985.

DALLA VIA, L.; MAGNO, S.M. Photochemotherapy in the treatment of cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p.1405-1418, 2001.

DIAZ, J., SERRANO, E., ACOSTA, F., CARBONELL, L.F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DIAZ, J.L. Ethnopharmacology of sacred psychoactive plants used by the Indians of Mexico. **Annual Review in Pharmacology and Toxicology**, v. 17, p. 647, 1977.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advanced Enzymology**, n.55, p.1-69, 1983.

DOBSON, A.P. **Conservation and diversity**. New York: Scientific American Library, 1996, 364p.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n. 2, p. 305-311, 2005.

ELISABETSKY, E. The status of ethnopharmacology in Brazil. **J. Ethnopharmacology**, v. 38, p.137, 1993.

ELISABETSKY, E.; COSTA – CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p. 110-120, 1996.

ELISABETSKY, E.; MORAES, J.A. **Ethnopharmacology as an instrument for technological development.** In: The First International Congress of Ethnobiology, v.2, parteE., p. 111-118, 1989.

ELVIN-LEWIS, Memory “Should We Be Concerned about Herbal Remedies?” **Journal of Ethnopharmacology**, no. 75, 2001.

FERREIRA FS, BRITO SV, COSTA JGM, ALVES RRN, COUTINHO HDM, ALMEIDA WO: Is the body fat of the lizard *Tupinambis merianae* effective against bacterial infections? **Journal of Ethnopharmacology** 2009, **126**:233-237.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, p.659, 1991.

FOURMY, D.; RECHT, M.I.; BLANCHARD, S.C.; PUGLISI, J.D. Structure of the A-site of *E. coli* 16 S rRNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, p. 1367–1371, 1996.

FRIDKIN, S.K. Vancomycin – intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, p. 108-115, 2001.

FUNDETEC - Fundação de Desenvolvimento Tecnológico do Cariri. **Plano de gestão da APA – Área de Proteção Ambiental da Chapada do Araripe.** Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, 1998.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. **Fitoterápicos.** Campinas: André Tosello, 1996. 17p.

GAYOSO, C.W. ; LIMA, B, E.O. ; OLIVEIRA, C, V.T. ; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; LIMA, I.O. ; NAVARRO, D.F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**. v. 76, n.2, p. 247– 249, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 263-277, 2004.

GRENAND, P., MORETTI, C., JACQUEMIN, H. Pharmacopées Traditionnelles en Guyane: Créoles, Palikur, Wayãpi. Editorial 1- **ORSTROM, College Review**, No.108, Paris, France, 1987.

GUNICS, G.; MOTOHASHI, N.; AMARAL, L.; FARKAS, S.; JOSEPH, M. Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p. 239–242, 2000.

GUPTA, M. M. S. U. FAROOQUI, R. N. LAL. Distribution and Variation of Diosgenin in Different Parts of *Costus speciosus*, *J. Nat. Prod.*, , 44 (4), pp 486–489, 1981

GURIB-FAKIM G. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27: 1-93, 2006.

HABSAH M, AMRAN M, MACKEEN MM, LAJIS NH, KIKUZAKI H, NAKATANI N, RAHMAN AA, GHAFAR , ALI AM. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **J Ethnopharmacol**. Oct;72(3):403-10, 2000

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p. 3864-3874, 1991.

HAMMOND, P.M. **The record to date: described species.** In: Heywood, V.H.; Watson, R.T. (eds.). *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p. 113-138.

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

HARBORNE, J.B. - **Higher plant-lower plant interaction: phytoalexins and phytotoxins.** In: \_\_\_\_\_ - *Introduction to Ecological Biochemistry*. 2. ed. New York, Academic Press, 1982. p. 227-61.

HARVEY, A.L. Natural Products for high-throughput screening. In: *Ethnomedicine and drug Development*. **Advances n Phytomedicine**, v.1, 2002.

HERNÁNDEZ, N.E.; TERESCHUCK, M.L.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from tafi del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 317-322, 2000.

HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J.G.; DURAN, A.; CABALLERO, J.; ROMO DE VIVAR, A.; LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine Zapolitán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188, 2003.

