



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

Teógenes Matias de Souza

**Prospecção química, atividade antioxidante, antibiótica
(bactérias, fungos e protozoários) e citotóxica de
Pityrogramma calomelanos (L.) Link.**

Crato - CE

2012

Teógenes Matias de Souza

**Prospecção química, atividade antioxidante, antibiótica
(bactérias, fungos e protozoários) e citotóxica de
Pityrogramma calomelanos (L.) Link.**

resentada ao Programa de
) em Bioprospecção
Universidade Regional do
A como requisito parcial
do título de MESTRE em
'ÇÃO MOLECULAR.

Orientador:

o Álamo Feitosa Saraiva

Co-orientador:

Douglas Melo Coutinho

Universidade Regional do Cariri - URCA

Crato - CE

- 2012 -

Souza, Teógenes Matias de.
S719p Prospecção química, atividade antioxidante, antibiótica (bactérias, fungos e protozoários) e citotóxica de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link/ Teógenes Matias de Souza. – Crato, 2012.
179p.;il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. *Pityrogramma calomelanos*, atividade antibiótica; 2. atividade moduladora de antibióticos. I.Título.

CDD: 615. 323

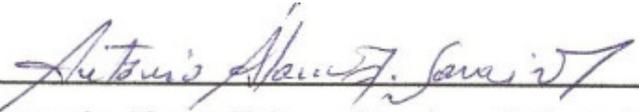
Teógenes Matias de Souza

PROSPECÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBIÓTICA (BACTÉRIAS, FUNGOS E PROTOZOÁRIOS) E CITOTÓXICA DE *Pityrogramma calomelanos* (L.) LINK. (PTERIDACEAE).

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovado em 29 de Fevereiro de 2012.

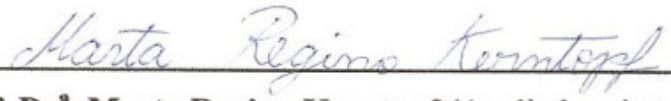
BANCA EXAMINADORA



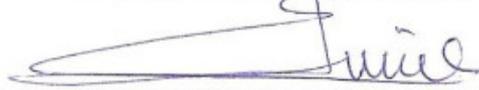
Prof. Dr. Antonio Alamo Feitosa Saraiva (Orientador)
Departamento de Ciências Biológicas – URCA



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Avaliador interno)
Departamento de Química Biológica – URCA



Prof. Dr^a. Marta Regina Kerntopf (Avaliadora interna)
Departamento de Química Biológica – URCA



Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima (Avaliadora externa)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB



Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes (Avaliador interno- Suplente)
Departamento de Química Biológica – URCA

*A minha mãe Maria do Socorro, meu pai Vilmar Luiz, meus irmãos Túlio e Tiago,
minhas queridas e lindas sobrinhas Eloisa e Kawany
e minha linda noiva Laiane.*

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, pelo regimento perfeito de nossas vidas.

*A minha mãe **Maria do Socorro**, pelo amor e atenção incondicionais para comigo por todos os anos da minha vida. A meu pai **Vilmar Luiz**, pelos notórios exemplos de coragem e dedicação à família. A minha noiva **Laiane**, pelo carinho, atenção e paciência despreendidos durante todo o tempo de realização do trabalho.*

*A meu orientador, **Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva**, por seu apoio durante as etapas deste estudo, especialmente na escolha e coleta da planta na fase inicial do projeto. Ao meu co-orientador, **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**, por seu apoio imensurável em todas as fases deste trabalho, meu muito obrigado!*

*A minha grande amiga **Flaviana**, pela ajuda monumental, a quem devo grande parte da execução e realização desta dissertação, incluindo o glorioso auxílio na realização das análises microbiológicas.*

*A Prof^ª. **Dr^ª. Marta Regina Kerntopf Mendonça** pela enorme dedicação na correção desta dissertação. Ao prof. Dr. Irwin Alencar Menezes e ao LFQM, pelo auxílio nos cálculos estatísticos. A prof. Dra. Maria Celeste Vega Gomez, por sua grande contribuição e parceria na realização deste trabalho. A prof^ª. Dr^ª. Edeltrudes de Oliveira Lima - UFPB, por ceder as linhagens de bactérias e fungos para realização dos testes. Ao prof. Dr. José Galberto e ao LPPN, pela atenção e disponibilidade de seu laboratório para realização dos testes físico-químicos.*

Aos queridos amigos que conviveram comigo durante o desenvolvimento do projeto de mestrado. A Thais Fracelino pelo grande apoio na transcrição de artigos para a língua inglesa. A todos que fazem parte do LMBM, pelos bons momentos que tive durante esses quase dois anos. A todos os professores do Curso de Pós-Graduação, especialmente aqueles com quem pude compartilhar conhecimentos. Aos colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, pela amizade que foi construída no período de quase dois anos e que se solidificará com o tempo.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação Waltécio e Alison e as secretárias, Andeciele e Lenira, pela atenção e serviços prestados.

*A **FUNCAP** e **CNPQ** pelo suporte financeiro. A **URCA**, por ser a instituição educacional pioneira na implantação do Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Bioprospecção Molecular. A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a iniciação, execução e conclusão deste trabalho, meu muito obrigado!*

Nesta breve e longa caminhada pela vida de meu Deus, grandes desafios geram grandes resultados, e estes, são como frutos maduros que caem de uma árvore bem desenvolvida. Porém, para que esses gravitem em seus pés, e assim, possam ser degustados apenas com um simples curvar, é necessária muita fé, força de vontade e inúmeros sacrifícios ao longo da trajetória existencial. De início, deve-se plantar e regar com zelo durante anos aquilo que lhe é almejado. Certamente, durante sua jornada, algumas pedras surgirão na forma Katrinas e tsunamis orientais destinados a destruir as raízes que brotam de seus sonhos em direção a fonte vital, a esperança. Todavia, nenhum fenômeno por mais poderoso e devastador que seja, será capaz de obstruir e causar isquemia em raízes profundas e bem irrigadas. Dessa forma, após muita fadiga, terá conseguido ao longo da vida uma árvore bem enraizada, que te dará sombra e descanso, não sendo mais necessário tanto empenho e vigor, pois agora, os caminhos de seus horizontes estão nutridos com água, ar e luz abundante, tornando-se assim, fáceis de serem vistos e percorridos.

*“Aquilo que for conquistado através de sonhos bem cultivados,
em sua vida tornar-se-ão eternos”*

Teógenes Matias de Souza,

2012.

RESUMO

Bioprospecção de produtos naturais é a pesquisa de material biológico com finalidade de exploração de recursos naturais de forma a garantir o uso sustentável e uma distribuição justa e equitativa dos benefícios advindos de sua utilização, como por exemplo, o desenvolvimento e produção de novos fármacos. Dessa forma, grupos de pesquisa buscam cada vez mais a descoberta de substâncias de origem natural que apresentem baixa toxicidade para células humanas e elevada eficácia contra o que se deseja combater. *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. pertence a família Pteridaceae e é conhecida no Brasil como avenca-branca e avenca-preta. Sua etnobotânica revela que a espécie é utilizada para fins medicinais, tais como: anti-hemorrágico, analgésico, antigripal, antitérmico, antitussígeno, anti-hipertensivo, estimulante da circulação sanguínea, emenagoga, contra distúrbios renais, problemas urinários e pedras na vesícula, adstringente e depurativo peitoral. Porém, nenhuma dessas indicações é cientificamente comprovada. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são espécies de bactérias com alto potencial patogênico e capacidade de desenvolver resistência a antibióticos. *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* causam candidíase, infecção fúngica oportunista que afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos. Países em desenvolvimento, ricos em biodiversidade e com abundantes conhecimentos tradicionais como o Brasil, ainda apresentam alta incidência de casos de leishmaniose e doença de Chagas. Uma alternativa para o tratamento destas enfermidades são produtos naturais de *P. calomelanos*. Extrato etanólico (EEPC), fração hexânica (FHPC), fração acetato de etila (FAEPC) e fração metanólica (FMPC) de *P. calomelanos* foram utilizados na pesquisa de diferentes bioatividades. Doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta em todo o mundo cerca de 16 a 18 milhões de pessoas, das quais 50 mil morrem a cada ano, além disso, estima-se que 25 milhões de pessoas correm risco de infecção. Para a atividade tripanocida, a FHPC apresentou excelente atividade na concentração de 50 µg/mL, pois houve 71 % de morte ou inibição do crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* com 0 % de citotoxicidade em células humanas (fibroblatos NCTC929). Leishmanioses é um grupo de doenças polimórficas causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*. Existem cerca de 12 milhões de pessoas afetadas em 88 países, adicionalmente, estima-se que cerca de 120 milhões de pessoas correm risco de infecção. Na atividade leishmanicida não foi observado resultados clinicamente relevantes, pois os níveis de citotoxicidade em células humanas (fibroblatos NCTC929) foram altos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em infusão de coração e cérebro (BHI) 10%, pelo método de microdiluição em caldo, usando uma suspensão de 10⁵ UFC/mL e concentrações materiais variando de 1024-8 µg/mL. A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano foi observado. Na avaliação da CIM não foi observado atividade antibiótica clinicamente relevante para nenhum dos materiais testados. Nos testes de modulação da atividade antifúngica, apenas o benzoilmetronidazol teve a atividade modulada pela HFPC e FMPC frente à *C. albicans* e o EEPC frente à *C. tropicalis*. Na modulação da atividade antibacteriana houve aumento da atividade antibiótica frente à *Escherichia coli* 07, *Staphylococcus aureus* 358. Por fim, um importante efeito antioxidante pelo método de DPPH foi observado para o extrato etanólico, evidenciando-se uma EC₅₀ de 43,4 µg/mL.

Palavras-Chaves: *Pityrogramma calomelanos*, atividade antibiótica, efeito antioxidante, tripanocida, leishmanicida, citotoxicidade, CIM, atividade moduladora de antibióticos.

ABSTRACT

Bioprospecting of natural products is the research of biological material with the purpose of exploration of natural resources to ensure sustainable use and fair and equitable sharing of benefits arising from their use, such as the development and production of new drugs. Thus, research groups are increasingly turning to the discovery of naturally occurring substances that have low toxicity to human cells and high efficacy against what you want fight. *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. Pteridaceae belongs to the family and know in Brazil as avenca-branca and avenca-preta. Their ethnobotany reveals that the species is used for medicinal purposes, such as, anti-hemorrhagic, analgesic, flu, antipyretic, antitussive, anti-hypertensive, stimulating blood circulation, emmenagogue, kidney disorders, urinary problems, gallstones, astringent and depurative chest. But none of these indications is scientifically proven. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are bacterial species with pathogenic potential and ability to develop resistance to antibiotics. *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* cause candidiasis, an opportunistic fungal infection that affects mainly individual immunosuppressed. Developing countries rich in biodiversity and traditional knowledge as abundant as Brazil, still have high incidence of leishmaniasis and Chagas disease. An alternative for the treatment of these conditions is the research with natural products of *P. calomelanos*. Ethanol extract (EEPC), hexane fraction (HFPC), ethyl acetate fraction (EAFPC) and methanol fraction (MFPC) of *P. calomelanos* were used the research of different bioactivities. Chagas disease is a zoonosis caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects the world around 16 to 18 people, of which 50.000 die each year, in addition, an estimated 25 million people at risk of infection. For the HFPC trypanocidal activity showed optimal activity at a concentration of 50 µg/mL, 71 % were because of death or growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastotes with 0 % of cytotoxicity in human cells (NCTC929 fibroblasts). Leishmaniasis is a polymorphic group of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. There are about 12 million people affected in 88 countries, in addition, it is estimated that about 120 million people are at risk of infection. Leishmanicidal activity was not observed clinically relevant outcomes, because the levels of cytotoxicity in human cells (NCTC929 fibroblasts) were high. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in brain and heart infusion (BHI) 10 %, the broth microdilution method, using a suspension of 10⁵ CFU /mL and varying concentrations of materials of 1024-8 µg/mL. MIC was defined as the lowest concentration at which no bacterial growth was observed. In assessing the MIC was not observed clinically relevant antibiotic activity for any of the tested materials. In tests of modulation of antifungal activity, only the Benzoilmetronidazole activity was modulated by the MFPC and HFPC against *C. albicans* and of the EEPC against *C. tropicalis*. In modulation for antibacterial activity, there was increase of antibiotic activity against at *Escherichia coli* 07, *Staphylococcus aureus* 358. Lastly, a important antioxidant effect by the DPPH method was observed to the ethanol extract, were was evidenced a EC₅₀ de 43,4 µg/mL.

Keywords: *Pityrogramma calomelanos*, antibiotic activity, antioxidant effect, tripanocidal, leishmanicidal, cytotoxicity, MIC, modulator activity of antibiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	28
Figura 2 - <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	28
Figura 3 - Distribuição da leishmaniose cutânea pelo mundo em 2009.	40
Figura 4 - Distribuição da leishmaniose visceral pelo mundo em 2009.	40
Figura 5 - Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.	41
Figura 6 - <i>Leishmania</i> – Forma flagelada ou promastigota.	42
Figura 7 - <i>Leishmania</i> – Forma aflagelada ou amastigota.	42
Figura 8 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	43
Figura 9 - Notificações de leishmaniose tegumentar americana Brasil – 1980 a 2005.	44
Figura 10 - <i>Triatoma brasiliensis</i> .	46
Figura 11 - Distribuição de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , baseado em estimativas oficiais e padrão de transmissão do vetor, mundial, 2006–2009.	46
Figura 12 - Ciclo biológico da <i>Trypanosoma cruzi</i> .	47
Figura 13 - Formas tripomastigotas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> .	49
Figura 14 - Formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> .	49
Figura 15 - Forma amastigota do <i>T. cruzi</i> .	49
Figura 16 - Fluxograma	52
Figura 17 - Município de Crato, Ceará, Brasil.	55
Figura 18 - Localização da área de coleta de <i>Pityrogramma calomelanos</i> .	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Levantamento bibliográfico de moléculas isoladas na espécie <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	29
Tabela 2 - Relação de aminoglicosídeos, sua origem e ano de descoberta.	34
Tabela 3 - Substâncias utilizadas nos ensaios e suas respectivas procedências.	53
Tabela 4 - Origem bacteriana e perfil de resistência aos antibióticos.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- a.C - Antes de Cristo
- AC - Grupo controle de absorvância
- ACB - Branco de meio de cultura
- AE - Absorvância do grupo experimental
- AEB - Branco de compostos
- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BHI - *Brain Heart Infusion*
- CE - Estado do Ceará
- CE₅₀ - Concentração Eficiente
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CIM/8 - Concentração subinibitória
- CO₂ - Dióxido de carbono
- Cont. - Continuação
- CPRG - Clorofenol Vermelho-β-D-Galactopiranosídeo
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
- DNA - Ácido Desoxiribonucléico
- EC - *Escherichia coli*
- EEPC - Extrato Etanólico de *P. calomelanos*
- et al* - e outros; e colaboradores (latim)
- EUA - Estados Unidos da América
- FAEPC - Fração Acetato de Etila de *P. calomelanos*
- FBS - Fetal Bovine Serum (soro fetal bovino)
- FeCl₃ - Tricloreto Férrico
- FHPC - Fração Hexânica de *P. calomelanos*
- FMPC - Fração Metanólica de *P. calomelanos*
- HCl - Cloreto de Hidrogênio
- HIA - *Heart Infusion Agar*
- HIV - *Human Immunodeficiency Virus*
- LC - Leishmaniose Cutânea

LFQM - Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (URCA)
LMBM - Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA)
LMC - Leishmaniose Mucocutânea
LPPN - Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (URCA)
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
LV - Leishmaniose Visceral
MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*
mL - mililitro(s)
mm - milímetro(s)
NaOH - Hidróxido de sódio
NCCLS - *National Comitee for Clinical Laboratory Standards*
NH₄OH - Hidróxido de amônio
nm - nanômetro(s)
NOR - Norfloxacin
OMS - Organização Mundial de Saúde
OppA - Proteína ligadora de oligopeptídeos
PBP - Protein Binding of Penicillin
RNAm - Ribonucleotide Acid messenger
SA - *Staphylococcus aureus*
SARM - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
TGI - Trato Gastrointestinal
UFC - Universidade Federal do Ceará
UFC/mL - Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
URCA - Universidade Regional do Cariri
UTI - Unidade de Terapia Intensiva
VISA - Vancomycin-Inhibited *S. aureus*
VRSA - Vancomycin-Resistance *S. aureus*
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

– menos

% por cento; percentual

+ mais

> maior que, superior a

≥ maior ou igual que

g - grama(s)

h - hora(s)

H₂O - água

m² - Metros quadrados

° C - graus Celsius binding

µg/mL - microgramas de soluto por mililitro de solvente

µL - microlitro (s)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	26
3.2 Botânica	27
3.3 Estudos fitoquímicos	29
3.4 Atividade antimicrobiana	32
3.4.1 Histórico de resistência	32
3.4.2 Aminoglicosídeos e resistência	34
3.5 Microbiologia	37
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	37
3.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3.5.3 <i>Escherichia coli</i>	38
3.6 Doenças tropicais	39
3.6.1 Leishmanioses	39
3.6.2 Doença de Chagas	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Drogas, reagentes e soluções	53
4.2 Microrganismos	54
4.2.1 Cepas Bacterianas	54

4.2.2 Cepas fúngicas	54
4.3 Meios de cultura	54
4.4 Linhagens celulares utilizadas	55
4.5 Seleção e coleta do material vegetal	55
4.5.1 Preparação do extrato etanólico (EEPC), fração hexânica (FHPC), fração acetato de etila (FAEPC) e fração metanólica (FMPC), de folhas de <i>P. calomelanos</i> (L.) Link.	57
4.5.2 Preparo das soluções a partir do extrato e frações	57
4.5.3 Prospecção fitoquímica	57
4.6 Metodologia utilizada na prospecção fitoquímica	57
4.6.1 Preparação de extratos	57
4.6.2 Teste para identificação de fenóis e taninos	58
4.6.3 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	58
4.6.4 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	58
4.6.5 Teste para alcalóides	59
4.7 Preparo e padronização de inóculos bacterianos e fúngicos	59
4.8 Ensaio de susceptibilidade para as formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	59
4.9 Ensaio de susceptibilidade para formas promastigotas de <i>Leishmania Brasiliensis</i>	60
4.10 Ensaio de citotoxicidade	60
4.11 Atividade antifúngica/antibacteriana e modulação	61
4.12 Análises estatísticas	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Atividade tripanocida	63
5.2 Atividade leishmanicida	63
5.3 Atividade antifúngica e moduladora de antibióticos	64

5.4 Atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos	64
6. LISTA DE ARTIGOS DERIVADOS DO PROJETO	66
6.1 - Capítulo 1 - Pteridófitas em evidência: etnobotânica e bioatividades farmacológicas.	68
6.2 - Artigo 1 - Cytotoxic and Tripanocide Activities of <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	114
6.3 - Artigo 2 - Evaluation of the anti- <i>Leishmania</i> activity of ethanol extract and fractions of the leaves from <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	129
6.4 - Artigo 3 - Enhancement of antimicrobial activity of antibiotic and antifungals by the use of natural products from <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	139
6.5 - Artigo 4 - Evaluation of antimicrobial and modulation activity of ethyl acetate fraction and hexane fraction of the leaves from <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.	150
6.6 - Capítulo 5. Additive effects of <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link. combined with aminoglycosides against <i>Staphylococcus aureus</i> .	161
7. CONCLUSÕES	167
ANEXO 1 - Produções bibliográficas referentes ao trabalho desenvolvido	178
ANEXO 2 - Produções bibliográficas de co-autoria	178
ANEXO 3 - Artigos aceitos para publicação	179

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para amenizar dores ou tratar moléstias se perdeu nos tempos. Desde a pré-história o homem procurou aproveitar os princípios ativos existentes nos vegetais, embora de modo totalmente primitivo ou intuitivo, baseado em descobertas ao acaso. Antigos textos caldeus, babilônicos e egípcios já traziam referências a certas espécies vegetais usadas em rituais religiosos (BERG, 1993).

A utilização de plantas como medicamentos pela humanidade é tão antiga quanto à história do homem. O processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, de erros e acertos (MORS, 1982). Neste processo, os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais, bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal, o reconhecimento do habitat e a época da colheita (LÉVI-STRAUSS, 1989).

As mais remotas informações sobre drogas vegetais são de origem indiana, do *Ayurveda* (Ciência da Vida), que consiste no sistema médico da Índia com registros de até 2.500 a.C. com informações sobre o uso de plantas medicinais cientificamente catalogadas, num total de 10.000 plantas registradas há aproximadamente 1.000 a.C. (CHOPRA *et al.*, 1958). Estas informações contribuíram amplamente para o conhecimento atual sobre as plantas e para o isolamento e produção de substâncias que hoje são utilizadas na prática médica e em muitos segmentos industriais.

Entre os diversos produtos do metabolismo secundário das plantas, o *Phytochemical Dictionary* (HARBORNE & BAXTER, 1993) cita 2.973 compostos com atividade biológica bem caracterizada e ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais.

Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VALDIR *et al.*, 2005). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993). Neste contexto, estudos bioquímicos, farmacológicos e etnobotânicos têm

sido feitos com o objetivo de identificar os compostos químicos (metabólitos secundários) presentes em várias espécies de plantas usadas na medicina popular. Estes estudos têm demonstrado ser de enorme importância para o desenvolvimento de novos fármacos usados na medicina alopática atual (CALIXTO, 2005).

Os extratos de plantas apresentam em sua composição substâncias efetivas (princípios ativos) contra um amplo espectro de agentes patogênicos de plantas e animais e são praticamente inofensivos ao meio ambiente quando comparados com derivados sintéticos, podendo até superar sua ação farmacológica (MIGUEL & MIGUEL, 1999; STANGARLIN *et al.*, 1999). Dessa forma, o controle de doenças de origem animal e vegetal, no Brasil e no mundo, com o uso de extratos de plantas medicinais, tem sido um grande desafio para o meio científico.

Um dos maiores desafios na determinação do efeito farmacológico de um extrato tem sido a elucidação de compostos ativos. As plantas por sua vez, contêm inúmeros constituintes em seus extratos. Quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos e isso se deve a presença de diferentes classes de compostos (GEBHARDT 2000; MACIEL *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, 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, tem despertado o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento e produção de medicamentos a partir de substâncias naturais, na tentativa de combater graves infecções de forma mais eficaz, assim como diminuir os efeitos colaterais provocados por quimioterápicos de elevada toxicidade (RECIO & RIOS, 1989; PAULO *et al.*, 1992).

Atualmente, as substâncias naturais englobam cerca de 11,5% do total de prescrições na medicina e metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo são, direta ou indiretamente, oriundos de produtos naturais de plantas. Logo, as companhias farmacêuticas, 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 350.000 e 550.000 espécies. Várias destas espécies são endêmicas de uma região e ainda não foram avaliadas sobre o

ponto de vista fitoquímico, citotóxico, microbiológico e farmacológico (SIMÕES *et al.*, 2002).