HIROKAZU S, SEIJI T, RYOKO W, YUSUKE F, NAOKI F, AKIO N, RYUSUKE Y, KAZUHIKO N, TOKUZO N, TORU N. An Isoflavone Conjugate-hydrolyzing – Glucosidase from the Roots of Soybean (*Glycine max*) Seedlings purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. **The journal of biological chemistry**, vol. 281, no. 40, pp. 30251–30259, October 6, 2006

HOLTTUM, R.E. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula. Gardens Bulletin of Singapore, v. 13, p. 1-249, 1950.

IWU, M.M., ANYAWU, B.N. Steroidal constituent of *Costus* afer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 263, 1982.

JANA, S.; DEB, J.K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 140–150, 2006.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107–3113, 1996.

JAYASRI, M.A., GUNASEKARAN, S., RADHA, A., MATHEW, T.L. Anti-diabetic effect of *Costus pictus* leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J Diabetes & Metabolism** 16: 117-122 117, (2008)

JITOE, A., MASUDA, T., TENGAH, I.G.P., SUPRAPTA, D.N., GARA, I.W., NAKATANI, N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1337-1340, 1992.

JONES, R.N. Resistance patterns among nosocomial pathogens. **CHEST**, n.119, p.397-404, 2001.

KANG, S.J.; KIM, S.H.; LIU, P.; JOVEL, E.; TOWERS, G.H.N. Antibacterial activities of some mosses including *Hylocomium splendens* from South Western British Columbia. **Fitoterapia**, v. 78, p.373-376, 2007.

KATERERE, D.R. GREV.A.I., NASH, R.J., WAIGH,R.D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African combretaceae. **Phytochemistry**, 68, 81-88, 2003

KOTRA, L.P., HADDAD, J., MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 44(12): 3249-3256.2000

KRESS, W. J. The phylogeny and classification of the Zingiberales. An. Missouri **Bot. Gard..** n.º 77. pp. 698-721. 1990

KRISTIANSEN, J.E.; AMARAL, L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.40, p.319–327, 1997.

LEWIS, K. In Search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 247-254, 2001.

LEWIS, K.; AUSUBEL, F.M. Prospects for plant-derived antibacterials. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1504-1507, 2006.

LIMA, E.O. **Estudo das dermatofitoses em João Pessoa – Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da Região contra alguns doo agentes isolados**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LOMOVSKAYA, O.; BOSTIAN, K.A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 910-918, 2006.

LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p.189 –196, 2001.

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

MAITI, S. N.; PHILLIPS, O. A., MICETICH, R. G. Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 441-56, 1998.

MANN, C.M., MARKHAN, J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MARKHAM, P.; WESTHAUS, E.; KLYACHKO, K.; JOHNSON, M. E.; NEYFAKH, A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2404-2408, 1999.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v. 87, p. 1137-1147, 2005.

McGOWAN Jr, J.E. Minimizing antimicrobial resistance: The key role of the infectious diseases Physician. **Clinical Infectious Disease**, v. 38, p. 939-942, 2004.

MEYER, B., PETERS, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 42: 864-890. (2003).

MICHELIN, D.C. ; MORESCHI, P.E. ; LIMA, A.C. ; NASCIMENTO, G.G.F. ; PAGANELLI, M.O. ; CHAUD, M.V. Evaluation of the antimicrobial activity of vegetal extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 727–737, 1999.

MOLNAR, J.; MOLNAR, A.; SPENGLER, G.; MANDI, Y. Infectious plasmid resistance and efflux pump mediated resistance. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 51, p. 333-349, 2004.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Incorporated Algonac, Michigan, 2000.

NAIMI, T. S., K. H. LEDELL, K. COMO-SABETTI, S. M. BORCHARDT, D. J. BOXRUD, J. ETIENNE, S. K. JOHNSON, F. VANDENESCH, S. FRIDKIN, C. O'BOYLE, R. N., DANILA, AND R. LYNFIELD. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA** **290**: 2976–2984, 30. 2003.

NAKAI, T. Notulae ad Plantas Asiae Orientalis, **Jour. Japanese Bot.** 17, 1-15, 1941

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5<sup>a</sup> ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P.W. Potentiation of methicillin activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 233-239, 1999.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3249-3254, 2004.

ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P.; ATHAYDE, M.L.; MENTZ, L.A. Brasilianische phytoterapeutika, ihre rolle im arzneimittelmarkt. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.35, p.1847-1848, 1989.

PANDEY, R.C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Medical Research Reviews**, v.18, p. 333-346, 1998.

PATERSON, D.L.; YU, V.L. Extended – spectrum beta – lactamases: a call for improved detection and control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1419-1422, 1999.

PATTERSON, M.S., MADSEN, S.J., WILSON, B.C. Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring in vivo during photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 5, p. 69-84, 1990.

PAULO, M.Q.; LIMA, E.O.; QUEIROZ, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Chemical and antimicrobial analysis obtained of essential oil of *Annonaceae*. **Phytochemical Society of North America Newsletter**, v. 32, n. 1, p. 27, 1992.

PINTO, A.; SIQUEIRA, D.H.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. - Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, 25: 45-61, 2002.

POOLE, K., LOMOVSKAYA, O. Can efflux inhibitors really counter resistance? **Drug Discov.**, 3:145-152, 2006

PRATES, M.V.; BLOCH-JUNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos. **Biotecnology** n.23, p.30-36, 2001.

QUINTILIANI, R.; NIGHTINGALE, C.H.; FREEMAN, C.D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in antibiotic selection, with particular attention to oral cephalosporin. **Infectious Disease and Clinical Practice**, v.3, p. 1-7, 1994.

RAJYAGURU, J.M.; MUSZYNSKI, M.J. Sensitization of *Burkholderia cepacia* to antibiotics by cationic drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.41, p. 277–280, 1999.

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E.P.; SILVA, A. B.; LEITÃO, A. C.; DELLAMORAORTIZ, G.M. Avaliação fototóxica e screening mutagênico de extratos de propolis, *Aloe spp.* e *Hamamelis virginiana*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n.2, p. 105-111, 2005.

RENAU, T. E.; LEGER, R.; FLAMME, E. M.; SANGALANG, J.; SHE, M.W.; YEN, R. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 4928-4931, 1999.

RIOS, J.L., MAÑEZ, S., PAYA, M., ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1947-1950, 1992.

RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.S.; AMARENTE, J.M.B.; ALVES FILHO, M.B.; GRIMBAUM, R.S.; RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: Prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. 647 p.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência Bacteriana. Interpretando o antibiograma**. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 118p.

RUBIN, R.J.; HARRINGTON, C.A.; POON, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J.A.; MOIDUDDIN, A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York city hospitals. **Emergent Infectious Disease**, v. 5, p. 9-17, 1999.

SATO, Y.; SHIBATA, H.; ARAI, T.; YAMAMOTO, A.; OKIMURA, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$  – lactam antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 28-35, 2004b.

SATO, Y.; SHIBATA, H.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. 6,7 – dihydroxyflavone dramatically intensifies the susceptibility to  $\beta$  – lactam antibiotics in methicillin - resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1357-1360, 2004a.

SCHMITT, I.M.; CHIMENTI, S.; GASPARRO, F.P. Psoralen-protein photochemistry--a forgotten field. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 27, p.101-107.1995.

SCHULTES, R.E. Burning the library of Amazonia. **The Sciences**, March/April, p.24-31, 1994.

SHIRLEY, W.B. - Flavonoid biosynthesis: “new” function for an “old” pathway. Trends in **Plant Science**, 1: 377-81, 1996.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v.61, p.1053-1071, 1998.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A.M.S.; BIZZO, H.R.; D'AVILA, C.A.; SOUZA-SANTOS, L.C.. The application of essential oils and terpenics/terpenoids compounds in the fields of pharmaceutical and cosmetic through the knowledge registered in patents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 14, Supl. 1, p. 48-50, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANI, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2002. 893 p.

SIRAT, H.M. Study on the terpenoids of *Zingiber ottensi*. **Planta Medica**, v. 60, p. 497, 1994.

SIRAT, H.M., LIAMEN, M.R. Chemical constituents of *Alpinia purpurata*. *Pertanika Journal of Science and Technology*, v. 3, p. 67-71, 1995.

SIRAT, H.M., MASRI, D., RAHMAN, A.A. The distribution of labdane diterpenes in the Zingiberaceae of Malaysia. **Phytochemistry**, v. 3, p. 699-701, 1994.

SIRAT, H.M., NORDIN, A.B. Chemical composition of the rhizome oil of *Alpinia conchigera* Griff from Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 195-197, 1995.