No Nordeste brasileiro, está localizada a maior parte da região semi-árida do país, esta região é coberta por uma vegetação denominada caatinga (TROVÃO *et al.*, 2004) do tupi-guarani: “floresta branca” (LEAL *et al.*, 2003) com plantas fisiologicamente adaptadas às condições de deficiência hídrica. A caatinga, como outras vegetações, também passa por um extenso processo de devastação ambiental, provocado pelo uso indiscriminado dos seus recursos naturais, sendo ainda mais grave por ser um ecossistema, considerado menos valorizado, uma vez que, até tempos recentes era taxado como pobre em biodiversidade (TROVÃO *et al.*, 2004).

A extensão semi-árida brasileira ocupa 11,5% do território nacional. Estima-se haver oito mil espécies vegetais sendo que destas 318 espécies pertencentes a 42 famílias botânicas são endêmica da caatinga. Diante desta vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novos fármacos, é de fundamental importância, o estudo da flora dessa região de forma mais minuciosa. (NOVAIS *et al.*, 2003).

A Chapada do Araripe, inserida na porção central do Nordeste Brasileiro, possui 55.000 km². A região abriga um bioma de características geológicas, geomorfológicas, pedológicas, climáticas, hidrográfico-hidrológicas e de vegetação bem diversificada. As formações florestais da região do cariri podem, de maneira simplificada, ser estratificadas em mata úmida, cerradão, cerrado, carrasco e caatinga. (FUNDETEC, 1998; COUTINHO, 2008). Nesta região existem inúmeras espécies de plantas que são usadas para alimentação e “cura” de doenças, tais como: araçá (*Psidium araçá Raddi*), cajuí (*Anacardium humile*), faveira (*Dimorphandra gardneriana*), janaguba (*Himatanthus drasticu*), jatobá (*Hymenaea stignocarpa*), pau de óleo ou copaíba (*Copaifera langsdorffii*), pequi (*Caryocar coriaceum*), e pitanga (*Eugenia michelli*), que apresentam alto valor econômico, cultural, social e medicinal para a região (FUNDETEC, 1998; COUTINHO, 2008).

Neste sentido, a formulação de protocolos terapêuticos nacionais de saúde baseados nas necessidades de países em desenvolvimento é tida como imprescindível para tornar o acesso à saúde pública mais democrática e de melhor qualidade (WHO, 2002), especialmente em países com rica biodiversidade, abundantes conhecimentos sobre plantas medicinais e elevada incidência de doenças tropicais, tais como tuberculose, doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose e doença do sono, como é o caso do Brasil (FUNARI & FERRO 2005).

Em realidade, o estudo e a descoberta de produtos naturais com princípios ativos elucidados que apresentem atividade antibiótica intrínseca ou combinada, podem representar uma nova ordem para o meio científico, definindo novas bases e diretrizes para o controle e combate aos microrganismos com alto poder patogênico e resistência antibiótica, bem como estabelecer novos parâmetros, cientificamente aceitáveis, acerca dos efeitos colaterais provocado por quimioterápicos convencionais. Dessa forma, a indústria farmacêutica atuaria mais eficazmente no desenvolvimento e produção de medicamentos a base de substâncias naturais (fitoterápicos), promovendo assim, a inclusão de uma alta parcela da população que reside às margens do consumo e utilização de produtos e serviços existentes no âmbito da saúde e do bem-estar.

A esse respeito, consignamos como foco maior deste trabalho o processo investigativo e elucidativo, direcionado a comunidade científica, acerca dos benefícios e desmistificação do uso medicinal das pteridófitas em todo o mundo. Atualmente, este grupo de plantas é amplamente estudado na área botânica, mas pelo fato destas plantas, especialmente *Pityrogramma calomelanos*, apresentarem propriedades medicinais importantes, deve-se sublinhar este grupo como de utilidade para saúde pública. .

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas têm sido realizadas em grupos de plantas mais complexos, como por exemplo as angiospermas, entretanto mesmo com muito investimento e tempo dedicado, diversas doenças não tiveram sua cura alcançada. Portanto, é chegado o momento de centralizar as pesquisas no grupo das pteridófitas, plantas estas que habitaram o mundo por milhões de anos. Dessa forma, possivelmente encontraremos substâncias ativas, preservadas ao longo dos tempos, passíveis de serem usadas para a cura, tratamento e prevenção de várias doenças, através do combate a bactérias resistentes, fungos, protozoários ou substituição de drogas com elevada toxicidade, bem como outras atividades farmacológicas importantes. Tudo isso na perspectiva de inclusão social mediante recuperação, promoção e prevenção da saúde.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar na espécie *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. (extrato etanólico e frações) seu perfil fitoquímico, atividade citotóxica, antioxidante e atividade antibiótica *in vitro* frente à bactérias (padrões e multirresistentes) fungos e protozoários, bem como constatar seu efeito modulador de antibióticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o fracionamento do extrato etanólico de *Pityrogramma calomelanos*, em ordem crescente de polaridade, com os solventes: hexano, acetato de etila e metanol.
- Identificar mediante prospecção fitoquímica os metabólitos secundários majoritários presentes no extrato etanólico de *Pityrogramma calomelanos*.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico e frações das folhas de *P. calomelanos* frente às cepas de fúngicas e bacterianas.
- Elucidar o perfil modulador de antibióticos do extrato etanólico e frações das folhas de *P. Calomelanos* na inibição da resistência microbiana quando associado à fármacos aminoglicosídeos e antifúngicos frente à cepas bacterianas multiresistentes e fúngicas padrões.
- Verificar o índice CIF (Concentração Inibitória Fracionada) de produtos naturais de *P. calomelanos* com fármacos aminoglicosídeos através do ensaio checkerboard.
- Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* do extrato etanólico e frações das folhas de *P. calomelanos* em cultura de formas epimastigotas (CL-B5) de *Trypanosoma cruzi*.
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico e frações das folhas de *P. calomelanos* em cultura de formas promastigotas (MHOM/CO/88/UA301) de *Leishmania braziliensis*.

- Medir o índice de citotoxicidade *in vitro* do extrato etanólico e frações das folhas de *P. calomelanos* em cultura de células (fibroblastos NCTC929).
- Evidenciar o efeito antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *P. calomelanos* mediante análise pelo método de seqüestro do radical livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).
- Fornecer informações cientificamente comprovadas sobre a espécie *Pityrogramma calomelanos* para compor o banco de dados da pesquisa nacional.

REVISÃO
DE
LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA (PTERIDÓFITAS)

As pteridófitas são vegetais vasculares desprovidas de sementes, com duas fases heteromórficas em seu ciclo de vida, das quais a esporofítica é a duradoura e a gametofítica é a efêmera (PRADO, 1998) sendo os vegetais terrestres que dominaram ambientes há aproximadamente 350 milhões de anos (COLLINSON, 1996), amplamente distribuídas no mundo, com uma riqueza estimada entre 9.000 a 12.000 espécies, das quais cerca de 3.250 delas ocorrem nas Américas, sendo que destas, aproximadamente 30% podem ser encontradas no Brasil (TRYON & TRYON, 1982), sendo um dos grupos vegetais menos estudados no mundo até 1999, entretanto após a virada do século, as pteridófitas passaram a ser foco de estudos de botânicos e ecológicos conservacionistas (PACIENCIA, 2008).

As pteridófitas ocorrem em variados tipos de habitats, desde o nível do mar até quase o limite da vegetação altimontana nas regiões tropicais, englobando áreas sub-desérticas como nas caatingas, ambientes salobros como nos manguezais, florestas pluviais tropicais como na planície amazônica, ou pluviais de encosta como nas Serras de Baturité no Ceará, Serra da Mantiqueira e do Mar, no Sudeste e Sul do Brasil (WINDISCH, 1992).

A diversidade específica das pteridófitas é alta em áreas úmidas e relativamente frescas, que representam condições ótimas para o seu ciclo de vida (TRYON & TRYON, 1986). O clima, um dos fatores que mais exercem efeitos sobre o solo e a vegetação, sofre por sua vez, algumas variações localmente condicionadas pelo relevo (LYRA, 1983). Nesse aspecto, a existência de formações vegetais tão diversas como os remanescentes de Floresta Atlântica do Brasil estimulam o interesse pelo levantamento das pteridofloras e dos seus aspectos ecológicos, bem como o potencial econômico, medicinal e ornamental.

No Nordeste brasileiro, a flora pteridofítica tem sido estudada principalmente, nos Estados de Pernambuco, Alagoas, Ceará e Bahia, onde se percebe uma vasta diversidade. O estado do Maranhão possui uma grande diversidade florística e vegetacional dentro de sua área territorial. No que se refere à flora pteridofítica, em especial, são raros os registros de sua ocorrência neste estado, citando apenas o trabalho de (BASTOS & CUTRIN, 1999).

3.1 *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link

A espécie *Pityrogramma calomelanos*, sinónímia *Acrostichum calomelanos*, pertence à família Pteridaceae. Esta família apresenta grande diversidade morfológica, sendo difícil citar apenas um caráter de fácil observação para a sua distinção. De maneira geral, os representantes desta família possuem um pseudo-indúsio formado pela margem da lâmina

recurvada e modificada; os esporos são triletes e aclorofilados (MORAN, 1995; PRADO, 2005). A família apresenta distribuição subcosmopolita, porém, a maioria das espécies ocorre nos trópicos e regiões áridas. São conhecidos cerca de 50 gêneros e 950 espécies (SMITH *et al.*, 2006), 11 gêneros no novo mundo e nove no velho mundo (TRYON *et al.*, 1990). *Pityrogramma* é um gênero com cerca de 17 espécies, a maioria (12 espécies) ocorrendo na América Tropical. O gênero é comum em bordas de trilhas e estradas e em áreas perturbadas, de alta ou baixa elevação (PRADO, 2005).

P. calomelanos é conhecida pelos nomes populares de feto-branco, avenca-branca ou avenca-preta e é utilizada como planta ornamental e medicinal (CORRÊA 1984; BARROS & ANDRADE, 1997). É indicada contra distúrbios renais, como adstringente, analgésico, anti-hemorragico, depurativa peitoral, emenagogo, antigripal, anti-hipertensivo, antitérmico, antitussígeno e estimulante da circulação sangüínea (MAY, 1978; BARROS & ANDRADE, 1997). É indicada também contra problemas urinários, pedras na vesícula e resfriados (CHERYL A. LANS, 2006).

3.2 Botânica

Pityrogramma calomelanos caracteriza-se pela presença na lâmina de uma cera branca ou amarelada recobrimdo parte da superfície abaxial e pelos esporângios dispostos ao longo das nervuras (PRADO, 2005). *P. calomelanos* é uma planta terrestre, possui caule decumbente a ereto, com escamas castanhas, estreitamente lanceoladas, margem inteira, lustrosas, eretas, monomórficas; lamina cartácea, lanceolada, atenuada em direção ao ápice, glabra em ambas as superfícies, com cera branca ou amarelada somente na superfície abaxial; raque castanho-avermelhada, lustrosa, glabra; pinas lanceoladas, ápice longo, pecioluladas; raquíola semelhante à raque; pínulas lanceoladas a elípticas, pecioluladas, ápice agudo a arredondado, margem serreada ou profundamente incisa nas proximais; venação simples ou furcadas. Soros abaxiais, dispostos ao longo das nervuras; esporângios numerosos, junto a uma cera branca ou amarelada. (MORAN, 1995).

P. calomelanos é muito semelhante a *P. calomelanos* var. *austroamericana* diferindo-se desta, pela presença da cera branca a amarelada na superfície abaxial da lâmina (MORAN, 1995). No Brasil, *P. calomelanos* é citada para o Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Para, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo (MORAN, 1995).

Figura 1. *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. Visualização completa.



Fonte: Flaviana Morais

Figura 2. *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. Observação parcial da área superficial e abaxial.

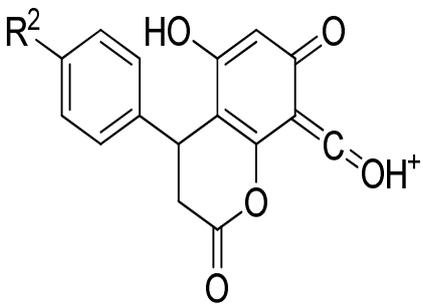
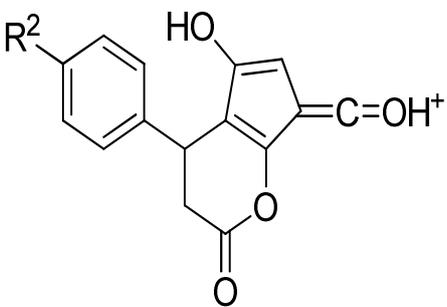
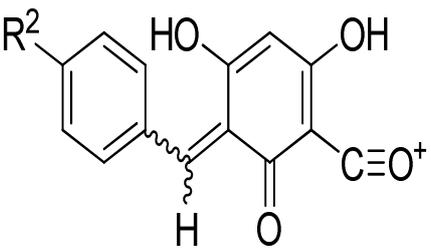


Fonte: http://www.plantsystematics.org/imgs/robbin/r/Pteridaceae_Pityrogramma_calomelanos_10870.html (23 de julho de 2011)

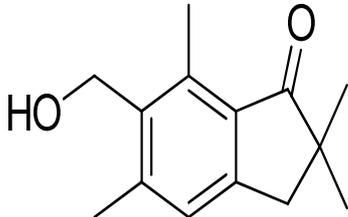
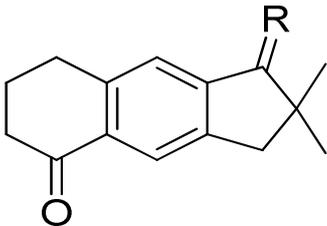
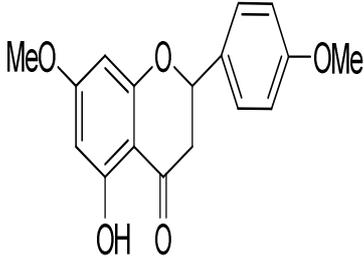
3.3 Estudos fitoquímicos

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado para a espécie *Pityrogramma calomelanos* foi apontado o isolamento de vários metabólitos secundários, destacando-se alguns flavonóides, polifenóis e terpenos. Ver tabela 1.

Tabela 1. Levantamento bibliográfico de isolados de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Substâncias isoladas	Parte da planta	Referência
 <p>8-[3-(4-metoxifenilpropionil)-5,7-dihidroxi-dihidroneoflavona</p>		
 <p>8-[3-(4-hidroxi-fenilpropionil)-5,7-Dihidroxi-dihidroneoflavona</p>	<p>Exsudato</p> <p>Farináceo</p>	<p>Asai</p> <p><i>et al., 1991</i></p>
 <p>8-(3-fenilpropionil)-5,7,4'-trihidroxi-dihidroneoflavona</p>		

Cont. Tabela 1. Levantamento bibliográfico de isolados de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Substâncias isoladas	Parte da planta	Referência
	Folha	Bardouille <i>et al.</i> , 1978
	Folha	Bohm, 1968
	Folha	Bohm, 1968
<p>4,7-dimetoxi- 5-hidroxiflavonona</p>		

3.4 Atividade Antimicrobiana

As propriedades antimicrobianas de algumas substâncias e óleos essenciais encontradas nas plantas como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso etanobotânico de espécies nativas. Atualmente, uma condição muito preocupante é o fato dos microrganismos que causam danos à saúde humana estarem se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (DUARTE, 2006).

3.4.1 Histórico de Resistência

O problema da resistência bacteriana aos quimioterápicos surgiu na prática médica com o uso de sulfonamidas, empregadas pela primeira vez em 1935. Pouco tempo depois, essas drogas começaram a perder a sua eficácia terapêutica, sobretudo, pelo aparecimento de cepas resistentes entre os gonococos e estreptococos (FREITAS *et al.*, 1989).

Com a introdução da penicilina em 1940, virtualmente todos os *S. aureus* foram susceptíveis (HUBERT *et al.*, 1999), traduzindo-se numa verdadeira revolução na terapêutica para a cura de doenças estafilocócicas outrora intratáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Em apenas cinco anos, 50% das culturas destes organismos obtiveram habilidade para resistir ao antibiótico por causa da penicilinase, uma enzima capaz de clivar o anel β -lactâmico que foi concebida por aquisição de plasmídeo (HUBERT *et al.*, 1999), sendo que por volta 1950 os números de *S. aureus* isolados, apresentavam altos níveis de resistência à penicilina, tornando-se inapto o uso deste, como agente terapêutico frente a infecções estafilocócicas.

Normalmente o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos se dá por mutações, conjugação, transdução e transformação. Uma das formas de transmissão desta resistência, adquirida via mutação, é através de um processo de seleção natural que leva a sobrevivência de microorganismos resistentes em determinados ambientes. Na conjugação, os plasmídios presentes em bactérias resistentes transferem o DNA resistente para outras bactérias não resistentes (KONEMAN *et al.*, 1999). A resistência que as bactérias desenvolvem aos antimicrobianos é descrita na maioria das espécies, porém, os mecanismos

de resistências variam de espécie para espécie quanto à origem da resistência e sua forma de manifestação (TAVARES, 2000).

A introdução dos antibióticos na prática clínica teve início com a penicilina seguido da streptomicina em 1948, tetraciclina em 1950 e eritromicina em 1953. Cepas resistentes a esses antibióticos foram já relatadas em 1957. Em 1960 com a disponibilidade de meticilina, originalmente chamada de celbinine, semi-sintético derivado quimicamente da penicilina, foi o primeiro agente antimicrobiano baseado no seguinte mecanismo: resistir à ação degradatória das penicilinases (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Logo, esta droga abriu um novo capítulo na terapêutica com antibióticos. Imediatamente, todos os *S. aureus*, incluindo as cepas penicilina-resistentes, foram susceptíveis a nova droga. Infortunadamente, dentro de um ano, organismos resistentes à meticilina foram isolados na Europa, e, em 1970, infecções causadas por MRSA foram reportadas em muitos hospitais europeus.

Na década de 80 cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) aumentaram as notificações de patógenos hospitalares nos Estados Unidos da América (EUA). O organismo versátil que adquiriu o gene (*mec*) responsável pela alteração na proteína fixadora de penicilina (PBP) para a PBP2A ou PBP2', permitiu que esse organismo crescesse na presença não somente de meticilina, como também de todos antibióticos β -lactâmicos (HUBERT *et al.*, 1999).

Com a expansão na ocorrência de SARM, na década de 80, a terapêutica empírica para infecções estafilocócicas, particularmente em sepsis nosocomiais foi mudada para vancomicina em muitos dos institutos de cuidado de saúde (SADERI *et al.*, 2005). A vancomicina, uma droga que foi produzida em 1958, tinha aumentado a sua importância no tratamento das infecções por SARM.

Em 1996 foi publicado o primeiro caso de *S. aureus* com sensibilidade intermediária a vancomicina (MIC 8 mg/L) no Japão (HIRAMATSU *et al.*, 1997) e subsequente em New Jersey, Michigan, Nova York, Reino Unido, França, Coreia, África do Sul, Brasil e Escócia (HIRAMATSU, 2001). Recentemente, a transmissão de cepas *S. aureus* com heteroresistência entre hospitais do Japão foi reportado, sendo $\leq 20\%$ das culturas resultante de infecções nosocomiais por *S. aureus* SARM, tiveram níveis intermediários de resistência à vancomicina (HIRAMATSU *et al.*, 1997). O mecanismo de resistência intermediária à vancomicina se deu por aumento na espessura da parede celular, formada principalmente por peptídeoglicanos que funcionam como armadilha, dificultando a passagem da vancomicina pela parede celular, não chegando ao seu sítio de ação no citoplasma, onde inibiria a produção dos monômeros de mureína (HIRAMATSU, 2001). No ano de 2002, surge

a primeira cepa de *S. aureus* resistentes a vancomicina (SARV) (CDC, 2002), com um mecanismo de resistência claramente distinto daqueles das cepas SARV (NISHI *et al.*, 2004).

A era dos antibióticos tem apenas 60 anos de idade e está atualmente ameaçada por uma seleção de organismos resistentes.

3.4.2 Aminoglicosídeos e Resistência

Aminoglicosídeos são antibióticos que correspondem a uma classe terapêuticamente essencial cuja utilidade é frequentemente restrita por seu potencial ototóxico e nefrotoxicidade. São antimicrobianos produzidos por cepas de *Streptomyces spp.*, *Micromonospora spp* e *Bacillus spp* (SPOO & RIVIERE, 2003).

Os estudos que culminaram com o descobrimento desta nova classe de antibióticos iniciaram-se em 1939, no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade Rutgers, de New Jersey, nos Estados Unidos. Em 1943, após examinar vários actinomicetos de solo. Tavares (2001) isolou uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e a partir daí, em 1944, a estreptomicina foi isolada. A partir de então, foi descoberta uma série de novas substâncias com potencial antibacteriano, derivadas dos actinomicetos como mostra a tabela 2, assim como os aminoglicosídeos semi-sintéticos, amicacina e netilmicina derivados da canamicina e sisomicina, respectivamente (GILBERT *et al.*, 1995).

Tabela 2. Relação de aminoglicosídeos quanto a sua origem e ano de descoberta.

Nome	Origem	Ano
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949
Canamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Paromomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1959
Spectinomomicina	<i>Streptomyces spectabilis</i>	1962
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	1963
Tobramicina	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	1968
Sisomicina	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1970
Dibecacina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1971
Amicacina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1972
Netilmicina	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1975
Isepamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	1978

Os aminoglicosídeos têm atividade predominante sobre organismos Gram-negativos e Gram-positivos (*Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.*), sendo as bactérias anaeróbicas mais resistentes ao efeito antibacteriano (COSTA, 1999). Sua ação antibacteriana ocorre através da ligação irreversível a uma ou mais proteínas receptoras na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, interferindo, portanto, em vários mecanismos no processo de translação do RNAm, e dessa forma causando finalização prematura da cadeia ou provocando a incorporação de um aminoácido incorreto no produto protéico. Dessa forma, os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas. Esses antibióticos são administrados normalmente por via parenteral, uma vez que sua absorção é desprezível no trato digestivo e sua via de eliminação é o rim (SPOO & RIVIERE, 2003).

Vários mecanismos podem conferir resistência bacteriana aos aminoglicosídeos. Um primeiro mecanismo, a diminuição da permeabilidade, tende a conferir resistência em alto nível a praticamente todos os aminoglicosídeos simultaneamente, como ocorre com o evento de alteração na expressão da proteína de membrana *OppA* (uma proteína ligadora de oligopeptídeos) em cepas laboratoriais e clínicas de *Escherichia coli* (ACOSTA, 2000). O mecanismo de efluxo raramente é citado como evento utilizado por bactérias na resistência a aminoglicosídeos, mas ele ocorre reconhecidamente pelo menos em *Burkholderia pseudomallei* (MOORE, 1999). Cundliffe (1992) ressalta que, pelo menos em organismos bacterianos produtores de aminoglicosídeos, a inativação enzimática possivelmente desempenha um papel acoplado a mecanismos de efluxo. Igualmente, em organismos produtores de aminoglicosídeos é comum a ocorrência de modificação da estrutura-alvo, ou seja, normalmente de metilação dos ribossomos. No campo dos mecanismos envolvendo inativações enzimáticas, a existência de uma enzima modificadora bifuncional (6'-N-aminoglicosídeo acetiltransferase-2"-O-aminoglicosídeo fosfotransferase) é conhecida em *Staphylococcus* e *Enterococcus*, constituindo-se no mecanismo mais importante de resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos nesses gêneros bacterianos. Sua origem teria se dado, possivelmente, através de fusão de replicons (CULEBRAS, 1999).

O nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoácidos unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central. O nome da substância tem relação com a sua origem. Aqueles que terminam com mycin são derivados direta ou indiretamente de *Streptomyces* e aqueles que terminam com micin são derivados direta ou indiretamente de *Micromonospora*.

Os aminoglicosídeos têm peso molecular que varia de 445 a 600 daltons, são altamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica (GILBERT *et al.*, 1995). Sua atividade antimicrobiana ocorre principalmente em meio aeróbio e em pH alcalino, pois necessita de oxigênio para transporte ativo nas células microbianas e é mais ativo em meio alcalino do que ácido (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A farmacocinética de todos os aminoglicosídeos é bastante semelhante. Devido a sua natureza polar, são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo que menos de 1% da dose é absorvida após administração oral ou retal. A principal via de administração é, portanto, parenteral, com a droga atingindo concentração plasmática limite após 30-90 minutos da aplicação intramuscular, e 30 minutos depois de sua injeção intravenosa (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A sua fixação à albumina plasmática é insignificante ($\leq 10\%$), com exceção da estreptomicina (têm ligação protéica em torno de 30%). O fato de serem insolúveis nos lipídios faz com que a sua concentração em secreções e nos tecidos seja reduzida, pois atravessam pouco as membranas biológicas que não tenham um mecanismo de transporte. A meia vida sangüínea é de duas a três horas nos pacientes com função renal normal (JANA & DEB, 2006).

Sua eliminação ocorre pelo rim, através de filtração glomerular, sendo sua depuração cerca de 66 % da depuração simultânea da creatinina, em função de reabsorção tubular. A meia vida no córtex renal é estimada entre 30-700 horas, o que faz com que ainda haja eliminação urinária 20 a 30 dias após a administração da última dose da droga. Todos os aminoglicosídeos agem pelo mesmo mecanismo de ação, exercendo seu efeito bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano. Desta forma, é necessário que penetrem no interior da célula bacteriana para que possam agir. Isto ocorre por meio da interação do aminoglicosídeo com a superfície celular, o seu transporte por meio da membrana e, finalmente, o acoplamento com o ribossomo. A interação com a superfície celular ocorre de maneira passiva e sem gasto de energia. (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Uma vez no interior da célula, os aminoglicosídeos se ligam à subunidade 30S do ribossomo, diminuindo a síntese protéica e levando à leitura incorreta do ácido ribonucléico mensageiro RNA m, causando alteração no funcionamento da membrana celular com saída de constituintes essenciais ao funcionamento da célula, provocando a morte celular. As concentrações séricas observadas com as doses terapêuticas estão próximas das doses tóxicas

(baixo índice terapêutico). A toxicidade celular é característica comum dos aminoglicosídeos (exceto a espectinomicina), em função de sua absorção para o meio intracelular. Os seus efeitos tóxicos mais importantes são nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular. (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

3.5 Microbiologia

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus são bactérias Gram positivas e as maiores causadoras de infecções adquiridas tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares. A resistência aos agentes antimicrobianos, em diversos países do globo, é prevalente nesta espécie de bactéria (PALOMBO & SEMPLE, 2002).

Estes microorganismos são patógenos humanos e de outros mamíferos, e integram a flora da pele (comensais), embora como patógenos oportunistas possam causar infecções. O *S. aureus* é um patógeno que pode ser encontrado na flora epitelial de 30 a 70% da população (LINDSAY & HOLDEN, 2004), colonizando a pele úmida em diferentes regiões (narinas, axilas, períneo e intestino) de pessoas saudáveis onde podem permanecer colonizando por longos períodos sem causar nenhuma patologia infecciosa, porém, em determinadas circunstâncias e conjuntamente a seus fatores de virulência exibem sua patogenicidade, podendo invadir o organismo do indivíduo provocando infecções freqüentemente agudas e piogênicas. Assim, entre as infecções da pele provocadas por este, destaque-se pela freqüência: o furúnculo, a celulite, o impetigo, bem como infecções cirúrgicas, pós-operatórias (CORBELLA *et al.*, 1997).

A importância das infecções nosocomiais produzidas por *S. aureus*, principalmente *S. aureus* Resistente à Meticilina (SARM), é bem reconhecida pela sua freqüência, morbidade, mortalidade e principalmente pela dificuldade de tratamento. Recentemente tem surgido, a nível comunitário, o *S. aureus* Resistente à Meticilina de origem comunitário, que se denomina CA – MRSA (Sigla em inglês) ou CA-SARM (sigla em português e espanhol). Este agente microbiano é um patógeno emergente e suas infecções são consideradas como enfermidades emergentes. Estas são aquelas que têm surgido recentemente na população ou já existentes como pequenos casos, mas aumentaram rapidamente em incidência e/ou em extensão geográfica (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

3.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bacilo Gram negativo não-fermentador mais frequentemente associado a infecções de origem hospitalar, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou portadores de doença pré-existente. A crescente detecção de infecções hospitalares provocados por esta espécie é motivo de grande preocupação no meio científico. Diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos têm sido identificados neste microorganismo, destacando-se: baixa permeabilidade da membrana externa; sistemas de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e produção de β -lactamases. (KISKA & GILLIAN, 2003).

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua, com predileção por ambientes úmidos sendo encontrada no solo, água e plantas. É pouco freqüente como componente da microbiota normal de indivíduos saudáveis. Entretanto, pacientes internados em Unidades de Terapias Intensiva (UTIs) obtêm facilmente esta bactéria em face da exposição dos pacientes a instrumentos e aparelhos auxiliares, mãos de profissionais e uso indiscriminado de antimicrobianos com amplo espectro de ação. O Trato Gastrointestinal (TGI) é o sítio principal de colonização de *P. aeruginosa*. Além deste local, pode ser também encontrada em outros locais úmidos do corpo, como orofaringe, mucosa nasal, axilas e períneo. Adicionalmente, este microorganismo é re-introduzido em ambiente hospitalar através de alimentos, especialmente frutas e vegetais, favorecendo em indivíduos imunodeprimidos, a colonização e o agravamento de quadros clínicos graves, inclusive bacteremia (KISKA & GILLIAN, 2003).

P. aeruginosa apresenta resistência a vários agentes antimicrobianos, como a maioria dos β -lactâmicos, as tetraciclínas, ao cloranfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (KISKA & GILLIAN, 2003).

3.5.3 *Escherichia coli*

E. coli pertence à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, não esporulante, membro da microbiota normal do cólon humano e de animais de sangue quente. Essa bactéria tem distribuição mundial, sendo, também, encontrada em solos, em superfícies de plantas, em legumes, verduras e frutas, em água doce ou salgada em fezes de animais e humanas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A maioria das linhagens de *E. coli* permanece no cólon como comensal inofensivo (RAJILIĆESTOJANOVIĆ *et al.*, 2007), mas existem linhagens patogênicas que são responsáveis pela ocorrência de diarreia em crianças e adultos (SABRÁ, 2002), infecções

urinárias (DALBOSCO *et al.*, 2003), septicemias e meningites (LEVINE, 1985).

E. coli é o principal agente etiológico de infecções entéricas causada pela água e alimentos contaminados, principalmente em grupos populacionais que não dispõem de sistema de saneamento, ou se apresentam vulneráveis como os idosos e crianças imunocomprometidos (VIEIRA *et al.*, 2004). O aparecimento de infecções múltiplas é outro agravante para os episódios diarréicos e também um indicativo de regiões com baixo nível de saneamento. Em um estudo realizado, comprovou-se que infecções múltiplas estiveram presentes na maioria dos episódios de diarreia e, eventualmente a infecção era ocasionada por mais de dois patógenos (REIS, 2007).

As linhagens de *E. coli* patogênicas possuem numerosos fatores de virulência localizados em cromossomos, bacteriófagos e plasmídios. A patogenicidade está relacionada à combinação de um ou de vários fatores de virulência, que diferenciam linhagens patogênicas das não patogênicas (MELO, 2006).

Nos últimos anos têm emergido, rapidamente, linhagens de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos. Altas frequências de resistência a antimicrobianos têm sido atribuídas a bactérias isoladas de áreas onde os antimicrobianos têm sido usados extensivamente por humanos e animais em ambientes aquáticos e terrestres sujeitos a intensa produção animal. A resistência de várias bactérias a antimicrobianos comuns tem aumentado devido ao uso contínuo e indiscriminado de antimicrobianos (REIS, 2007).

E. coli é uma das principais espécies onde plasmídios que contêm genes envolvidos no sistema de resistência múltipla aos antimicrobianos vêm sendo descobertos. Esta característica está relacionada à sua grande distribuição ambiental e tendência a conter elementos genéticos móveis, em especial os plasmídios. A conjugação, transposição e recombinação são amplamente incriminadas com a evolução da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas (MELO, 2006).

3.6 Doenças Tropicais

3.6.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças polimórficas, causadas por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Trypanosomatidae), que são transmitidos ao homem e a outros mamíferos através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia* spp. A doença tem apresentações clínicas diversas, podendo acometer a pele, as mucosas e as vísceras. No Brasil, existem sete espécies distintas do parasito sendo que, destas,

seis (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. shawii*, *L. naiffi*) são responsáveis pela leishmaniose cutânea (figura 3) e mucocutânea (LMC) – sendo essas formas compreendidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – e uma espécie (*L. chagasi*) responsável pela leishmaniose visceral (GENARO & REIS, 2005).

Considerando-se as três formas da doença, existem cerca de 12 milhões de pessoas afetadas em 88 países, principalmente na Ásia, África e América Latina, com uma incidência anual de 2-3 milhões, sendo que 500 mil são de Leishmaniose Visceral (figura 4). Estima-se que cerca de 120 milhões de pessoas encontra-se em risco de infecção (WHO, 2005).

Figura 3. Distribuição da leishmaniose cutânea pelo mundo em 2009 (WHO, 2010).

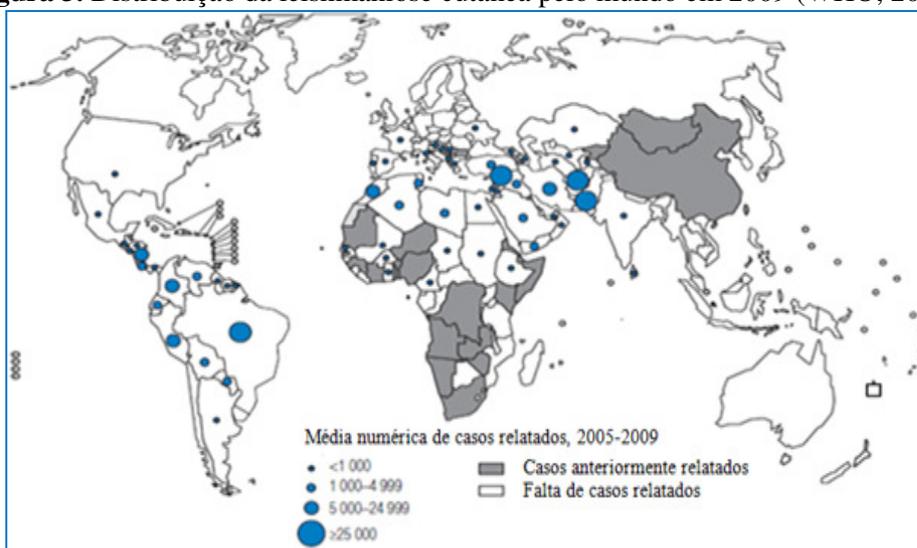
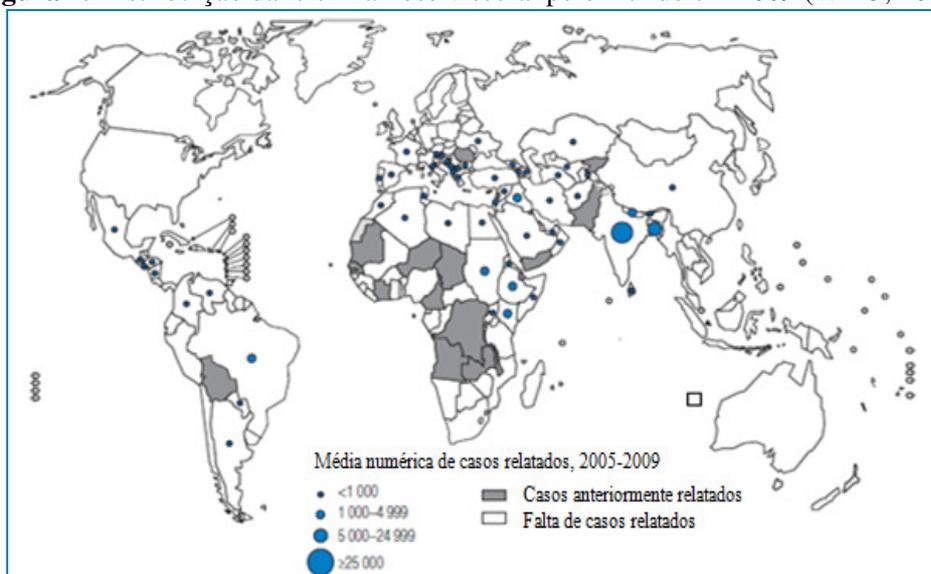


Figura 4. Distribuição da leishmaniose visceral pelo mundo em 2009 (WHO, 2010).



No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido a sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras.

Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (figura 5).

Figura 5. Fêmea de flebotomíneo ingurgitada.

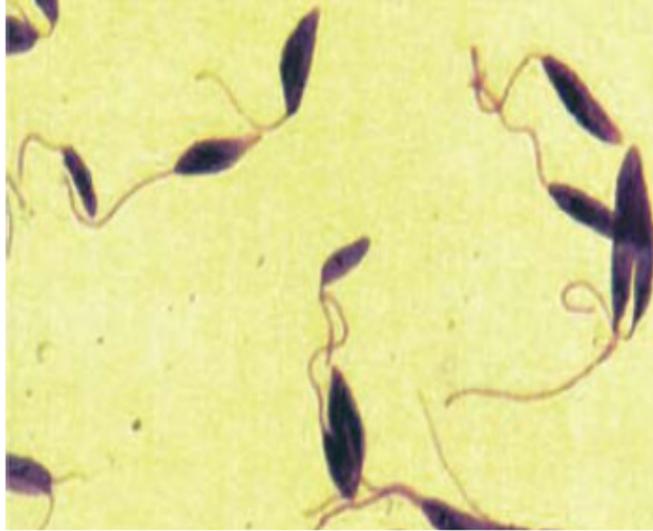


Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

As leishmanias apresentam duas formas evolutivas: a amastigota, que é obrigatoriamente parasita intracelular em vertebrados (figura 7) e a forma promastigota que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados (figura 6).

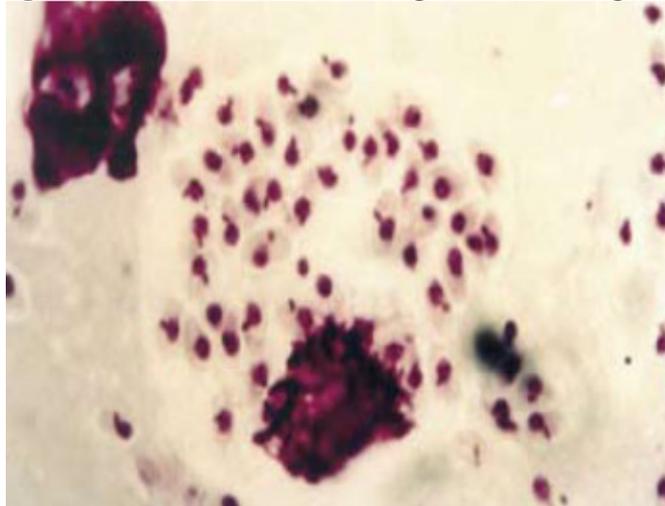
A infecção do hospedeiro invertebrado por formas amastigotas ocorre durante seu repasto sangüíneo. Quando os parasitos alcançam o intestino médio do inseto, são envolvidas por uma membrana quitinosa, chamada matriz peritrófica, dentro da qual se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Após alguns dias, transforma-se em formas promastigotas delgadas e longas, que rompem a matriz peritrófica, se fixam às vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do tubo digestivo, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicos.

Figura 6. *Leishmania* – Forma flagelada ou promastigota.



Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

Figura 7. *Leishmania* – Forma aflagelada ou amastigota.



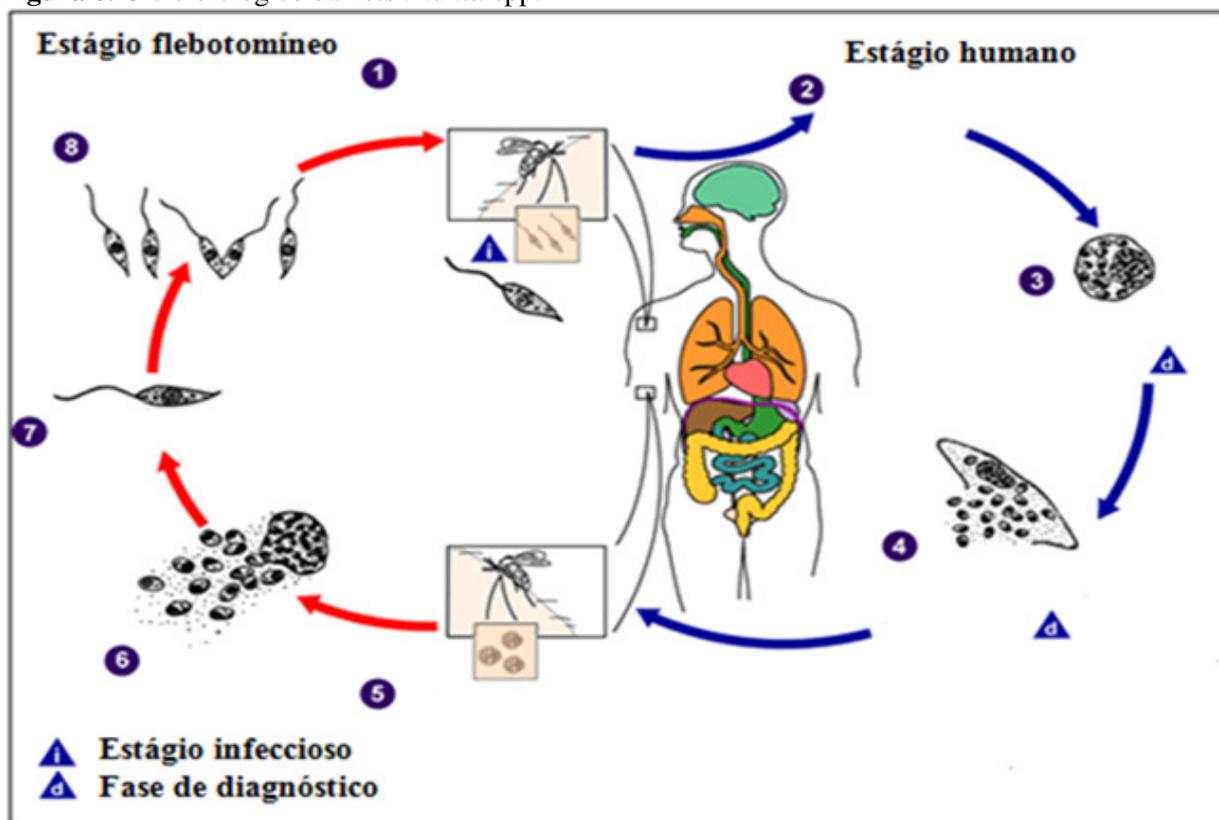
Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo (MICHALICK, 2005). Os promastigotas são internalizados através de endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. As leishmanias apresentam os lipofosfoglicanos, que interferem nas funções das células macrófagicas e dendríticas, e a proteína de membrana metaloprotease *gp63*, a qual as protege da lise mediada pelo sistema complemento e facilita sua entrada nos macrófagos (MURRAY *et al.*, 2005).

Dentro do fagolisossomo, os promastigotas se transformam em amastigotas, os quais são capazes de controlar o pH do vacúolo digestivo e se multiplicarem por divisão binária. Na

ausência de controle parasitário da célula hospedeira, esta se rompe e os amastigotas liberados serão internalizados por outros macrófagos (MICHALICK, 2005), (figura 8).

Figura 8. Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

1 – Flebotomíneo injetando formas promastigotas na pele durante repasto sanguíneo; 2 – Promastigotas são fagocitadas por macrófagos; 3 – Promastigotas transformam-se em amastigotas dentro dos macrófagos; 4 – Amastigotas multiplicam-se nas células (incluindo macrófagos) de vários tecidos; 5 - Flebotomíneo alimentando-se de sangue (ingere macrófagos infectados com amastigotas); 6 – Ingestão de células parasitadas; 7 – No intestino de inseto formas amastigotas transformam-se em promastigotas; 8 – Dividem-se no intestino e migram para a probóscide.

As leishmanioses podem apresentar diferentes quadros clínicos, dependendo da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do indivíduo infectado. A Leishmaniose Cutânea caracteriza-se pela formação de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme, estando à epiderme ulcerada, e apresentando grande densidade de parasitos nos bordos da úlcera nas fases iniciais, o que tende a reduzir nas úlceras crônicas. A Leishmaniose cutâneo-difusa é uma variação da forma cutânea, caracterizada pela formação de lesões difusas não-ulceradas por toda a pele, contendo grande número de amastigotas. Essa forma é provocada por *Leishmania amazonensis* e está relacionada à deficiência imunológica do indivíduo infectado (por exemplo, AIDS). A leishmaniose mucocutânea é causada principalmente por *Leishmania brasiliensis* e diferencia-se da forma cutânea por produzir lesões destrutivas de

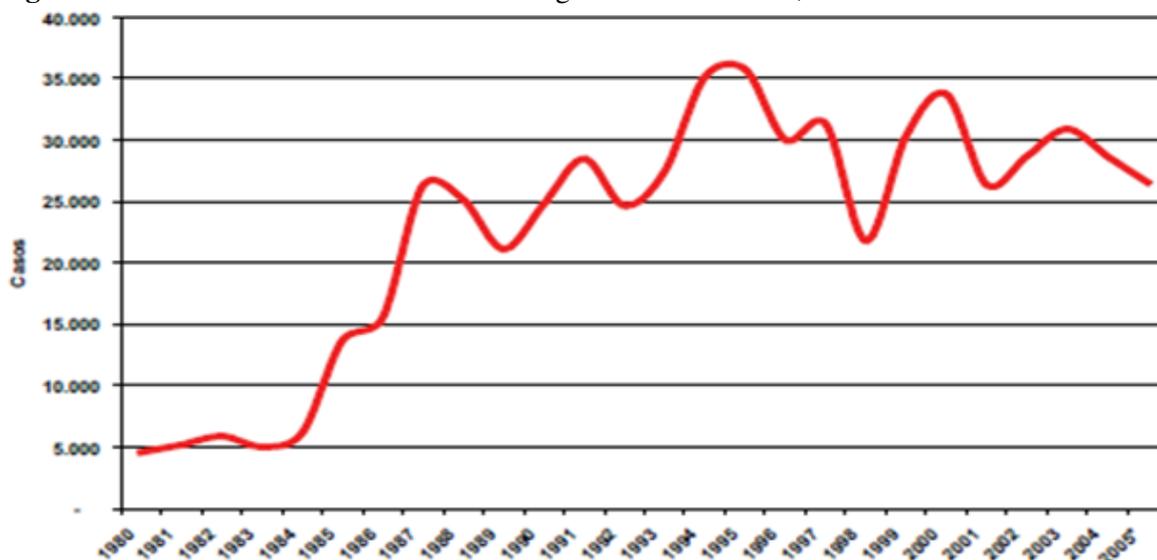
mucosas e cartilagens, através de extensão direta da lesão primária ou através da disseminação hematogênica (GENARO & REIS, 2005).