SIRAT, H.M., NORDIN, A.B. Essential oil of *Zingiber ottensi* valetton. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, p. 635-636, 1994.

SIRAT, H.M., RAHMAN, A.A., ITOKAWA, H., MORITA, H. Constituents of rhizomes of two *Alpinia species* of Malaysia. **Planta Medica**, v. 62, p. 188-189, 1996.

SOEJARTO, D.D.; FONG, H.H.S.; TAN, G.T.; ZHANG, H.J.; MA, C.Y.; FRANZBLAU, S.G. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: issues on intellectual property and benefit-sharing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 15-22, 2005.

SONG, P.S.; TAPLEY, K.J. Photochemistry and photobiology of psoralens. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 1177-1197, 1979.

SRINIVASAN, C., LIBA, A., IMLAY, J.A., VALENTINE J.S., GRALLA, E.B. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275,

STERMITZ, F. R.; BEESON, T. D.; MUELLER, P. J.; HSIANG, J.; LEWIS, K. *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump inhibitors from a *Berberis* and a *Mohonia* (sensu strictu) species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 793-798, 2001.

STROBL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v.5, p. 29-41, 2000.

SWARTZ, M.M. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p. 2009-2016, 2000.

TAYLOR, R.S.; MANADHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Screening of selected medicinal plants of Nepal for antimicrobial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 153-159, 1995.

TEGOS, G.; STERMITZ, F.R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 3133-3141, 2002.

TENOVER, F.C.; MOHAMED, M.J.; GORTON, T.S.; DEMBEK, Z.F. Detectio and reporting of organisms producing extended – spectrum beta – lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 4065-4070, 1999.

TIP-PYANG, S.; SATHANASAOWAPAK, S.; KOKPOL, U.; PHUWAPRAISIRISAN, P. Antibacterial flavonoids from *Boesenbergia pandurata*. **ACGC Chemical Research Communications**, v. 10, p. 21-26, 2000.

TORTORA, G.R.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology: An introduction**. 6<sup>a</sup> Ed. Menlo Park: Addison Wesley Longman. 1998, 832p.

TOWERS, G.H.N.; PAGE, J.; HUDSON, J.B. Light – Mediated Biological activities of natural products from plants and fungi. **Current Organnic Chemistry**, v. 1, p. 395 –414, 1997.

TRIGGLE, D.J. **The chemistry of calcium channel agonists and antagonists**. In: Born, G.V.R., editor. Handbook of Experimental Pharmacology. Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 115–133, 1988.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIAYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; LINUMA, M. Comparative study of the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, n.50, p.27-34, 1994.

UGAZ, O.L. - **Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales.** Lima, Pontificia Universidad Católica Del Perú, 1998. 213p.

UZI, A.; SZTEINBERG, A; CARMELY, A. - 6,7-Dimethoxycoumarin, a Citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. *Phytochemistry*, 25: 1855-6, 1986.

VAN DEN BERG, M.E. **Plantas Medicinais na Amazônia- Contribuição ao seu conhecimento sistemático.** Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 1993. 206 p.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v.3, p.232-238, 1998.

VIEIRA, J.E.V.; BARROS, G.S.G.; MEDEIROS, M.C.; MATOS, F.J.A.; SOUZA, M.P.; MEDEIROS, M.J. Pharmacologic screening of plants from Northeast Brazil. II. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 49, p. 67-75, 1968.

VIEIRA, L.S., ALBUQUERQUE, J.M. **Fitoterapia Tropical – Manual de Plantas Medicinais.** FCAP - Serviço e Documentação e Informação. Belém, 1998.

WALMSLEY, M. The structure and function of drug pumps. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 71–79, 2001.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781, 2000.

WOLFART, K.; SPENGLER, G.; KAWASE, M.; MOTOHASHI, N.; MOLNAR, J.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L. Interaction between 3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridines and ampicillin, and erythromycin on different *E. coli* strains. **In Vivo**, v.20, p. 367-372, 2006.

ZAREBSKA, Z.; WASZKOWSKA, E.; CAFFIERI, S. & DALL'ACQUA, F. PUVA (psoralen + UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. **Farmaco**, v.55, p.515-520, 2000.

ZLOH, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 881-885, 2004.

ZUANAZZI, J.S.S. - Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al.-**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, , p.489-515, 2000