No Brasil, observa-se um crescimento alarmante dos casos de LV e LTA nos últimos 20 anos. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização. Segundo o Ministério da Saúde (2007), cerca de 40 mil novos casos de LTA são registrados anualmente no Brasil.

Tanto a leishmaniose visceral (LV) como a leishmaniose tegumentar americana (LTA), são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (Ministério da Saúde, 2007; RATH *et al.*, 2003).

Além de uma cadeia epidemiológica complexa que torna difícil as ações de controle, diferentes espécies de *Leishmania* atuam como agentes etiológicos da doença. Nas Américas, a LV é causada apenas pela *L. chagasi*, enquanto que a LTA têm como agentes etiológicos mais freqüentes a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*. (GONTIJO & DE CARVALHO, 2003).

Figura 9. Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2005.



Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

Apesar dos grandes progressos feitos na compreensão da bioquímica e biologia molecular do parasito, os tratamentos de primeira escolha para muitas formas de Leishmaniose ainda são injeções intramusculares diárias de antimoniais pentavalentes (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999), como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Alternativamente, o

antibiótico Anfotericina B[®] e a diamina aromática (Pentamidina[®]) são utilizados clinicamente no tratamento das formas mucocutâneas graves ou em situações onde a LTA não responde ao tratamento com antimoniais (DEDET & PRATLONG, 2003). Estas drogas são muito tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito. (RATH *et al.*, 2003; CROFT & COOMBS, 2003).

3.6.2 Doença de Chagas

Descoberta em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, a Tripanossomíase americana ou Doença de Chagas é uma zoonose do continente americano que se estende do sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (REY, 2001). É uma enfermidade de caráter crônico causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Este protozoário pertence à ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os membros dessa família apresentam de um a quatro flagelos e uma organela autoreplicável que contém DNA, o cinetoplasto, e podem ser encontrados em diferentes insetos hemípteros, animais silvestres e domésticos (LIU & ENGLUND, 2007).

Esta moléstia representa um grande problema de saúde pública nos países emergentes da América, afetando cerca de 18 milhões de indivíduos e causando a morte de aproximadamente 21.000 pacientes por ano. Apenas nas América Central e do Sul, existem em torno de 8 a 9 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões sob o risco de infecção (WHO, 2002). No Brasil, estima-se em cerca de cinco milhões o número de pessoas infectadas por este parasito, das quais cerca de 40% apresentam a doença clínica (DIAS, 2000).

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta um caráter zoonótico e um ciclo biológico complexo, apresentando três formas evolutivas (tripomastigota, epimastigota e amastigota), envolvendo inúmeras espécies silvestres e domésticas de mamíferos hospedeiros (reservatórios do parasito) e de insetos transmissores da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros vetores e do parasito (DIAS & SCHOFIELD, 1999).

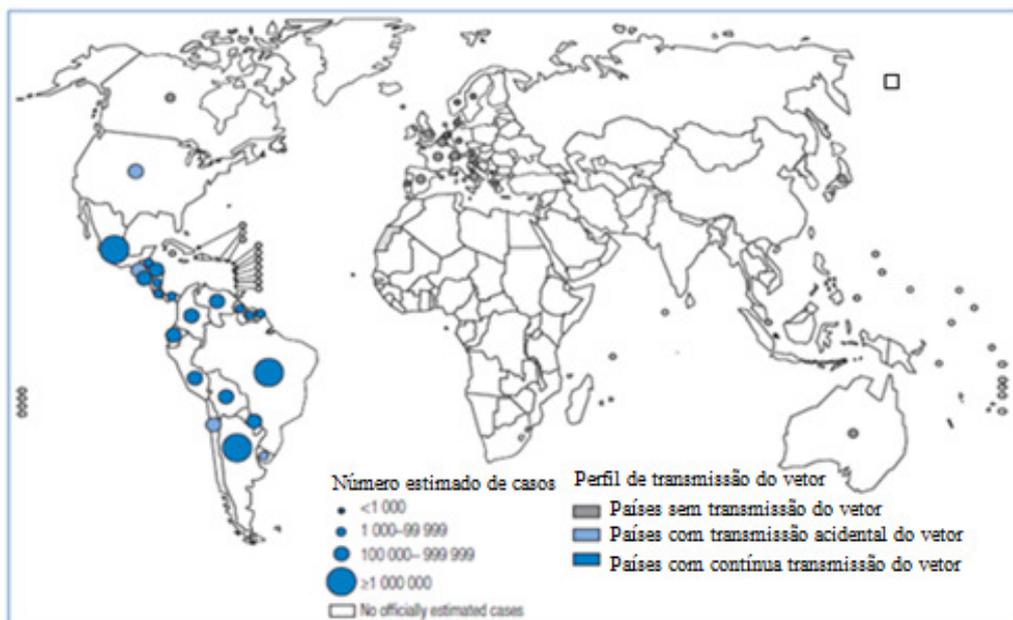
A transmissão natural, ou primária, da doença de Chagas é a vetorial, que ocorre através das fezes dos triatomíneos, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”. Estes, ao picar os vertebrados, em geral defecam após o repasto, eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos, presentes em suas fezes, e que penetram pelo orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Figura 10. *Triatoma brasiliensis* em uma telha. Curaçá, BA, 2003.



Foto: Catarina Macedo Lopes

Figura 11. Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, baseado em estimativas oficiais e padrão de transmissão do vetor, mundial, 2006–2009.



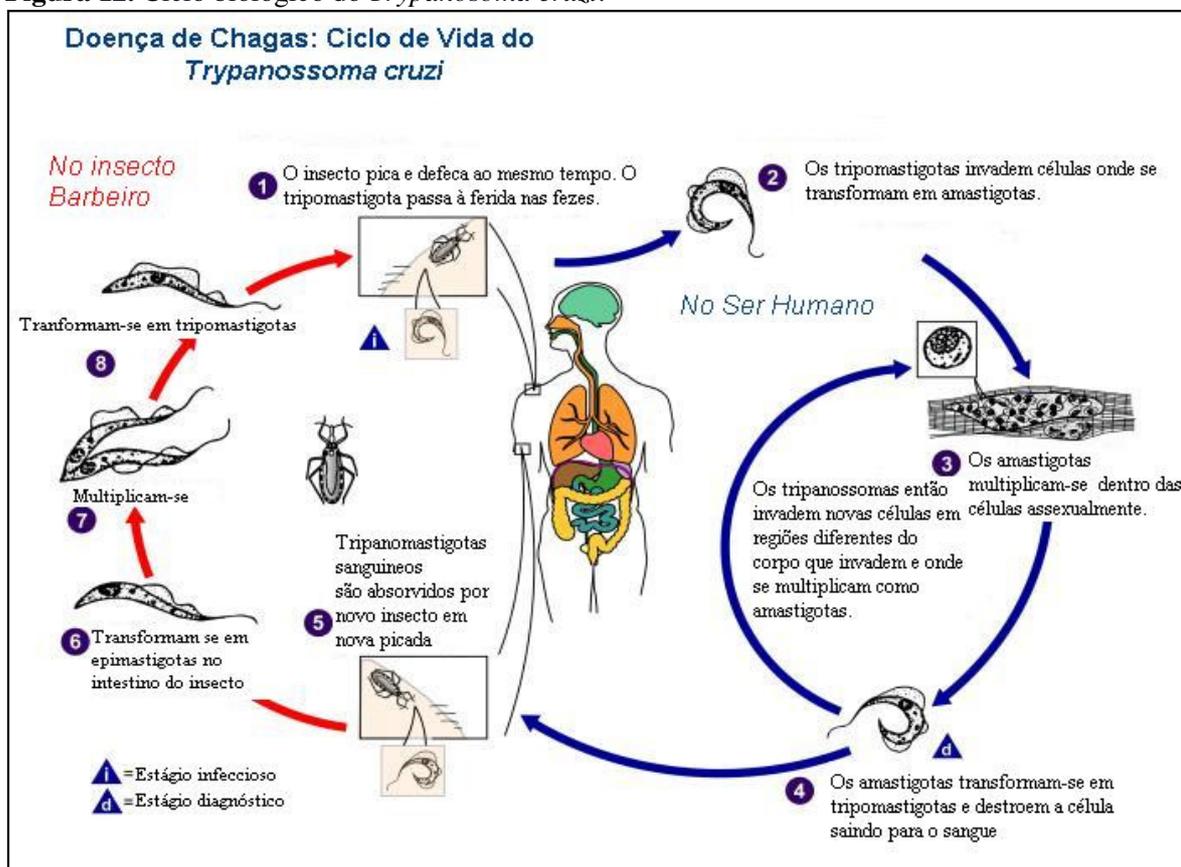
Fonte: Ministério da Saúde (2007).

Esforços têm se concentrado no controle do inseto vetor, porém os doentes crônicos se mantêm como reservatórios do parasito, sendo uma via de reinfecção da população. Recentemente foi considerada como um dos principais problemas de saúde pública na América Latina (OLIVEIRA, 2008).

Os tripanossomatídeos da família Trypanosomatidae apresentam uma grande mudança entre as formas celulares em seu ciclo biológico (figura 12) devido ao complexo fenômeno da diferenciação celular. Esse pleomorfismo se torna evidente na transição entre os

hospedeiros vertebrados e invertebrados, mas pode ocorrer no interior de um hospedeiro como uma forma de adaptação fisiológica ao ambiente ou uma antecipação à próxima etapa do ciclo (SIQUEIRA, 2005).

Figura 12. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention – disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Por apresentar muitas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade, mostra que não se trata de uma espécie bem definida, na qual mais de 60 linhagens ou cepas já foram descritas, segundo diferentes critérios, incluindo: a origem geográfica, as espécies de hospedeiros, a virulência e a patogenicidade, as formas clínicas e epidemiológicas da doença, a resistência dos parasitos a drogas e medicamentos e características fenotípicas (REY, 2001).

No sangue dos vertebrados, o *Trypanosoma cruzi* se apresenta sob a forma de tripomastigota e, nos tecidos, como amastigotas. Nos invertebrados (insetos vetores) ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sangüíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes acumuladas nas fezes do inseto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O parasita pode ser transmitido para humanos por insetos triatomíneos, alimentos contaminados por suas fezes, transfusão de

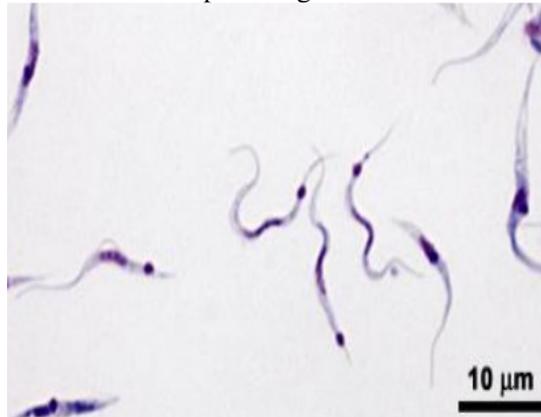
sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados e por via transplacentária (WHO, 2010).

A transmissão transfusional ganhou grande importância epidemiológica nas duas últimas décadas, em função da migração de indivíduos infectados para os centros urbanos e da ineficiência no controle das transfusões, nos bancos de sangue. A transmissão congênita ocorre, mas muitos dos conceptos têm morte prematura, não se sabendo, com precisão, qual a influência dessa forma de transmissão na manutenção da endemia. Ocorrem ainda a transmissão acidental em laboratório e a transmissão pelo leite materno, ambas de pouca significância epidemiológica.

Em realidade, a contaminação dos alimentos à base de vegetais in natura com *T. cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação. Alguns estudos descrevem que a transmissão ao homem pode dar-se pela ingestão de insetos infectados ou de suas fezes, na hipótese de que sejam preparados junto com o alimento (caldo de cana, açaí); pelo consumo de animais que estejam infectados, sem uma cocção adequada da carne; pela ingestão de sangue de animais infectados; e pelo consumo de alimentos contaminados pela secreção dos animais reservatórios (do ciclo silvestre), portanto, sugere-se a hipótese de transmissão, por via oral, em alguns surtos episódicos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

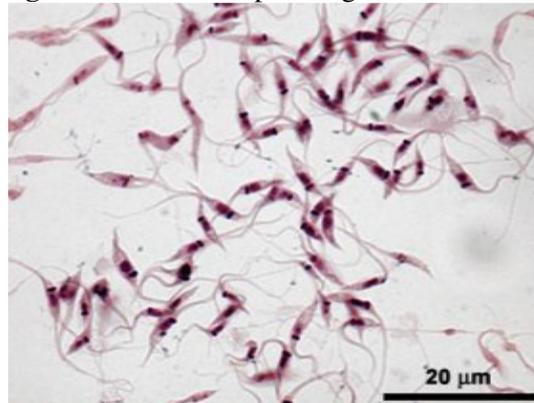
Na literatura, há relatos de casos da doença de Chagas na forma aguda para estado do Paraná, consequência da sua transmissão por via oral após ingestão de caldo de cana contaminado com fezes de barbeiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Ainda segundo o Ministério da Saúde (2007), há relatos de confirmação de casos de transmissão por via oral após ingestão de açaí, onde foram notificados 124 casos da doença de Chagas aguda contraídos por transmissão oral na região Norte brasileira, sendo 99 deles no Estado do Pará.

Figura 13 - Formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*.



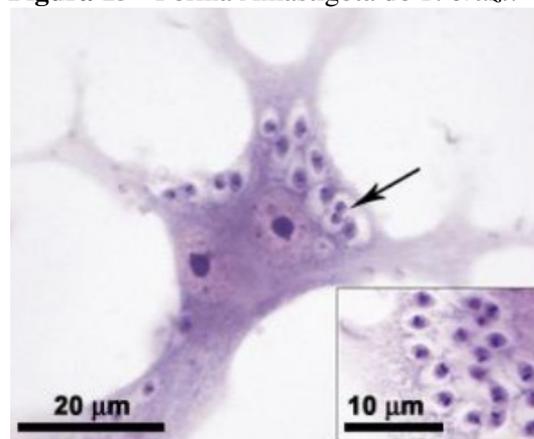
Fonte: CARVALHO (2007).

Figura 14 - Formas epimastigotas do *T. cruzi*.



Fonte: CARVALHO (2007).

Figura 15 - Forma Amastigota do *T. cruzi*.



Fonte: CARVALHO (2007).

A infecção por *T. cruzi* apresenta-se sob duas fases clínicas bem distintas. A fase aguda (sintomática e assintomática), mais freqüente em crianças, apresenta como características o sinal Chagoma de Romaña ou de inoculação (lesões dermatológicas eritemato-induradas, não purulentas, com descamação esfoliativa ao final da evolução que aparecem de sete a dez dias após a infecção e permanecem por cerca de dois a quatro meses (PEREIRA *et al.*,1989). A fase crônica é classificada sob três formas clínicas: indeterminada, cardíaca e digestiva. Na forma indeterminada, as alterações patológicas são pouco significativas, o que torna o diagnóstico clínico difícil nesta fase, os testes sorológicos geralmente são positivos (MACEDO, 1997). As pesquisas apontam que cerca de 60% das pessoas infectadas se encontram nesta forma. Nas outras formas (cardíaca e digestiva), os testes sorológicos confirmam os achados clínicos.

Atualmente, dois medicamentos têm sido usados contra o *T. cruzi*: nifurtimox e benzonidazol. Os mesmos são ativos contra formas sanguíneas do parasito e também sobre as teciduais e devem ser administrados continuamente por um período ideal de 60 dias. A administração desses medicamentos é oral tendo como contra-indicações importantes a gravidez, a insuficiência hepática e a insuficiência renal (DIAS, 1999).

No entanto, o tratamento da Doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar das pesquisas desenvolvidas por vários laboratórios e pesquisadores, em especial os sul-americanos. Vários compostos sintéticos vêm sendo testados em animais e alguns deles têm sido usados no homem, porém nenhum elimina a infecção pelo *T. cruzi* ou promove cura definitiva em todos pacientes tratados (LANA; TAFURI, 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A partir deste momento, iremos observar as metodologias empregadas na execução deste trabalho que teve início em setembro de 2010. Logo abaixo, se pode verificar uma representação esquemática simplificada que resume a sequência de testes realizados com a espécie *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Figura 16. Fluxograma: Representação ilustrativa-esquemática dos testes executados.



4.1 Drogas, Reagentes e Soluções

Tabela 3. Substâncias utilizadas nos ensaios e suas respectivas procedências.

Acetato de Etila	Dinâmica, Brasil
Anfotericina B	Sigma, USA
Amicacina	Sigma, USA
Benzonidazol	Roche, USA
Brain Heart Infusion (BHI)	Difco, Detroit, MI
Canamicina	Sigma, USA
Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG)	Roche, USA
Clorofórmio	Dinâmica, Brasil
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Merck, Alemanha
Etanol	Dinâmica, Brasil
Estreptomicina	Reig Jofre, Espanha
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Carlsbad, CA
Gentamicina	Sigma, USA
Hexano	Dinâmica, Brasil
Heart Infusion Agar (HIA)	Difco, Detroit, MI
Mebendazol	Lasa, Brasil
Metanol	Dinâmica, Brasil
Metronidazol	Prati, Brasil
Neomicina	Sigma, USA
Nifurtimox	Bayer, USA
Nistatina	Teuto, Brasil
Norfloxacina	Laborclin, Brasil
Penicilina G	Reig Jofre, Espanha
Resazurina	Sigma, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich, USA

Todas as soluções foram preparadas de acordo com as recomendações do *National Comitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

4.2 Microrganismos

4.2.1 Cepas Bacterianas:

As cepas bacterianas utilizadas foram: *E. coli* (EC-ATCC10536 e EC27), *S aureus* (SA-ATCC25923 e SA358) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442 e PSU 03) com perfil de resistência mostrada na **tabela 4**. Todas as cepas foram mantidas em *heart infusion Agar slants* (HIA; Difco) e antes dos ensaios, as cêpas foram cultivadas durante 24 h a 37°C em *brain heart infusion* (BHI, Difco). Todas as cêpas foram obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB.

Tabela 4. Origem bacteriana e perfil de resistência aos antibióticos

Bacteria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Astreonan, amoxicilina, ampicilina, amoxicilina, cefadroxil, cefaclor, cefalotina, ceftazidima, ciprofloxacina, clorafenicol, imipenem, canamicina, sulfametrim, tetraciclina and tobramicina.
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxacilina, gentamicina, tobramicina, ampicilina, canamicina, neomicina, paramomicina, butirosina, sisomicina and netilmicina.
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cfepina, ceftazidina, imipenem, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam, levofloxacina, merpenem and ampicilina.

4.2.2 Cepas fúngicas

As cêpas fúngicas utilizadas foram: *Candida albicans* ATCC 40227, *Candida krusei* ATCC 6538 e *Candida tropicalis* ATCC 13803. Todas as cêpas foram mantidas em *heart infusion Agar slants* (HIA; Difco) e antes dos ensaios, as células foram cultivadas durante 24h a 37°C em *brain heart infusion* (BHI, Difco). Todas as cêpas foram obtidas da coleção de microorganismos do laboratório de micologia - UFPB.

4.3 Meios de cultura

Foram utilizados nos ensaios biológicos os seguintes meios de cultura: *Agar Heart Infusion* - HIA (Difco, Detroit, MI.), *Brain Heart Infusion* – BHI (concentração indicada pelo fabricante, 10%). Todos os meios de cultura foram preparados seguindo as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

4.4 Linhagens celulares utilizadas

Para os ensaios *in vitro* de *T. cruzi*, cêpas do parasito CL-B5 (clone CL-B5) foram usados (BUCKNER *et al.*, 1996). Os parasitos foram transfectados com o gene β - galactosidase de *Escherichia coli* (LacZ) e foram gentilmente cedidos pelo Dr. F. Buckner por meio do Instituto Comemorativo Gorgas (Panamá). As formas epimastigotas foram cultivados a 28°C em Infusão de Fígado Triptose (LIT) com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina como descrito anteriormente (LE SENNE *et al.*, 2002), e colhidas durante a fase de crescimento exponencial. Para o estudo da atividade leishmanicida *in vitro*, foram utilizadas formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) a 26°C em *Schneider's* (meio para inseto) suplementado à 10% (v/v) inativado pelo calor de soro fetal bovino, 2% de urina humana normal (v/v) mais penicilina e estreptomicina.

4.5 Seleção e coleta do material vegetal

Folhas de *P. calomelanos* foram coletadas em período chuvoso (Setembro, 2010) na cidade do Crato, estado do Ceará, Brasil.

Figura 17. Município de Crato (verde), Ceará, Brasil.



<http://www.geoparkararipe.org.br/geopark-website/home.jsp?page=cidades/crato> 23 de julho de 2011

O material vegetal foi identificado por Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva da Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil, e uma amostra da espécie foi depositada com a identificação 5570 no Herbário “Dárdano de Andrade Lima” da Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil.



Figura 18. Localização da área de coleta de *Pityrogramma calomelanos* (Parque granjeiro, Crato, CE, Brasil). Imagens disponíveis em www.earth.google.com (Google Earth 2011), 23/07/2011.

4.5.1 Preparação do extrato etanólico (EEPC), fração hexânica (FHPC), fração acetato de etila (FAEPC) e fração metanólica (FMPC), de folhas de *P. calomelanos* (L.) Link.

Para preparação e obtenção do extrato foram coletadas folhas que ainda frescas foram trituradas com tesoura manual, tendo assim aumentada a superfície de contato. Em seguida, foram acondicionadas em recipientes individualizados contendo solvente suficiente para submergir todo material vegetal por 72h, sendo após esse período, filtrado em papel filtro e concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B – Quimis, Brazil) e ultrathermal banho (model Q-214M2 – Quimis, Brazil) (BRASILEIRO *et al*, 2006). Posteriormente, 950 g de folhas de *P. calomelanos* obtiveram 50g de extrato etanólico. Mais tarde, 40 g de EEPC foi fracionado com hexano, acetato de etila e metanol, produzindo 14,3 g de fração metanólica, 18,5 g de fração acetato de etila e 0,56 de fração hexânica. O extrato etanólico e as frações foram diluídas em DMSO.

4.5.2 Preparo das soluções a partir do extrato e frações

No preparo da solução inicial, o extrato etanólico foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO- *Merck, Darmstadt, Alemanha*), sendo observadas as seguintes proporções: 10mg de extrato solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração inicial de 10mg/mL. Em seguida, esta solução foi diluída em água destilada atingindo uma concentração de 1024µg/mL e reduzindo a concentração de DMSO para 10%.

4.5.3 Prospecção fitoquímica

A avaliação e identificação das classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico e frações foi realizada através de prospecção fitoquímica, seguindo o método descrito por Matos, 2009. Segundo este autor, a identificação dos principais constituintes químicos é possível mediante execução de sua técnica descrita a seguir. Os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

4.6 Metodologia utilizada na prospecção fitoquímica

4.6.1 Preparação de extratos

Foram utilizados 300mg de extrato bruto e frações. Para a diluição dos produtos naturais foi usado etanol absoluto com 30% de água (21mL de álcool e 9mL de água

destilada). Em seguida, frascos de 10 mL foram numerados de 1 a 6 onde foi adicionado 3 mL de cada produto natural diluído em etanol.

4.6.2 Teste para identificação de fenóis e taninos

Para este teste, tomou-se o frasco nº 1 e junto com três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 o frasco foi agitado observando alguma variação na sua cor ou formação de precipitado abundante e escuro. Em seguida, foi comparado com um teste em branco, usando apenas água e cloreto férrico. Para interpretação dos resultados foi feita a seguinte observação: Coloração variável entre azul e vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste - branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

4.6.3 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Neste ensaio, tomou-se os frascos de nº 2, 3 e 4 acidulando um deles a pH 3, alcalinizando outro a pH 8,5 e o terceiro a pH 11. Em seguida, foi observada qualquer mudança de coloração do material. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes de acordo com a tabela 5.

Tabela 5: Coloração representativa dos metabólitos secundários listados.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido pH 3	Alcalino pH 8,5	Alcalino pH 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul/púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelho/Púrpura
Flavononóis	-	-	Vermelho/Laranja

4.6.4 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Neste teste, tomou-se os frascos nº 5 e 6, acidulando o primeiro por adição de HCl até pH 1-3 e alcalinizando o outro com NaOH até pH 11. Em seguida foi aquecido com auxílio de uma chama de álcool durante 2-3min, cuidadosamente. Foi observada qualquer modificação na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. Para interpretação dos resultados foi feita a seguinte observação: Aparecimento ou

intensificação de cor indica a presença de constituintes. Em meio ácido: Leucoantocianidinas (Vermelho); Catequinas (Pardo/amarelada). Em meio alcalino: Flavononas (Vermelho/Laranja). No caso da presença de ambos, um constituinte pode mascarar a cor indicativa de outro.

4.6.5 Teste para alcalóides

Para o teste de alcalóides os produtos naturais foram diluídos em 30 mL ácido Acético 5%. Em seguida essa solução foi aquecida até a fervura por alguns minutos. Imediatamente a solução foi transferida para um funil de separação que em seguida foi alcalinizada com Hidróxido de Amônia (NH₄OH) 10% (aproximadamente 10 mL) acompanhando o pH com auxílio de papel indicador e adicionando clorofórmio (aproximadamente 15mL), que sofreu agitação e foi deixado em repouso. Na presença de alcalóides esses irão passar para a fase clorofórmica denominada - Fração Alcaloídica. Após o procedimento, coletou-se a fase clorofórmica com auxílio de um béquer. Em seguida, evaporou-se o solvente restando apenas um resíduo que deverá conter alcalóide. Ao resíduo foi adicionado gotas de ácido clorídrico (HCl) 1% que foi homogeneizado. Logo depois foi aplicado sobre uma lâmina de vidro uma gota da solução clorídrica obtida ao lado de 1 gota de reagente Dragendorff. As soluções foram misturadas. O aparecimento de precipitado é indicativo da presença de alcalóides na planta.

4.7 Preparo e padronização de inóculos bacterianos e fúngicos

Culturas de fungos e bactérias foram mantidas a 4°C em Infusão de Coração em Agar (*Heart Infusion Agar* - HIA). Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas por 24 horas a 35°C. As linhagens testadas foram inoculadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) na concentração recomendada pelo fabricante, e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Suspensões com crescimento bacteriano e fúngico foram diluídas em BHI em concentração de 10% até a obtenção de 10⁵ céls/mL (NCCLS, 2000).

4.8 Ensaio de susceptibilidade para as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*

O ensaio de rastreamento foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços de plástico com culturas que não atingiram a fase estacionária, como descrito por VEGA *et al.*, 2005. Formas epimastigotas foram semeadas a 1 x 10⁵ por mililitro em 200 µL, as placas foram então incubadas com o extrato e frações a 28°C por 72 horas, momento em que 50 µL de solução CPRG foram adicionados para dar uma concentração final de 200 µM. As placas

foram incubadas a 37°C por mais 6 h adicionais e então lidas a 595 nm em espectrofotômetro. O Nifurtimox foi utilizado como droga de referência. Cada concentração foi testada em triplicata. Cada experimento foi realizado duas vezes separadamente. O percentual de inibição (%AE) foi calculado como segue: $\%AE = [(AE - AEB)/(AC - ACB)] \cdot 100$, onde AE = absorvância do grupo experimental; AEB = branco de compostos; AC = grupo controle de absorvância; ACB = branco de meio de cultura. As soluções do extrato e frações a ser analisadas foram preparadas em dimetilsulfóxido, tendo como concentração final uma mistura água/DMSO jamais excedendo 0.2% do solvente final.

4.9 Ensaio de susceptibilidade para formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*

Formas promastigotas (2.5×10^5 parasitas/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços de plástico. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Diferentes diluições dos compostos de até 200 mL de volume final são adicionadas. Após 48 h a 26 °C, 20 mL de solução de resazurina foi adicionado e a oxido-redução foi quantificada a 570 a 595 nm. Cada concentração foi testada em triplicata. Em cada ensaio foi utilizado drogas de referência como controle. As porcentagens para atividade antipromastigotas (%AP) foram calculadas. A eficácia de cada composto foi determinada.

4.10 Ensaio de citotoxicidade

O procedimento para a medição de viabilidade celular foi avaliada com resazurina por método colorimétrico. Fibroblastos NCTC929 foram semeados (5×10^4 células/ poço) em placas de microdiluição de fundo chato de 96 poços com 100 µL de meio RPMI 1640. Deixou-se que as células pavimentassem as placas por 24h a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi substituído por diferentes concentrações das drogas em 200 µL de meio e, em seguida, foram incubados por mais 24h. Controles de crescimento também foram incluídos. Posteriormente, um volume de 20 µL da solução 2mM de resazurina foi adicionado e as placas foram devolvidas à incubadora por outras 3h para avaliar a viabilidade celular. A redução da resazurina foi determinada por medida de absorvância do comprimento de onda a 490nm e 595nm. Cada concentração foi testada três vezes. O meio e as drogas padrões foram usados em cada teste como brancos. A citotoxicidade de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de citotoxicidade (C%).

4.11 Atividade antifúngica/antibacteriana e modulação

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em BHI 10% pelo método de microdiluição em caldo, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL e concentrações do extrato e frações variando de 1024 $\mu\text{g/mL}$, e a partir desta, efetuaram-se diluições seriadas 1:1, durante o teste microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato e frações variando de 512 a 8 $\mu\text{g/mL}$ e DMSO para 5% de concentração (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano foi observado. Para a avaliação do extrato e frações como modificadores da resistência a drogas antifúngicas e antibacterianas, a concentração subinibitória (CIM/8) foi adicionado uma concentração da substância teste variando de 1024/0,5 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e lidas visualmente.

4.12 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas usando o programa *Prisma 5.0*. As medidas da concentração efetiva (CE_{50}), que representa a concentração da amostra necessária para eliminar 50% dos microorganismos foram calculadas através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados medindo a porcentagem da atividade efetiva *versus* as concentrações do extrato e frações de cada amostra. A CE_{50} foi obtida pela resolução da equação (substituindo o valor de Y por 50) que é a concentração necessária para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para o extrato e frações da planta (MENSOR, 2001).

RESULTADOS
E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade tripanocida

Conforme nossos resultados foi visto que a FHPC apresentou excelente atividade tripanocida na concentração de 50 µg/mL, pois houve 71% de morte ou inibição do crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Além desta, a FHPC foi testada em mais duas concentrações, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. Nesta concentração houve 67% de inibição e naquela houve 47% de inibição, logo, estes resultados indicam bons resultados contra *T. cruzi*. O dado mais interessante da FHPC é que, além de mostrar excelentes efeitos tripanocidas, a mesma não apresentou nenhum teor de citotoxicidade, nas concentrações testadas, em células humanas (fibroblastos, NCTC929). A EC₅₀ para a FHPC foi determinada, revelando um valor de 73,57.

Para o EEPC foi verificado que o mesmo também apresentou bons efeitos tripanocidas, no entanto, estes efeitos aconteceram mediante altas concentrações do extrato e altos níveis de citotoxicidade. Quando se testou o EEPC na concentração de 50 µg/mL houve 37% de morte ou inibição do crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade de 6%, não sendo um resultado clinicamente relevante. A EC₅₀ para o EEPC foi determinada, revelando um valor de 52,26.

Na análise fitoquímica detectou-se a presença de flavonóides. A pesquisadora Ana *et al.*, (2010) demonstrou que o flavonóide quercetina, isolado da fração hexânica de *Rapanea lancifolia* demonstrou baixa atividade tripanocida. Por outro lado, Takeara *et al.*, (2003) mostrou que Quercetina-3-metil éter isolado do extrato de *Lychnophora staavioides* Mart. (Asteraceae) mostrou atividade promissora contra *T. cruzi*, pois não houve lise de células sanguíneas. Além disso, Quercetina-3-metil éter apresentou uma porcentagem de atividade tripanocida de 63,2 %. Este relato qualifica ainda mais o nosso resultado, pois mostra uma íntima semelhança entre atividade tripanocida da FHPC com o trabalho de Takeara *et al.*, (2003). De acordo com dados da literatura, este é o primeiro relato, cientificamente comprovado, da atividade antiepimastigota para *Trypanosoma cruzi* utilizando extrato etanólico (EEPC) e fração hexânica (FHPC) de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

5.2 Atividade leishmanicida

De acordo com nossos resultados foi constatado que a FHPC e a FMPC, nas várias concentrações testadas, não apresentaram atividade clinicamente significativa contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*. Isto se deve pelo fato destas frações terem

apresentado um percentual de 0% para essa atividade. Observou-se que na concentração de 500 µg/mL o EEPC e a FAEPC apresentaram 100% de atividade leishmanicida, entretanto, estes produtos naturais mostraram um alto percentual (100%) de citotoxicidade quando testados em células humanas (fibroblastos, NCTC929). Desta forma, assinalam-se estes resultados como irrelevantes do ponto de vista clínico. Baseado nisto, conclui-se que os produtos naturais de *P. calomelanos*, na forma de extrato ou frações, não possuem atividade leishmanicida.

Em comum acordo com a literatura, este é o primeiro relato, cientificamente comprovado, da atividade antipromastigotas para *Leishmania braziliensis* utilizando extrato etanólico (EEPC), fração hexânica (FHPC), fração acetato de etila (FAEPC) e fração metanólica (FMPC) de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

5.3 Atividade antifúngica e moduladora de antibióticos

Conforme nossos resultados, foi observado uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) no valor de ≥ 1024 µg/mL para o extrato etanólico e frações de *Pityrogramma calomelanos*, logo, podemos afirmar que os produtos naturais desta espécie não apresentam atividade antibiótica clinicamente relevante. No teste de concentração sub-inibitória (modulação da ação de aminoglicosídeos) a FMPC e a FHPC modularam exclusivamente a atividade do Benzoilmetronidazol frente às cêpas de *C. albicans*, reduzindo a CIM para 128 µg/mL. O EEPC modulou a atividade do Benzoilmetronidazol frente à *C. krusei* e *C. tropicalis*, reduzindo a CIM de ambas as cêpas para 256 µg/mL. Por outro lado, a FAEPC não produziu atividade moduladora de antibióticos frente às três linhagens de cêpas testadas. Portanto, baseado nos dados da literatura, este é o primeiro relato de atividade antifúngica para o extrato etanólico (EEPC), fração hexânica (FHPC), fração acetato de etila (FAEPC) e fração metanólica (FMPC) de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. frente às cêpas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

5.4 Atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos

Segundo nossos resultados, foi verificado que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) mostrou valor de ≥ 1024 µg/mL para o extrato e as frações analisadas, logo este resultado pode ser consignado como irrelevante do ponto de vista clínico.

A atividade moduladora de antibióticos (aminoglicosídeos) apresentou dados bem interessantes. Nos testes, foi visto que o EEPC potencializou o efeito da amicacina frente à *E. coli* 07, reduzindo a CIM em 4 pontos. O EEPC também modulou a atividade de amicacina,

canamicina e gentamicina frente à *S.aureus* 358, reduzindo a CIM em 3, 2, e 6 pontos, respectivamente. Por outro lado, o EEPC não modulou a atividade de nenhuma droga frente à *P. aeruginosa* 03.

A FMPC modulou a atividade apenas da amicacina frente à *E. coli*, reduzindo a CIM em 2 pontos. Frente à *S. aureus* a FMPC modulou a atividade de canamicina, gentamicina e neomicina, diminuindo a CIM em 2, 6, e 2 pontos, respectivamente. Já frente à *P. aeruginosa* 03 a FMPC não modulou a atividade de nenhum aminoglicosídeo testado.

A FAEPC modulou a atividade da amicacina reduzindo a CIM em 9 pontos frente à *E. coli*. Frente à *S. aureus* a FAEPC modulou a atividade de canamicina, gentamicina e neomicina, diminuindo a CIM em 2, 6, e 3 pontos, respectivamente. De outra forma, a FAEPC não induziu ação moduladora de aminoglicosídeos frente à *P. aeruginosa* 03.

A HFPC frente à *E. coli* modulou a atividade da amicacina e canamicina, reduzindo a CIM em 9 e 4 pontos, respectivamente. Frente à *S. aureus* a HFPC modulou apenas a atividade da gentamicina reduzindo a CIM em 6 pontos. Ante estes resultados não foi verificado ação moduladora de antibióticos da HFPC frente à *P. aeruginosa* 03.

Inúmeras pesquisas têm abordado o uso combinado de drogas, seja sintética ou de origem vegetal. Essa nova abordagem tem sido útil no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes. Estudos com extratos de plantas têm mostrado uma promissora atividade quando combinados a antimicrobianos atualmente utilizados, aumentando de fato a sensibilidade de microrganismos resistentes à drogas sintéticas.

Os extratos e frações de plantas ou animais possuem em sua composição diversas moléculas com propriedades antibióticas. Estes compostos, isoladamente ou de forma associada, podem agir aumentando ou diminuindo uma determinada atividade, bem como apresentarem efeito citotóxico em células humanas. Logo, são necessárias mais investigações que possibilitem determinar o potencial terapêutico das plantas, e que por sua vez, confirmem as incríveis propriedades antibióticas de um grande número de plantas ainda inexploradas.

LISTA DE ARTIGOS

6 LISTA DE ARTIGOS DERIVADOS DO PROJETO

6.1 - Capítulo. Pteridófitas em evidência: etnobotânica e bioatividades farmacológicas.

- *Capítulo submetido e aceito à Nova Publishers*

6.2 - Artigo 1 - Cytotoxic and Tripanocide Activities of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

- *Artigo submetido: American fern Journal*

6.3 – Artigo 2 - Evaluation of the anti-*Leishmania* activity of ethanol extract and fractions of the leaves from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

- *Artigo aceito: Pathogens and Global Health*

6.4 – Artigo 3 - Enhancement of antimicrobial activity of antibiotic and antifungals by the use of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

- *Artigo aceito: Archives of Biological Sciences*

6.5 - Artigo 4 - Evaluation of antimicrobial and modulation activity of ethyl acetate fraction and hexane fraction of the leaves from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

- *Artigo submetido: Central European Journal of Chemistry enviado*

6.6 - Artigo 5 - Additive effects of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. combined with aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*.

Artigo submetido: Indian Journal of Medical Research

6.1 - Capítulo - Pteridófitas em evidência: etnobotânica e bioatividades farmacológicas.

PTERIDÓFITAS EM EVIDÊNCIA: ETNOBOTÂNICA E BIOATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga¹, Teógenes Matias de Souza², Irwin Rose Alencar de Menezes², José Galberto Martins da Costa², João Batista Teixeira da Rocha⁴, Margareth Linde Athayde³, Antonio Álamo Feitosa Saraiva¹, Henrique Douglas Melo Coutinho².

¹Departamento de Ciências Biológicas e ²Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil; ³Departamento de Farmácia Industrial e Departamento de Química⁴ da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

* Autor para correspondência:

Henrique Douglas Melo Coutinho

Pteridófitas em evidência: Etnobotânica e Bioatividades Farmacológicas

RESUMO

Sem dúvida alguma, as pteridófitas são um dos grandes grupos de vegetais vasculares existentes em diversos lugares do planeta terra. Neste sentido, este capítulo discorrerá a respeito de sua utilidade para o bem-estar e melhoria da qualidade das populações humanas. Previamente, é necessário que este grupamento de plantas seja primeiramente apresentado e caracterizado para facilitar o entendimento da relação entre as espécies deste grupo e o homem. Em seguida, antes de consignar diferentes relatos sobre bioatividades, torna-se necessário destacar o uso medicinal de plantas para a cura de diversos tipos de enfermidades, através de abordagens etnobotânicas com expressões do uso (partes da planta, espécies utilizadas e serventia) em diferentes tipos de culturas. Dessa forma, será possível deleitar-se com as diversas potencialidades farmacológicas deste grupo que há milhões de anos habita o planeta, confirmando o conhecimento empírico e tradicional que expressa o poder da medicina fitoterápica. Para enriquecer o discurso sobre as potencialidades de pteridófitas, um interessante estudo de caso será demonstrado sobre a investigação de atividade antioxidante em samambaias de diferentes famílias. Nesta abordagem será dada ênfase a compostos fenólicos,



1. INTRODUÇÃO

Pteridófitas são criptógamas vasculares e formam um grupo negligenciado rico em biodiversidade. Seu valor alimentício e medicinal não são muito bem conhecidos pela população mundial, embora sejam difundidos amplamente na literatura científica.

A utilização destas plantas de sociedades antigas a contemporâneas como agente terapêutico, entre outras serventias, tem instigado a curiosidade em conhecer um pouco mais sobre a prática medicinal popular, que as coloca como um dos protagonistas da história humana e, sobretudo, em averiguar a sua eficácia através da ciência.

Relações entre pteridófitas e o homem, portanto, tem sido registrada ao longo dos anos. O uso das pteridófitas é relatado no sistema de medicina Ayurvedic elaborado por Sushruta (ca 100 AD) e Charka (ca 100 AD) que recomendava o uso de algumas samambaias em suas *Samhitas*, a literatura médica tradicional. Pammel [1] compilou um manual de plantas venenosas do leste da América do Norte com breves citações sobre os valores medicinais e econômicos de várias plantas, incluindo algumas pteridófitas. Samambaias também são usadas pelos médicos no sistema de medicina Unani [2]. No sistema de medicina chinesa, muitas samambaias são prescritas por médicos locais [3]. Mais tarde, modernos estudos biológicos e farmacêuticos foram realizados em pteridófitas por diferentes pesquisadores. Benerjee e Sem [4] conduziram uma extensiva pesquisa para a atividade antibiótica de inúmeras samambaias, relatando sobre uma centena de espécies com tal propriedade. Dixit e Vohra [5] reportaram que importantes espécies de pteridófitas da Índia são usadas na alimentação e medicina popular. Kaushik [6] enfatizou a importância etnobotânica de samambaias de Rajasthan, Índia. Estudos importantes sobre o valor alimentar e medicinal de pteridófitas foram conduzidos por Nayar [7], Hodge [8], e Dixit [9]. Em 2004 Gosh *et al.* [10] reportou o uso de pteridofitas como plantas alimentícias e medicinais.

O uso etnobotânico desse grupo é de imensa importância e isto é claramente entendido por pesquisadores como substrato necessário para a descoberta de princípios ativos capazes de promoverem o bem-estar e a saúde humana.

2. PTERIDÓFITAS: CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS ECOLÓGICOS

Pteridófitas são plantas vasculares sem flores e sementes, que se reproduzem por esporos, cujo ciclo de vida heteromórfico é apresentado em duas fases, a gametofítica e a esporofítica, compartilhando dessa forma uma alternância de gerações [11]. Por um longo

tempo, estas plantas foram tratadas como um único grupo sendo classificado como pertencendo a uma divisão chamada pteridophyta [12], constituída por classes evolutivamente distintas, formando um táxon parafilético [13,14].

A partir da década de 90, novos estudos envolvendo análises cladísticas com dados morfológicos, ultraestrutura de gametas e análises de seqüências de DNA com uso de marcadores moleculares de genes plastidiais, mitocondriais e nucleares culminaram com o direcionamento das pteridófitas em duas linhagens monofiléticas distintas: as licófitas e as monilófitas (samambaias) [14,15,16].

Na nova classificação, portanto, o termo “pteridófitas”, designado para representar um grupo parafilético, começa a cair em desuso e o que antes conhecíamos como “pteridófitas”, de acordo com Prado e Sylvestre [11] corresponde hoje às linhagens monofiléticas licófitas e samambaias. Apesar das semelhanças no ciclo de vida, estes grupos diferem filogeneticamente, e as samambaias são mais relacionadas com as plantas com semente do que as licófitas.

As samambaias possuem megafilos e uma vascularização diferenciada, onde o protoxilema apresenta-se confinado a lobos do cordão do xilema. As raízes laterais são formadas a partir da endoderme, o protoxilema é mesarco (primeiras células do xilema em posição mediana, com maturação radial) nos brotos e os anterozoides possuem de 30 a 1.000 flagelos. A este grupo pertencem às classes Psilotopsida, Equisetopsida, Marattiopsida e Polypodiopsida e são reconhecidas 37 famílias e aproximadamente 12.240 espécies [13,14,17].

As licófitas caracterizam-se por apresentarem folhas do tipo microfilo (com apenas uma nervura central), arranjo dos microfilos helicoidal ou oposto, microfilos ligulados ou sem lígulas, esporângios nascidos na axila do microfilo (lado adaxial) ou esporângios geralmente organizados em estróbilos no ápice dos ramos [14,18] estima que hoje as licófitas representam menos de 1% de todas as plantas vasculares, sendo compostas pelas famílias Lycopodiaceae, Selaginellaceae e Isoetaceae [19, 20], com cerca de 1.300 espécies descritas [17].

Licófitas e samambaias ocupam uma grande diversidade de ambientes em variados ecossistemas, apresentando diferentes formas biológicas, incluindo quase todas as formas de crescimento e de adaptação das angiospermas [21] e são representadas por plantas terrestres, epífitas, hemiepífitas, rupículas ou aquáticas [11]. Segundo Moram [17], o número de espécies aumenta em ambos os hemisférios quando se aproxima da linha do equador, atingindo aproximadamente um total de 13.600 espécies, distribuídas em quatro centros de

maior diversidade: Sudeste Asiático com 4.500 spp., América do Sul com 3.500 spp., Mesoamérica com 1.800 spp. e a região das Antilhas com 1.200 spp.

Ambientes tropicais úmidos e montanhosos com diferentes formas de disponibilidade híbrida, como precipitação, condensação e neblina, são locais de maior prevalência deste grupo de vegetais. Ocorrência em áreas de estação seca ou em clima semiárido também é registrada; entretanto, como é de se esperar, isto ocorre em menor proporção. Informações contidas no Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil [11], apontam, que este país, por exemplo, com área territorial de 8.514.880 Km², provavelmente possui a maior flora do mundo, perfazendo de 8,8 a 12,8%. Deste percentual, 9,2 a 13,1% de sua diversidade florística é distribuída entre samambaias e licófitas, sendo a ocorrência maior verificada nos Domínios Fitogeográficos Mata Atlântica, seguida pela Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal.

Para finalidade didática, neste capítulo utilizaremos o termo pteridófitas, uma vez que nem todas as plantas mencionadas, encontram-se apropriadamente classificadas em licófitas e monilófitas por seus pesquisadores.

3. ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS: A IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONOMICA DO SEGUNDO MAIOR GRUPO DE PLANTAS VASCULARES.

Com uma grande riqueza de espécies, era de se esperar que o homem se beneficiasse delas com o objetivo de melhorar sua qualidade de vida. Ao longo dos anos as pteridófitas vêm sendo amplamente utilizadas de diversas formas pelas populações humanas e a importância do grupo abrange aspectos econômicos diversificados, embora não sejam tão reconhecidos mundialmente. Como exemplo, podemos destacar o uso etnobotânico como plantas ornamentais, como matéria prima para a fabricação de artesanatos, utensílios domésticos e cosméticos, em rituais místicos, na alimentação e na medicina popular.

A utilização como planta ornamental, viva ou desidratada, tem despertado desde muito tempo o interesse das populações, e tem sido considerada uma das principais atividades econômicas deste grupo de plantas vasculares. A exemplo disto cita-se a espécie *Rumohra adiantiformis* (G. Forst) Ching a samambaia-preta ou verdes, que, através de sua extração direta do ambiente natural, tem sido a fonte de renda para cerca de três mil agricultores da Encosta Atlântica do rio Grande do Sul, Brasil (Ribas e Miguel, 2003) [22]. Outras espécies são citadas por Santos e Sylvestre (2006) [23] como plantas ornamentais, sendo estas *Polypodium catharinae* Langsd. & Fisch., *Polypodium triseriale* Sw., *Adiantopsis radiata* (L.)

Fée, *Adiantum raddianum* C. Presl., *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link, *Anemia collina* Raddi, *Thelypteris dentata* (Forssk.) E.P. St. John, muito utilizadas na ornamentação de ambientes ou no preparo de arranjos de flores.

Dicksonia sellowiana Hook, o xaxim, apesar da iminente ameaça de esgotamento como recurso natural não renovável e mesmo constando na lista oficial de plantas ameaçadas de extinção, tem sido extraída em atividade exploratória no estado do Paraná – Brasil, para a fabricação de vasos, placas, palito e pó [24].

Na Nicarágua, a samambaia de hábito lianescente *Lygodium venustum* SW., chamada localmente de crespillo é extraída para fabricação de cestas, sendo de grande importância para as famílias que sobrevivem desta atividade econômica. Esta mesma espécie é também utilizada no preparo da bebida sagrada ayashuasca pelas tribos indígenas Sharanahua e Culina na Amazônia Peruana [25, 26].

O uso místico de algumas espécies também é relatado. *Selaginella bryopteris* (L.) Bak. é fumada juntamente com o tabaco em rituais místicos causando alucinações, enquanto *Trichomanes vittaria* e *Selaginella amazônica* são empregadas em banhos, para acalmar e atrair felicidade. *Asplenium formosum* e *Microgramma vacciniifolia* são usadas em banhos mediúnicos [27].

Pteridófitas são também apreciadas na alimentação, sendo que a grande maioria só é consumida depois de cozida, para que perca o sabor amargo. Como exemplo podemos citar espécies como *Maratta salicina* (Sm.), *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw., *Máxima diplazium* (D. Don) C. Chr., *Dicranopteris linearis* (Burm. f.) Und., *Angiopteris evecta* (Hoffm.) e *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn var. *arachnoideum* (Kaulf.) Brade, sendo que esta última pode desenvolver tumores no trato gastrointestinal em ratos e por causa deste efeito e da ação carcinogênica e mutagênica demonstrada por outras variedades desta espécie, aconselha-se que seja cessado o seu uso na alimentação [23, 28, 29, 30].

Entretanto, o uso secundário mais comum das pteridófitas é como planta medicinal. Nos últimos anos, diversos trabalhos tem sido realizados em inúmeras localidades e listagens contendo nome científico e popular, partes utilizadas e formas de uso pelas populações, além da sua serventia são divulgados no meio científico. Na realidade, Os levantamentos etnobotânicos são muito importantes, pois fornecem informações valiosas sobre a terapêutica popular e, além disso, norteiam pesquisas sobre atividades farmacológicas de espécies mencionadas como medicinais, na busca incessante por compostos clinicamente utilizáveis.

1. ETHNOMEDICINA DE PTERIDÓFITAS: SABEDORIA POPULAR E SAÚDE

Ao longo dos anos, experiências com plantas medicinais vêm sendo repassadas de geração em geração. O uso contínuo de pteridófitas por povos de todo o mundo ainda tem tido pouco destaque em relação ao grupo das angiospermas. Mesmo assim, espécies de diversas famílias são utilizadas em tratamentos fitoterápicos tradicionais, nos quais são utilizadas folhas, pinas, rizomas, raízes ou esporos, sob a forma de chá, decocto, pó, pomada ou xarope, entre outros, no combate a diversos tipos de enfermidades.

Na literatura científica constam levantamentos etnofarmacológicos realizados em diferentes partes do mundo, mas a Índia tem se destacado como um dos países de maior divulgação do uso medicinal de pteridófitas. Diversas pesquisas etnofarmacológicas têm sido desenvolvidas registrando um número considerável de plantas. Pesquisadores como Karthik [31], Kumari [32], Upreti [28], Srivastava [29] e Benjamim e Manickam [33] realizaram levantamentos etnobotânicos sobre a fitoterapia popular deste país, nos quais foram totalizadas 91 espécies diferentes, sendo que apenas a espécie *Angiopteris evecta* (Forst.) Hoff. da família Marattiaceae foi citada em comum em todos os trabalhos. Tais pesquisas, apesar de sua grande relevância, não chegam a exprimir nem representar a etnofarmacologia mundial de pteridófitas. Muitas espécies utilizadas como fitoterápicos em diferentes regiões mundiais não chegaram a ser citadas, ou por não fazerem parte da biodiversidade indiana ou simplesmente por não terem esta finalidade nas localidades pesquisadas. Uma pequena amostra da medicina popular da pteridoflora indiana é aqui demonstrada, em uma seleção de sete espécies citadas comumente em pelo menos quatro trabalhos (quadro 01). As informações disponibilizadas podem ser consideradas um interessante guia para a busca de produtos naturais bioativos.

Tabela 1. Uso medicinal de algumas pteridófitas.

Nome Botânico	Uso Etno-medicinal
<i>Adiantum capillus-veneris</i> Linn.	O decocto das folhas é usado contra bronquite aguda e febre. A fronde contra tosse, gripe, contra mau hálito e como colírio. A planta é ainda usada como demulcente, expectorante, diurético, emenagogo, tônico, adstringente, depurativo, emético. A planta inteira é usada em um gel misturada com babosa e aplicada em cortes, feridas e como tônico capilar. O chá ou suco é usado contra tosse, bronquite e infecções de garganta. Internamente, é usada também contra alcoolismo e contra vermes. Externamente, é usada contra picada de

	cobra e de abelhas. Para esta planta ainda são relatadas atividades anticancerígenas, hipoglicemiante, afrodisíacas, antimicrobianas e antivirais.
<i>Angiopteris evecta</i> Hoffm.	O rizoma pulverizado é utilizado misturado com água contra diarreia. É usada como alimento e contra fraturas. Ainda é utilizada na medicina tradicional como calmante e contra dor, febre e contra piolhos. O óleo essencial é utilizado na perfumaria local. O decocto das folhas é ingerido junto ao suco de limão para tratamento de dores de estômagos e úlcera. O extrato das folhas é utilizado no tratamento de disenteria. Os esporos são eficazes no tratamento de hanseníase e outras doenças de pele.
<i>Blechnum orientale</i> Linn.	O rizoma tem ação antihelmíntica e contra <i>S. typhimurium</i> . O suco das folhas é usado para curar úlceras intestinais e a pasta do rizoma é utilizada para tratar problemas na bexiga.
<i>Dicranopteris linearis</i> (Burm. f.) Und.	Os brotos são consumidos como alimentos e as frondes são utilizadas com cobertura de telhado e de paredes. O decocto é utilizado como laxante. Frondes também são utilizadas contra asma e apresentam ação antibacteriana e antihelmíntica. Na medicina tradicional, ainda é utilizada para curar a esterilidade feminina misturado com leite de vaca.
<i>Helminthostachys zeylanica</i> (L.) Hook.,	Esta planta é utilizada contra processos de intoxicação e utilizada contra dores no nervo ciático. As fronds são usadas como afrodisíaco. O decocto do rizoma é utilizado contra impotência. As folhas jovens são cozinhadas como verduras. O rizoma pulverizado misturado com leite de vaca é usado como tônico estimulante e cerebral e aperiente. Na medicina tradicional, esta planta é utilizada como anestésico e no tratamento de bolhas, úlceras e disenteria.
<i>Lygodium flexuosum</i> (L.) Sw.	O rizoma pulverizado é usado contra herpes, doenças de pele, como expectorante, contra reumatismo, piolhos, eczemas, cortes e feridas. As raízes frescas misturadas com óleo de mostrda são utilizadas contra reumatismo, carbúnculos, úlceras. O extrato aquoso do rizoma é utilizado contra gonorréia. A planta ainda é usada como espectorante. Osuco da planta combate a febre e a ovulação.
<i>Pteris vittata</i> Linn.	Folhas são utilizadas para a prevenção de doenças. O extrato da planta é utilizado como demulcente, hipotensor, tônico, antiviral e antibacteriano. A planta inteira é utilizada como pasta e aplicada sobre as áreas afetadas por feridas. A pasta é misturada com pimenta e ingerida para combater gripe, tosse e febre.

Se cruzarmos os dados descritos nos citados trabalho e em outros levantamentos etnobotânicos de contexto mundial, veremos que algumas espécies são de fato utilizadas para os mesmos fins em diferentes culturas. O uso em comum de algumas espécies por diferentes populações tem despertado a atenção e a curiosidade de pesquisadores quanto à investigação sobre a eficácia de bioatividades tão referenciadas pela tradição popular em testes de pré-triangem quanto à utilidade terapêutica, aplicada continuamente ao longo de várias gerações. Dessa forma, diversos questionamentos surgem a respeito, como por exemplo: o que há de tão especial neste grupo de vegetal que justifique seu uso desde culturas primitivas a contemporâneas? Existem, de fato, componentes bioativos que atuam em sistemas corpóreos reequilibrando suas funções? Que parte da quimiodiversidade destas plantas é responsável pela cura de enfermidades? Que quantidade do produto é efetivamente necessária para um efeito desejado? Em que tipo de célula age melhor e de que forma? Que conseqüências o uso contínuo de pteridófitas poderão trazer à saúde humana? De fato, a busca pelas respostas a estes questionamentos fomenta as pesquisas mundiais sobre as bioatividades deste antigo grupo de plantas vasculares e cada vez mais, porém não com tanto alarde, os mistérios da etnomedicina da pteridoflora são desvendados em laboratórios de todo o mundo. Fitoconstituíntes são identificados e comparados em suas propriedades biológicas com os existentes em plantas de outros grupos vegetais de reconhecida importância, e ensaios são realizados *in vitro* e *in vivo* desvendando bioatividades terapêuticas quer sejam orientadas pelas pesquisas etnobotânicas, quer pela intuição dos cientistas a despeito dos metabólitos secundários encontrados nas plantas.

2. COMPROVANDO BIOATIVIDADES: A ELUCIDAÇÃO DE MISTÉRIOS DA ETNOMEDICINA

Ensaio biológicos realizados a fim de se comprovarem a eficácia de pteridófitas como fitoterápicos foram mais frequentemente desenvolvidos a partir do final do século XX. Diversas bioatividades foram então exploradas, sendo confirmada ou contestada a sua eventual possibilidade de aplicação clínico-terapêutica, indicando interessantes alternativas para a criação de novos fármacos ou classificando as plantas como ineficazes quanto à finalidade terapêutica.

Como exemplos destas possibilidades, elencamos alguns estudos realizados que comprovam algumas das atividades biológicas demonstradas pelas pteridófitas. É importante ressaltar que a grande maioria das pesquisas aborda atividades antimicrobianas (antibacterianas, principalmente), onde produtos naturais na forma de extrato, frações ou substâncias isoladas de pteridófitas são ensaiados frente a diferentes tipos de microrganismos de relevância patológica. Entretanto, outras atividades também serão aqui abordadas, tais como o potencial antifúngico, antiviral e antiparasitário de algumas espécies além da atividade anticarcinogênica e antioxidante que poderão ser úteis na identificação de matérias-primas para a síntese de substâncias bioativas potencialmente viáveis na utilização como novos fármacos.

Atividade antibacteriana

O desenvolvimento de resistência bacteriana tem levado a uma crescente procura por novos fármacos que possam de alguma forma eliminar ou neutralizar as defesas microbianas. Nas últimas décadas, os antibióticos sintéticos tiveram sua eficácia reduzida frente a versatilidade das bactérias, e os produtos naturais representam hoje, uma alternativa a ser explorada em suas propriedades farmacológicas. Neste contexto, diversos representantes da pteridoflora foram avaliados para sua potencialidade antimicrobiana e mostraram resultados muito promissores.

A espécie *Osmunda regalis* foi avaliada em seu potencial antimicrobiano por ser uma pteridófitas conhecida nos sistemas tradicionais de medicina. Thomas [34] pelo método de difusão em disco testou extratos de diferentes polaridades contra cepas de bactérias patogênicas. Atividade antibacteriana foi confirmada pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (MBC). O extrato acetônico exibiu melhores resultados com MIC e MBC de 12.5 mg/ml e 25 mg/ml respectivamente frente a

Pseudomonas aeruginosa, enquanto valores de MIC e MBC de 25 mg/ml e 50mg/ml foram observados para *Shigella sonnei*. Os compostos ativos de *O. regalis*, portanto, são solúveis em acetona e apresentam a capacidade de dificultarem o crescimento e a multiplicação de algumas cepas de bactérias multiresistentes.

Parihar *et al.* [35] desenvolveu um estudo bastante abrangente envolvendo 12 espécies de pteridófitas: *Adiantum capillus-veneris* L., *Adiantum incisum* Forsk., *Adiantum lunulatum* Burm. F., *Actiniopteris radiata* (Swartz.), Link, *Araiostegia pseudocystopteris* Copel., *Athyrium pectinatum* (Wall Mett ex.) T. Moore, *Chelienthes albomarginata* Clarke, *Cyclosorus dentatus* (Forsk.) Ching, *Dryopteris cochleata* (Don.) C. Chr., *Hypodematium crenatum* (Forsk.) Kuhn, *Marsilea minuta* L. e *Tectaria coadunata* (J. Smith) C. Chr. frente a bactérias gram-negativas, gram-positivas e fitopatogênicas: *Escherichia coli* MTCC 443, *Salmonella arizonae* MTCC 660, *Salmonella typhi* MTCC 734, *Staphylococcus aureus* MTCC 96 e *Agrobacterium tumefaciens* MTCC 431. Utilizando o método da difusão em disco, testou extratos aquosos e alcoólicos (metanol) das folhas, obtendo resultados que mostraram, com poucas exceções, que todos os produtos naturais mostraram-se eficazes na inibição bacteriana e assim passaram a constituir um excelente acervo para a busca de substâncias ativas com potencial para a constituição de novos fármacos antibacterianos.

Algumas espécies do gênero *Adiantum*, foram testadas frente a 11 bactérias pelo método da microdiluição por Singh *et al.* [36]. Os extratos metanólicos das espécies *Adiantum capillus-veneris*, *Adiantum peruvianum* e *Adiantum venustum* inibiram o crescimento de todas as linhagens bacterianas gram-positivas ensaiadas em Concentrações Inibitórias Mínimas que variaram entre 3,90 e 62,50 µg/mL. Das espécies utilizadas no estudo, *Adiantum venustum* foi a única que demonstrou atividade contra todas as linhagens gram-negativas. Merece destaque, a inibição de *E. coli* por *A. capillus-veneris* na concentração de 0,48 µg/mL. Todas as espécies de *Adiantum* ensaiados demonstraram notável atividade antibacteriana, atribuída pelos autores à presença de compostos fenólicos encontrados nas espécies.

Outro screening de agentes antibacterianos que merece ser mencionado em razão do grande número de espécies investigadas e resultados obtidos foi realizado por Banerjee e Sen em 1980 [4]. Neste primoroso estudo, 114 espécies foram investigadas. De diferentes partes das plantas (rizoma, estipe e folhas estéreis e férteis) foram obtidos extratos aquoso e orgânico (metanol, etanol 70%, éter e acetona) e os ensaios foram realizados pelo *agar cup method* contra as linhagens de *Staphylococcus aureus* (sensível e resistente a penicilina), *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* e *Vibrio cholerae*. Um total de 73 espécies (64%)

apresentaram atividade antibiótica, sendo que 33 inibiram bactérias gram-positivas, 9 inibiram gram-negativas e 15 espécies inibiram ambos os tipos de bactérias. Algumas espécies se destacaram quanto ao potencial antimicrobiano como *Microsorium alternifolium*, *Leptodecurrrens chillus*, *Polypodium irioides*, *Pyrrhosia mannii* e *Phymatodes ebenipês*, as dos gêneros *Dryopteris* e *Adiantum*, entre outras.

Com a grande quantidade de relatos sobre atividade antibacterianas de pteridófitas evidenciados nestes e em outros tantos trabalhos, vislumbrar-se que este representa realmente o grande foco das pesquisas por bioatividades. Fitoconstituintes ativos existentes em extratos e frações têm demonstrado grande capacidade para desarticular mecanismos de defesa desenvolvidos por bactérias. Isto é muito importante, ao considerarmos a expectativa de serem utilizados como fontes de novos fármacos, pois apesar de termos diversos tipos de antibióticos lançados no mercado, infelizmente estes não tem conseguido acompanhar o ritmo de desenvolvimento da resistência microbiana, tornando-se clinicamente ineficazes.

Atividade antifúngica

Estudos abordando o potencial antifúngico de pteridófitas são mais escassos quando comparados às pesquisas por antibacterianos. Dessa forma, a maioria dos relatos encontrados sobre esta atividade é oriunda de pesquisas na qual se busca também uma atividade antibacteriana nas espécies estudadas e não apenas antifúngica. Entretanto, é importante esclarecer que estas plantas também têm demonstrado capacidade de inibir o crescimento de diversos tipos de fungos e por este motivo deve lhe ser dada maior atenção neste aspecto.

Como exemplo de pesquisas que buscam concomitantemente atividades antibacteriana e antifúngica, relata-se os estudos desenvolvidos por Singh *et al.* [36] e Banerjee e Sem [4] mencionados anteriormente. No primeiro estudo, espécies de *Adiantum* foram ensaiadas contra oito linhagens fúngicas (*Candida albicans*, *Cryptococcus albidus*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus Níger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus spinulosus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus nidulans*) e os autores verificaram que o extrato metanólico de *A. capillus veneris*, *A. peruvianum*, *A. venustum* e *A. caudatum* foram eficazes na inibição de *C. albicans* e os três últimos também foram ativos contra *Aspergillus terreus*. No estudo feito por Banerjee e Sen, de 114 plantas pesquisadas apenas três mostraram potencial contra os fungos fitopatógenos *Curvularia lunata*, *Aspergillus Níger* e *Helminthosporium oryzae*, sendo estas das espécies *Dryopteris cochleata*, *Pteris biaurita* e *Gleichenia glauca*.

De maneira geral, as pteridófitas crescem em locais úmidos, onde ocasionalmente há presença de água devido às suas limitações de condições reprodutivas. Comumente isto ocorre

junto a fungos e assim, ambos passam a compartilhar o mesmo hábitat. Dessa forma, é natural que fungos tenham desenvolvido diferentes mecanismos de defesa como forma de adaptação e sobrevivência a metabólitos secundários produzidos e liberados pelas plantas, quando estas também buscavam melhores condições de existência livres de fitopatógenos.

Os compostos formados pelas vias secundárias metabólicas das plantas exercem um importante papel na perpetuação das espécies. A prospecção química das espécies *Psilotum nudum*, *biserrata Nephrolepis* e *cordifolia Nephrolepis* feita por Hani *et al.* [37], revelou a presença de flavonóides, taninos, alcalóides, açúcares redutores, triterpenóides e esteróides e a atividade antimicrobiana demonstrada por estas espécies pode ser atribuída a estes fitoconstituintes que inclusive já tem demonstrado efeito inibidor de microrganismos. Neste estudo, foram realizados ensaios antimicrobianos utilizando extratos aquosos e não aquosos de partes aéreas das espécies pelo método da difusão em disco contra nove tipos de bactérias e três importantes fungos dermatófitos (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*). O extrato aquoso das três espécies exibiu diferentes graus de inibição dos fungos. *Psilotum nudum* foi a única espécie cuja maioria dos tipos de extrato (aquoso, clorofórmio e etanólico) foi ativo contra todos os fungos testados. Os resultados mostraram que estas espécies apresentam substâncias ativas com propriedades antifúngicas e antibacterianas, já que também inibiram bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O gênero *Adiantum* além de ser uma das melhores indicações entre as samambaias contra bactérias, também demonstrou potencial antifúngico. Ghosh *et al.* [38] analisou o efeito contra *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* pelas espécies *Adiantum capillus-veneris* L. e *Adiantum lunulatum*. Foram testados o extrato bruto e fenóis (fenóis totais, carboidratos e aminoácidos) extraídos tanto de gametófitos quanto de diferentes partes dos esporófitos. Os testes foram feitos em três métodos distintos: *agar disc method*, *liquid culture method* e *suspension culture médium*, com objetivo de minimizar o erro e ambos os extratos exibiram atividade antifúngica, mas os gametófitos se destacaram com os melhores resultados. Este caráter pode ser atribuído, de acordo com os autores, ao grande acúmulo de metabólitos, em especial compostos fenólicos existentes no gametófito que, sendo precursor do zigoto, deve se manter metabolicamente mais ativo para que possa conferir resistência a agentes patógenos.

Outras pesquisas ainda podem ser sucintamente relatadas como a realizada por Dalli *et al.* [39] que constatou que a espécie *Pteris biaurita* possui uma forte atividade antimicrobiana, principalmente antifúngica e antibacteriana, supostamente devido a presença de eicosanóides e heptadecanos em suas folhas; e por Lee *et al.* [40] demonstrando que *Selaginella tamariscina* possui o biflavonoide isocryptomerin, bastante usado na medicina tradicional e

que este composto apresenta forte ação antifúngica por causar despolarização da membrana plasmática. Ruiz-Bustos [41] demonstrou que o extrato metanólico da samambaia *Jatropha cuneata* na concentração de 90 µg/mL exibe forte atividade antifúngica frente a *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus niger*.

A evolução natural dos fungos é algo que preocupa muito a comunidade científica. Suas células são semelhantes às humanas, pois são todos eucariontes, e por este motivo existem dificuldades em encontrar fármacos eficazes que agridam apenas alvos específicos. Caso sejam desenvolvidos novos mecanismos de defesa (o que é absolutamente natural que ocorra), fármacos comercialmente utilizados se tornarão obsoletos dificultando o tratamento de infecções fúngicas. Estas pesquisas com produtos naturais, neste caso, as pteridófitas, em triagens experimentais, apontam um caminho para a descoberta de novos princípios ativos extremamente necessários no contexto atual para suprir a carência de substâncias quimioterápicas. Vimos que estas plantas contêm fitoconstituintes promissores do gametófito até o esporófito e estes poderão ser usados para salvaguardar organismos humanos debilitados pelas infecções oportunistas causadas por fungos.

Atividade anticancerígena

O câncer tem abalado muitas famílias em todo o mundo. O grande sofrimento causado por esta doença, bem como sua grande incidência na população mundial, tem levado a uma crescente busca por princípios ativos com capacidade de inibir a proliferação de células tumorais. Neste contexto, a ciência tem investigado diversas possibilidades em relação a produtos naturais. As plantas, partindo de briófitas a angiospermas, têm sido testadas quanto ao potencial antineoplásico em investigações preliminares e diante de resultados que sinalizam a existência desta bioatividade, é dada uma atenção especial procedendo ao isolamento de compostos e realizando testes *in vitro* e *in vivo*, até que seja finalmente verificada a eficácia de seu efeito em sistemas corporais humanos. Neste caso, uma grande preocupação aponta no sentido de que a ação do produto natural sobre células saudáveis e neoplásicas a fim de que só haja comprometimento das células alteradas e que também os efeitos colaterais quimioterápicos sejam nulos ou minimizados.

Alguns pesquisadores têm realizado pesquisas antineoplásicas em tumores vegetais causados por *Agrobacterium tumefaciens* baseados na existência de semelhança entre mecanismos de formação de tumor em animais pelas bactérias *Bartonella henselae* e *Helicobacter pylori*. É uma triagem bastante singular que pode ou não ter um efeito promissor em humanos, mas é antes de tudo um indicativo para que se possa ir mais longe passando a

novas fases investigativas. Sarker *et al.* [42] testou partes aéreas de *Selaginella ciliaris* (Retz.), *Marsilea minuta* (L.) e *Thelypteris prolifera* (Retz.) em bioensaio com disco de batata exibindo crown-gall tumors. Antes, porém, verificaram se as espécies demonstravam efeito antibacteriano (250.000 ppm) contra *A. tumefaciens*, e após constatarem nenhuma atividade, deram continuidade aos testes onde verificaram que as mesmas inibiram o tumor com percentuais de 80%, 82,32% e 75,68%, respectivamente, em 1.000 ppm. Os estudos revelam que existem fitoconstituintes ativos nas plantas capazes de interromper o ciclo da divisão celular; entretanto, ainda há um longo percurso até se saber quais são os metabólitos responsáveis por esta ação antitumoral.

Porém, em estudos mais específicos *in vitro* realizado por Lai *et al.* [43], linhagens celulares de adenocarcinoma humano do cólon HT-29, carcinoma humano do cólon HCT-116, adenocarcinoma de mama MCF-7, leucemia humana K562 e de fígado Chang foram usadas em ensaios de citotoxicidade, nos quais foram testadas frações obtidas do extrato metanólico da samambaia *Blechnum orientale* Linn. Uma interessante atividade citotóxica foi demonstrada pelas frações acetato de etila, butanólica e aquosa contra o adenocarcinoma de células do cólon HT-29. A curcumina foi usada como controle positivo por ser amplamente empregada em ensaios clínicos para quimioprevenção do câncer de cólon, e células Chang foram utilizados em estudos de citotoxicidade para testar os efeitos de drogas/agentes sobre as células normais. A fração butanólica não exibiu efeito citotóxico contra as células normais, o que significa que compostos presentes nesta fração poderão ser utilizados em quimioterapias de câncer de cólon. Uma triagem por compostos fenólicos registrou a presença de terpenóides, flavonóides e taninos, estes últimos em maior abundância nas frações butanólica e aquosa. O isolamento de componentes da fração butanólica desta samambaia em testes complementares poderá levar à elucidação de substâncias ativas contra as células tumorais, algo de extrema importância na luta contra o câncer do cólon.

Compostos isolados têm sido investigados quanto à atividade quimiopreventiva do câncer. De raízes secas da samambaia ornamental *Neochheiropteris palmatopedata* (Baker) foram isolados seis glicosídeos kaempferol (palmatosídeos A, B e C, multíflorinas A e B e afzelina) e estes foram ensaiados quanto à capacidade de inibir o TNF- α induzido por atividade NF-kB, o óxido nítrico (NO), produção de aromatase, redutase quinona 2 (QR-2) e a atividade de COX-1/-2, fatores importantes para o desencadeamento de processos cancerígenos. Os palmatosídeos A e B apresentaram inibição de TNF- α induzida por atividade de NF-kB, com valores de IC₅₀ de 15,7 e 24,1 μ M, respectivamente e apenas a multíflorina B apresentou percentuais acima de 50% de inibição da produção de óxido nítrico.

O palmatosídeo A foi o único composto que mostrou inibição das enzimas COX acima de 50% a 10 µg/mL. Na inibição da aromatase, a multiflorina A foi mais ativo com um valor de IC₅₀ de 15,5 µM e o melhor desempenho na inibição da enzima QR2 foi demonstrada por afzelina na concentração de 11,5 µg/mL. Neste estudo realizado por Yang *et al.* [44] foi avaliada também a citotoxicidade em cultura de células Hepa1c1c7 de hepatoma e MCF-7 de carcinoma da glândula mamária e os compostos não apresentaram efeito inibitório significativo no crescimento celular. Os resultados sugerem que a samambaia exerce efeito quimiopreventivo através de seus compostos e isto deve ser investigado com maior profundidade por conta da habilidade demonstrada de atingir alvos específicos sem causar efeitos citotóxicos.

Além do kaempferol, outros constituintes da classe dos flavonóides têm apresentado atividade quimiopreventiva e anticarcinogênica. A samambaia *Thelypteris torresiana* tem sido exaustivamente estudada pelo fato de ter apresentado atividade anticancerígena quando testada sob a forma de extrato. Desde então, pesquisadores tem continuamente isolado e testado seus compostos na busca do fitoconstituente responsável pelo efeito. O alvo principal das pesquisas tem sido os flavonóides, isto porque têm apresentado potencial quimiopreventivo e quimioterápico em tratamentos antineoplásicos com atividades que variam de antiproliferativas, interrupção do ciclo celular a indução de apoptose. O flavonóide protoapigenona foi testado por Chang *et al.* [45] em células de câncer de próstata (linhagem LNCaP) e conseguiu inibir a proliferação celular, induzir a apoptose por anexina V-FITC (labeling phosphatidylserine) e a progressão do ciclo celular, além de também inibir a ativação da p38 MAPK e JNK1 / 2 que regulam os processos de crescimento, proliferação e diferenciação celular. Protoapigenone suprimiu o crescimento de células cancerígenas da próstata tanto *in vitro* como *in vivo*, sem hepatotoxicidade significativa, nefrotoxicidade e toxicidade hematológica. Este composto já havia sido testado por Lin *et al.* [46], em células neoplásicas hepáticas e da mama (Hep G2, Hep 3B, MCF-7, A549, e MDA-MB-231) exibindo considerável atividade anti-tumoral. Em face disto, este flavonóide isolado de samambaia poderá vir uma grande alternativa para tratamentos quimioterápicos contra neoplasias.

Atividade antiviral

A pesquisa de novas substâncias com potencial antimicrobiano nos dias atuais é crescente e necessária, sobretudo, devido ao desenvolvimento da resistência de agentes infecciosos a drogas sintéticas amplamente utilizadas. Neste sentido, os compostos naturais,

principalmente flavonóides, têm sido muito importantes para a descoberta de agentes antivirais.

De acordo com a literatura, o gênero *Selaginella* apresenta inúmeras propriedades medicinais, contendo vários metabólitos secundários tais como: alcalóides, terpenóides e fenóis. Além destes, possui também, uma grande variedade de diflavonoides, uma forma dimérica de flavonóides, ainda bastante pouco estudados. Os diflavonóideis, apresentam diversas propriedades medicinais, principalmente antioxidante, anti-câncer, anti-inflamatória e antimicrobiana (antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária). O gênero *Selaginella* é usado amplamente na medicina tradicional Chinesa (MTC) como forma complementar e alternativa aos medicamentos sintéticos tradicionais, sendo a espécie *S. tamariscina* a espécie mais utilizada. O gênero *Selaginella* possui 13 compostos bioativos estudados até o momento, especialmente, amentoflavona e ginkgetina [47]. Esse metabólito foi obtido pela primeira vez a partir da espécie *Selaginella sinensis* e estudado isoladamente por Ma *et al.* [48]. Em 2009 o pesquisador Hafidh *et al.* [49] divulgou que a amentoflavona apresenta atividade antiviral potente contra o vírus sincicial respiratório (RSV), exibindo uma IC_{50} de 5,5 $\mu\text{g/mL}$. Neste estudo, a quantidade de amentoflavona de nove espécies de *Selaginella* foi determinada por HPLC de fase reversa, e a espécie *S. sinensis* foi a que apresentou o maior teor possuindo 1,13% de amentoflavona.

Em outro estudo sobre o gênero *Selaginella*, Maly [50] isolou cinco compostos da espécie *Selaginella uncinata*. Dois destes compostos são novos glicosídeos Chromona, nomeados 5-hidroxi-2,6,8-trimetilchromona 7-O-beta-D-glucopiranosideo (uncinoside A) e 5-acetoxil-2,6,8-trimetilchromona 7-O-beta-D-glucopiranosideo (uncinoside B). Suas estruturas foram elucidadas por métodos espectroscópicos incluindo técnicas tridimensionais como RMN. Os outros três compostos foram identificados como 8-metil eugenitol, amentoflavona e hinokiflavona. Os glicosídeos, Uncinosideo A e B, mostraram potente atividade antiviral frente ao vírus sincicial respiratório (VSR) exibindo uma IC_{50} de 6.9 e 1.3 $\mu\text{g/mL}$ e atividade antiviral moderada frente ao vírus tipo 3 parainfluenza (PIV 3), exibindo uma IC_{50} de 13,8 e 20,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Alguns trabalhos têm focado a descoberta de produtos naturais contra o vírus HIV. Este vírus é o agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), e tem causado graves problemas de saúde pública, pois a cada dia o número de pessoas infectadas pelo HIV e doentes de SIDA continua aumentando na população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. Pesquisas recentes têm observado que a enzima Transcriptase Reversa (TR) do HIV tem demonstrado ser muito importante para a replicação viral, pois cada

função catalítica da RT interfere na produção do vírus. Esta enzima exibe atividade RNA-dependente DNA polimerase, DNA dependente DNA polimerase e ribonucleases H [51].

Até o momento, duas classes de drogas inibidoras, análogas e não-análogas de nucleotídeos, têm sido desenvolvidas; porém, sua utilização para o tratamento de pacientes com AIDS é limitada devido sua toxicidade e surgimento de vírus cada vez mais resistentes. O desenvolvimento e produção de medicamentos inibidores seletivos para o HIV RT é pertinente ao contexto e com este objetivo, Min *et al.* [51], realizou uma triagem *in vitro* de 50 espécies de plantas medicinais coreanas e chinesas na busca de potencial antiviral, sendo descoberto neste que o rizoma de *Dryopteris crassirhizoma* Nakai (Aspidiaceae) inibia sensivelmente a atividade RNase H de HIV-1 RT, tendo o extrato metanólico exibido uma IC₅₀ de 25 µg/mL. Segundo Min, este rizoma é conhecido na medicina chinesa por sua ação taenocida. As espécies do gênero *Dryopteris* são geralmente caracterizadas pela presença de derivados de floriglucinol, tais como ácidos flavaspícos, ácidos triflavaspídicos, dryocrassinos e albaspídicos e ácidos filixícos e além disso, glicosídeos e kaempferol foram isolados a partir das espécies do gênero *Dryopteris*.

Atividade antiparasitária

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que apresenta três tipos de manifestações. Estima-se que a doença cause 1,6 milhões de novos casos, dos quais cerca de 500.000 é visceral e 1,1 milhões cutânea ou mucocutânea, de acordo com informações disponibilizadas pela Organização Mundial de Saúde [52]. A distribuição da leishmaniose tem se expandido ao longo dos anos, atingindo países onde antes sua ocorrência não era registrada, o que é muito preocupante tendo em vista as poucas opções de agentes terapêuticos e ainda o fato de ter sido observado *Leishmania* um potencial de resistência à drogas.

Os trabalhos científicos envolvendo pesquisa de atividade leishmanicida de pteridófitas entretanto, ainda são bastante escassos. Um dos poucos estudos produzidos nesta área é o do pesquisador El-On [53] que em 2009 divulgou que o extrato metanólico de *Pteris vittata* possui atividade leishmanicida moderada (25%-50%).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde [52], estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o parasita *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo. Este protozoário é o causador da doença de Chagas que na fase inicial apresenta sintomatologia de inexistente a leve, até que se passe à fase crônica causando distúrbios

sistêmicos, culminado com o comprometimento progressivo do músculo cardíaco, o que pode levar à morte.

Nos últimos anos, a atividade contra protozoários tem sido avaliada para diversos produtos naturais, sendo o gênero *Selaginella* muito estudado para este fim. Atualmente é conhecido que mais de 60 espécies de *Selaginella* ocorrem na Índia, sendo pouco usadas na medicina popular. Segundo a literatura, este gênero é rico em diflavonóides, uma forma dimérica de flavonóides.

Em um estudo realizado por Olaf *et al.*, [54], espécies de *Selaginella* foram avaliadas para atividade antiprotozoária. Neste trabalho, extrato etanólico e frações de *Selaginella bryopteris* de diferentes polaridades foram obtidos usando tolueno, acetato de etila, e butanol por partição líquido-líquido. Estes produtos naturais foram testados frente a *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma rhodesiense* STIB 900, *Trypanosoma cruzi* cepa tulahuen C2C4, *Leishmania donovani* cepa MHOM-ET-67 e *Plasmodium falciparum* K1. A fração acetato de etila mostrou elevada atividade e foi selecionada para isolamento de 11 compostos puros. De acordo com o trabalho, foi encontrada uma elevada atividade antimalarial para o composto 7'4'7-tri-O-metilamentoflavona que exibiu uma IC₅₀ de 0,26 µM. Este composto não mostrou atividade citotóxica significativa (IC₅₀ > 150 µM) frente a células L-6. Para avaliar a atividade in vivo frente ao protozoário *Plasmodium berghei*, foi realizada uma síntese parcial a partir da amentoflavona (diflavonóide) para produção do 7'4'7-tri-O-metilamentoflavona. Este semi-sintético foi testado na concentração de 50 mg/Kg e não apresentou atividade frente ao *Plasmodium berghei*. Uma forte atividade leishmanicida foi detectada no composto 2,3 dihidronokiflavona, apresentando uma (IC₅₀ de 1,6 µM), enquanto que para o *Trypanosoma* nenhuma atividade significativa foi observada (IC₅₀ > 12,5 µg/mL para o extrato).

A pesquisadora Esther del Olmo [55], em um ensaio preliminar na busca por novos compostos de origem natural, constatou que o ácido isonotholaenic, um estilbenóide, foi o componente principal do extrato diclorometano da samambaia *Notholaena nivea*. Este extrato obteve resultados bastante promissores frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, exibindo uma IC₅₀ de 30 µg/mL sendo semelhante ao benznidazole que possui IC₅₀ de 7,4 µg/mL. Curiosamente, a transformação do ácido isonotholaenic em piperidide dobrou sua potência em relação ao benznidazole. Com base em outros ensaios desta pesquisa, foi visto que estes compostos não são citotóxicos para células humanas normais. Portanto, eles representam estruturas importantes para o desenvolvimento de novos agentes contra a doença de chagas.

Atividade antioxidante

O equilíbrio de sistemas orgânicos pode ser caracterizado pela produção constante de radicais livres, que por sua vez, são neutralizados por mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Quando por alguma razão este equilíbrio é rompido e a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante, espécies altamente instáveis e reativas de oxigênio, nitrogênio ou enxofre, entre outras, poderão se ligar a moléculas orgânicas essenciais à vida como DNA, proteínas e lipídios, gerando conseqüências como mutações e outros tipos de danos estruturais e funcionais que podem induzir à morte celular. Doenças degenerativas como a de Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla, além de diversos tipos de doenças pulmonares e do sistema imune diabetes, cardiopatias, aterosclerose e também cânceres, são enfermidades que podem surgir em decorrência de danos causados por estresse oxidativo [56].

Substâncias antioxidantes são aquelas que, presentes em baixas concentrações, porém em concentrações superiores às oxidáveis, retardam ou inibem a ação destas, prevenindo ou reduzindo a extensão do dano oxidativo [57]. É sabido que produtos naturais possuem compostos que exibem esta capacidade e por este motivo, alimentos, temperos e plantas medicinais têm sido alvos de estudos sobre suas propriedades protetoras. Não obstante, diversas pesquisas têm mostrado o potencial antioxidante de pteridófitas como uma importante bioatividade deste grupo.

As samambaias medicinais *Blechnum orientale* L., *Dicranopteris linearis* (Burm.), *Cibotium barometz* (L.) J. Sam, *Acrostichum Aureum* L. e *Asplenium nidus* L. foram investigadas por Lai *et al.* [58] e todas demonstraram potencial antioxidante. Nos métodos de redução do radical livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e capacidade de reduzir íons férricos (FRP) as espécies demonstraram atividade seguindo a ordem em potencial decrescente: *B. orientale* \geq *D. linearis* > *C. barometz* > *A. aureum* > *A. nidus*. Esta mesma ordem foi também observada quanto à presença de compostos fenólicos, e a estes foi atribuída a capacidade antioxidante, já comprovada em tantos outros estudos. Na avaliação pelo método de branqueamento do β -caroteno (BCB), *D. linearis* se destacou com 99% de inibição da peroxidação lipídica. Em contradição à tendência observada nos demais ensaios, ao se avaliar a atividade quelante de íons ferrosos (FIC), as espécies mostraram baixa atividade, com exceção de *A. aureum* que exibiu um percentual de 58% (6,7 mg/mL). Os resultados evidenciam que estas plantas revelam um notável potencial protetor que poderá auxiliar sistemas orgânicos na defesa contra radicais livres.

Recentemente, um estudo realizado por Lai e Lim [59] rastreou quinze samambaias na busca de fontes antioxidantes naturais utilizando métodos como potencial de redução de ferro (FRP), redução (branqueamento) do β -caroteno (BCB) e redução do radical DPPH, conseguiu prospectar cinco espécies cujos extratos metanólicos exibiram forte capacidade de sequestrar radicais livres. Das espécies *Cyathea latebrosa* (Wall. ex Hook) Copel, *Cibotium barometez* (L.) J. Sm., *Drynaria quercifolia* (L.) J. Sm., *Blechnum orientale* L. e *Dicranopteris linearis* (Burm.), esta última demonstrou o potencial antioxidante mais alto sendo de 61% em 0,1 mg/mL e 99% em 0,7 mg/mL. Estes dados confirmam, portanto, o expressivo potencial de *Blechnum orientale* e *Dicranopteris linearis* anteriormente investigadas. Na pesquisa por compostos, fenólicos as cinco espécies foram as que se destacaram por apresentar altos teores, sinalizando, como no estudo anterior, que o efeito antioxidante das espécies provavelmente está relacionado à presença e à ação destes fitoconstituíntes.

Na procura por substâncias ativas capazes de se ligarem a espécies de radicais livres, alguns trabalhos têm ido um pouco mais além de ensaios com extratos, e assim, compostos isolados de espécies como *Cheilanthes anceps* Swartz e *Salvinia natans* L. foram avaliados quanto ao potencial antioxidante. Chowdhar [60] isolou seis flavonóides de *C. anceps* a partir da fração butanólica oriunda do extrato etanólico de folhas: (1) Kampferol-3-O- δ -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosideo-7-O- β -D-glucopiranosideo, (2) Quercetina 3-O- δ -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosideo-7-O- β -D-glucopiranosideo, (3) Quercetina-3-O- β -D-glucosil (1 \rightarrow 2)- β -D-galactosideo-7-O- β -D-glucosideo, (4) Quercetina-3-metil éter-5-O-glucosideo, (5) Kampferol-3-O-glucosideo e (6) Quercetina-3-O-glucosideo. Pelo ensaio de bioautografia em camada delgada e DPPH foi verificado que o potencial antioxidante seguia a seguinte ordem: 6 > 3 > 2 > 4, mostrando que glicosídeos de quercetina eram ativos, enquanto glicosídeos de kaempferol não exibiram atividade.

O efeito antioxidante de *S. natans*, uma samambaia aquática, foi observado por Srilaxmi [61] através de um ensaio *in vivo* utilizando ratos albinos Wistar com lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono CCl₄. Esta substância é um solvente industrial conhecido por sua hepatotoxicidade, causando estresse oxidativo e degeneração celular. Utilizando sistema de cromatografia em coluna, foi isolado o composto natansnin glicosídeo benzoílo, que em seguida foi ensaiado pelo método do DPPH, demonstrando um alto potencial antioxidante (60,6%) quando comparado ao controle positivo BHT (63,6%). Nos testes *in vivo*, os ratos foram intoxicados com CCl₄ e em seguida foram tratados com natansnin (20 mg / Kg de peso corporal). A leitura dos parâmetros demonstrou que ambas as doses diminuiram os danos causados pelo estresse oxidativo induzido e inibiu a expressão de proteínas

inflamatórias, além da apoptose celular. O efeito protetor verificado pode estar relacionado à atividade antioxidante do flavonóide natansnin. Dessa forma, o fato deste composto ter sido isolado de uma samambaia só reforça a importância das atividades biológicas deste grupo, como fontes de quimioconstituíntes de interesse clínico.

1. UM ESTUDO DE CASO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Lygodium venustum* SW. E *Pityrogramma calomelanos* (L.) LINK.

Introdução

Lygodium venustum (Figura 1) é uma samambaia da família Lygodiaceae que normalmente é vista crescendo em clareiras no interior da mata ou às margens de caminhos, em áreas perturbadas, podendo apresentar comportamento ruderal, sendo observada em terrenos baldios da zona urbana. A espécie caracteriza-se por apresentar pínulas com tamanhos diferentes, onde as proximais são lobadas e maiores que as demais. Por possuir raque volúvel, com forma adaptativa de cipó, especializa-se no hábito lianescente, sendo considerada, após atingir 50 cm de altura, uma exímia alpinista, enroscando-se e apoiando-se geralmente em cipós, madeiras mortas ou arbustos, chegando a atingir mais de 5 m de altura [61].

Figura 1: *Lygodium venustum* SW



Fonte: Flaviana Morais

A utilização de *L. venustum* como planta medicinal tem sido registrada na Mesoamérica por populações indígenas, entre outras, possuindo atividades antiséptica, fungicida e trichomonocida, sendo indicada para o tratamento de dermatoses, micoses e infecção [62]. É também usada no tratamento de desordens gastrointestinais e ginecóbstricas e como antiinflamatório pós-parto [63]. É utilizada como um dos componentes para o preparo tradicional da bebida de efeito alucinógeno, ayahuasca, entre os Sharanahua e os índios do alto do rio Purus na Amazônia Peruana [26]. No Brasil, é utilizada por afro-brasileiros em cultos místicos para banhos de limpeza, além de ser indicada na medicina popular para nervosismo e instabilidade emocional [64, 65].

Pityrogramma calomelanos (Figura 2) pertence à família Pteridaceae e apresenta distribuição subcosmopolita, sendo muito comum ser encontrada nos trópicos. Normalmente cresce em solo areno-argiloso de barrancos; como terrícola em solos muito encharcados, freqüentemente próxima da margem dos regatos ou do açude, exposta ao sol e com poucos indivíduos

Figura 2: *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.



Fonte: Flaviana Morais

P. calomelanos é conhecida pelos nomes populares de feto-branco, avenca-branca ou avenca-preta. A espécie se diferencia das outras da família por apresentar pinas equilaterais; pínulas ascendentes e pela presença de indumento farináceo branco, amarelo ou rosado na superfície abaxial da lâmina foliar [66,67, 68].

Na medicina popular é utilizada como planta ornamental e medicinal, sendo indicada como adstringente, analgésica, anti-hemorrágica, peitoral, depurativa, emenagoga, antigripal, anti-hipertensiva, antitérmico, antitussígeno e estimulante da circulação sanguínea, além de ser indicada para tratamento de distúrbios renais [69, 70, 71].

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante de extratos e frações das pteridófitas *L. venustum* e *P. calomelanos* e investigar a existência de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), determinando o seu percentual.

Material e métodos

Material vegetal

L. venustum e *P. calomelanos* foram coletadas no município de Crato, Ceará – Brasil, na encosta da Chapada do Araripe em uma localidade chamada Grangeiro (Figuras 3 e 4).

Foram produzidos extratos etanólicos e a partir destes foram obtidas as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e metanólica para *L. venustum* e hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica para *P. calomelanos*.

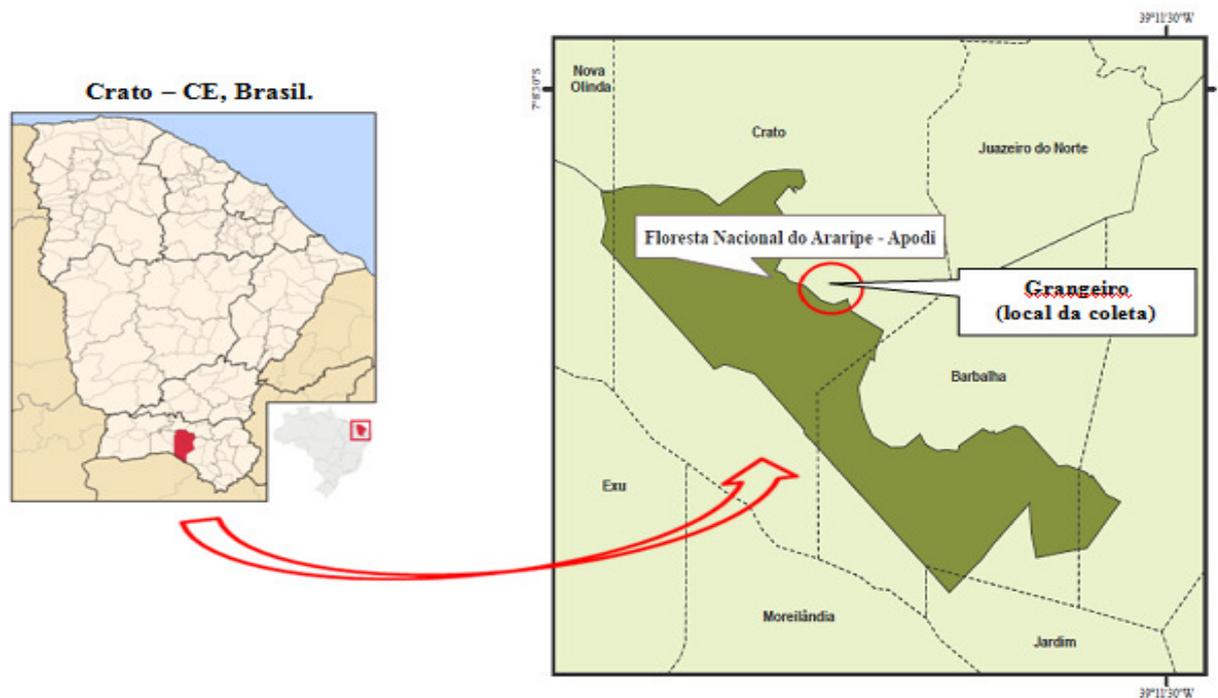
Prospecção química qualitativa

A análise fitoquímica qualitativa preliminar para detectar as presenças de classes de metabólitos secundários como taninos, flavonóides e alcalóides foi realizada seguindo um método de prospecção fitoquímica já descrito anteriormente [72].

Quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente usando coluna C₁₈ (4.6 mm x 250 mm) empacotada com partículas de diâmetro de 5µm; como fase móvel foi usada água contendo 2% ácido acético (A) e metanol (B), e a composição do gradiente foi: 5% de B até 2 minutos com mudança para 25%, 40%, 50%, 60%, 70% e 100% B, 10, 20, 30, 40, 50 e 80 minutos, respectivamente, seguindo o método descrito por Laghari [73] com pequenas modificações.

Figura 3: Mapas com localização da área de coleta de *Lygodium venustum* e *Pityrogramma calomelanos*.



Fontes: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ceara_Municip_Crato.svg, acesso em 15 de novembro de 2011; Centro de Processamento Remoto – Brasília – DF.

Figura 4: Área de coleta: Encosta da Chapada do Araripe-Apodi, no município do Crato, Ceará, Brasil.



Fonte: Flaviana Morais

As amostras (extratos e frações) foram analisadas, dissolvendo em etanol a uma concentração de 3 mg/mL. A presença de seis compostos fenólicos foi investigada: Ácidos Gálico, Clorogênico e Caféico e os flavonóides Quercetina, Rutina e Kampferol. A identificação destes compostos foi realizada comparando seu tempo de retenção e espectro de absorção UV com padrões de referência. A vazão foi de 0.6 mL/min, volume de injeção 40 µL e o comprimento de onda 254 nm para Ácido Gálico, 325 nm para Ácido Caféico e Clorogênicos, e 365 nm para Quercetina, Rutina e Kampferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas com filtro de membrana 0.45 µm (Millipore) e então, desgaseificado por banho ultra-sônico antes do uso. Soluções estoque de padrões de referência foram preparadas na fase móvel na HPLC em uma faixa de concentração de 0.020 – 0.200 mg/mL para Kampferol, Quercetina e Rutina; e 0.050 – 0.250 mg/ml para Ácidos Gálico, Caféico e Clorogênico. Os picos foram confirmados por cromatograma, comparando o seu tempo de retenção com padrões de referência e espectros DAD (200 para 400 nm). Curva de calibração para Ácido Gálico: $Y = 10523x + 1478.8$ ($r = 0.9999$); Ácido Caféico: $Y = 12765x + 1381.7$ ($r = 0.9995$); Rutina: $Y = 12691 - 1165.0$ ($r = 0.9998$); Quercetina: $Y = 13495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$) e Kampferol: $Y = 15692x - 1218.1$ ($r = 0.9997$). Todas as operações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

Avaliação da atividade antioxidante – DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotolorimétrico do 2,2-difenil,1-picrihidrazila (DPPH), segundo Choi *et al.* [74]. Foi utilizado o extrato bruto e as frações nas concentrações de: 1 a 500 µg/mL em etanol (2,5 mL). A 2,5 mL de cada amostra, foi adicionado 1 mL da solução de DPPH 0,3 Mm. As soluções permaneceram no escuro em temperatura ambiente e após 30 minutos, foram feitas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (Shimadzu- UV-1201) a 518 nm, onde o radical DPPH apresenta o máximo de absorção. Uma solução de DPPH (1 mL; 0,3 nM) em etanol (2,5 mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico como padrão (controle positivo), em concentrações que variavam de 1 a 100 µg/mL. O etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro, tendo como brancos as soluções testes de cada amostra (sem adição do DPPH), visando minimizar a interferência de componentes das amostras na leitura. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da atividade antioxidante seguiu a equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância das frações e do extrato bruto; $\text{Abs}_{\text{branco}}$ é a absorbância das frações e do extrato bruto sem adição do DPPH e $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorbância da solução de DPPH em etanol. Os testes foram realizados em duplicata com três repetições. Foi calculada a percentagem de inibição do radical DPPH e construído um gráfico de percentagem de inibição *versus* a concentração do extrato e das frações.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Diferenças foram estimadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida por teste de diferença significativa mínima (DSM). Valores de probabilidade inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

A Avaliação fitoquímica preliminar (screening) de *L. venustum* indicou a presença de fenóis, taninos, flavonóides e alcalóides. Para *Pityrogramma calomelanos* o screening do extrato revelou a presença de alcalóides, catequinas, chalconas, sapononas, flavonóides e fenóis. Estes compostos exercem importantes funções na defesa e conservação das espécies no meio ambiente.

Pelo método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível detectar e quantificar a presença de conteúdos fenólicos das espécies. Extrato e frações das samambaias revelaram a presença do ácido gálico^{A1} (tR = 17,83 min; pico 1), ácido clorogênico^{A2} (tR = 28,14 min; pico 2), ácido caféico^{A3} (tR = 34,09 min; pico 3), rutina^F (tR = 42,11 min; pico 4), quercetina^F (tR = 49,78 min; pico 5) e kaempferol^F (tR = 58,96 min; pico de 6) (Figuras 5 e 6), demonstrando portanto, que os produtos naturais em análise contêm flavonóides do grupo dos flavonóis^F e compostos fenólicos ácidos (derivado do ácido benzóico^{A1}, derivado do ácido fenilacrílico^{A2} e derivado do ácido cinâmico^{A3}, cujos percentuais estão dispostos nas tabelas 2 e 3.

Figura 5 – Perfil representativo de cromatografia líquida de alta eficiência da fração acetato de etila de *Lygodium venustum* FAELV (a); fração diclorometano de *L. venustum* FDMLV (b); extrato etanol de *L. venustum* EELV (c); fração metanólica de *L. venustum* FMLV (d) e fração hexânica de *L. venustum* FHLV (e). A detecção UV foi feita a 327nm. para ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), rutina (pico 4), quercetina (pico 5) e kampferol (pico 6).

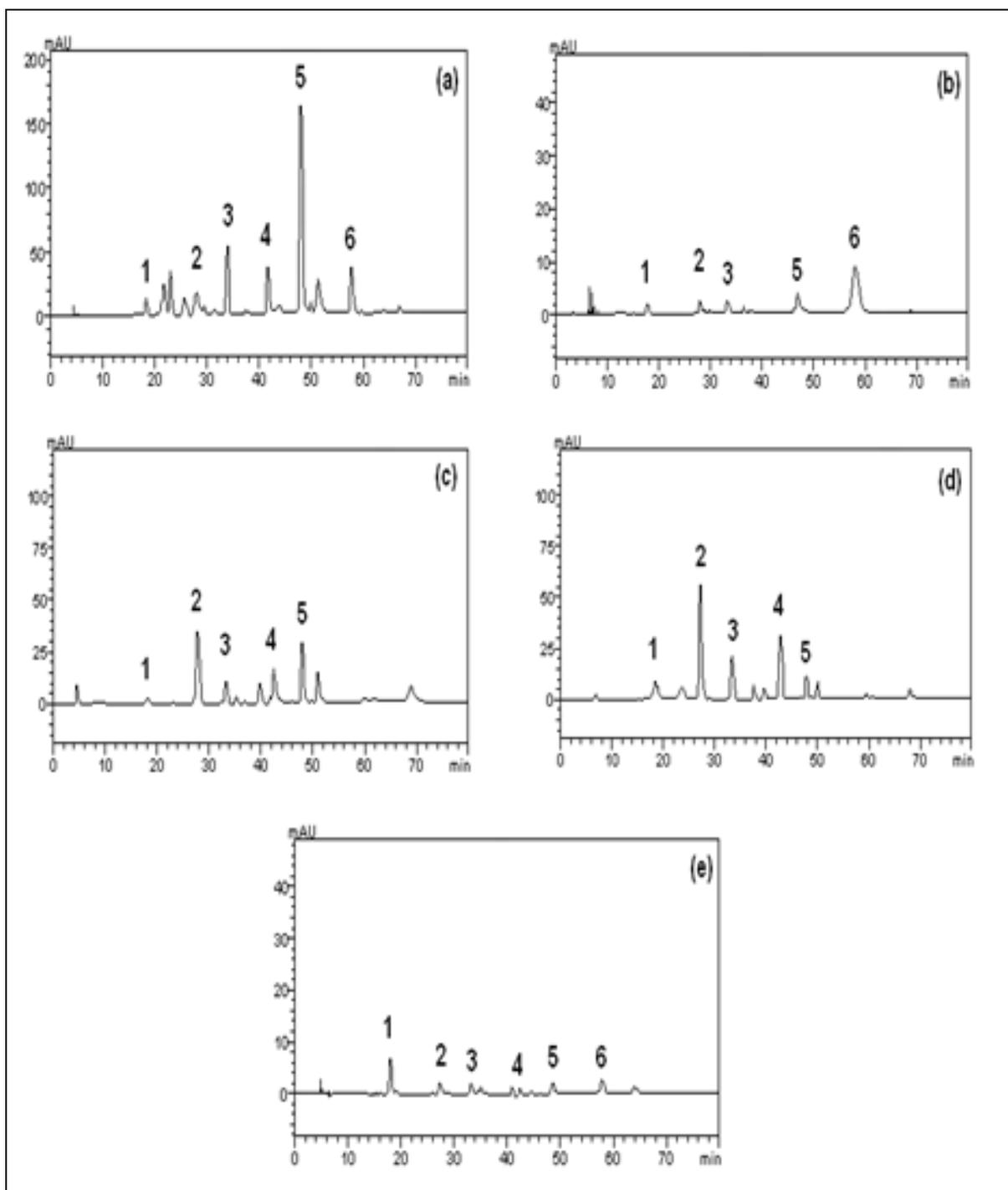


Figura 6 – Perfil representativo de cromatografia líquida de alta eficiência da fração acetato de etila de *Pityrogramma calomelanos* FAEPC (a); fração clorofórmica de *P. calomelanos* FCPC (b); extrato etanol de *P. calomelanos* EEPC (c); fração metanólica de *P. calomelanos* MFPC (d) e fração hexânica de *P. calomelanos* FHPC (e). A detecção UV foi a 327nm. para ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido cafeico (pico 3), rutina (pico 4), quercetina (pico 5) e kampferol (pico 6).

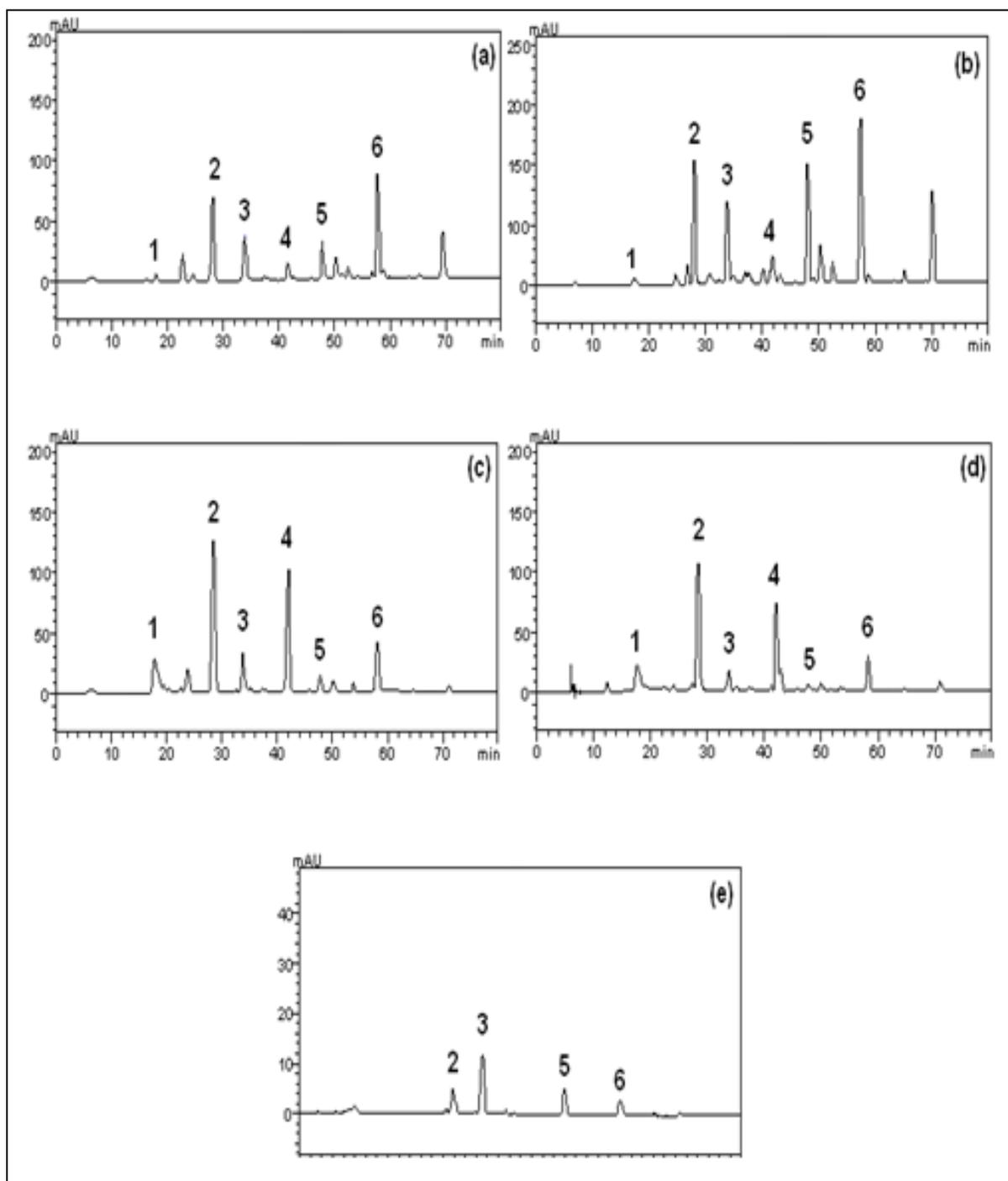


Tabela 2. Composição de compostos fenólicos e flavonóides em *Lygodium venustum* SW

Produto natural	Ácido gálico	Ácido clorogênico	Ácido cafèico	Rutina	Quercetina	Kampferol
FAELV	3.07 ± 0.01a	6.65 ± 0.03b	13.02 ± 0.04c	10.74 ± 0.02d	59.83 ± 0.01e	11.09 ± 0.01cd
FAELV %	0.30	0.66	1.30	1.07	5.98	1.10
FDCMLV	0.62 ± 0.03a	0.57 ± 0.01b	0.71 ± 0.01ab	-	0.80 ± 0.02b	3.93 ± 0.01c
FCMLV %	0.06	0.05	0.07	-	0.08	0.39
EELV	1.76 ± 0.01a	6.12 ± 0.01b	2.95 ± 0.03c	3.28 ± 0.01c	6.05 ± 0.05b	-
EELV %	0.17	0.51	0.29	0.32	0.60	-
FMLV	2.02 ± 0.03a	11.39 ± 0.02b	3.91 ± 0.03c	6.16 ± 0.01c	1.88 ± 0.01a	-
FMLV %	0.20	1.13	0.39	0.61	0.18	-
FHLV	1.53 ± 0.02a	0.70 ± 0.03b	0.64 ± 0.07b	0.44 ± 0.01c	0.75 ± 0.01b	0.86 ± 0.03d
FHLV %	0.15	0.07	0.06	0.04	0.08	0.09

Os resultados são expressos com média ± desvio padrão (DP) de três determinações médias, seguidas de letras diferentes de acordo com o teste de Tukey $p < 0.005$.

Tabela 3. Composição de compostos fenólicos e flavonóides em *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Produto natural	Ácido gálico	Ácido clorogênico	Ácido cafèico	Rutina	Quercetina	Kampferol
FCPC	2.65 ± 0.01a	18.09 ± 0.04b	11.48 ± 0.09c	5.73 ± 0.01a	9.38 ± 0.05c	22.52 ± 0.01d
FCPC %	0.26	1.70	1.14	0.57	0.93	2.25
EAFPC	2.08 ± 0.03a	36.49 ± 0.11b	27.13 ± 0.02c	9.22 ± 0.01d	36.89 ± 0.03b	48.03 ± 0.03e
EAFPC %	0.20	3.64	2.71	0.92	3.68	4.80
EEPC	10.07 ± 0.03a	33.52 ± 0.01b	8.19 ± 0.04a	28.03 ± 0.01c	5.44 ± 0.02d	12.75 ± 0.09a
EEPC %	1.00	3.35	0.81	2.80	0.54	1.27
MFPC	9.37 ± 0.05a	30.15 ± 0.02b	6.84 ± 0.01c	20.63 ± 0.01d	1.19 ± 0.03e	9.96 ± 0.01a
MFPC %	0.93	3.01	0.68	2.06	0.11	0.99
HFPC	-	1.05 ± 0.01a	4.59 ± 0.03b	-	1.14 ± 0.02a	0.93 ± 0.01a
HFPC %	-	0.10	0.45	-	0.11	0.09

Os resultados são expressos com média ± desvio padrão (DP) de três determinações médias, seguidas de letras diferentes de acordo com o teste de Tukey $p < 0.005$.

Os ácidos clorogênico e caféico, bem como o flavonóide quercetina tiveram sua presença registrada tanto nos extratos quanto nas frações de ambas as plantas. O ácido gálico e a rutina, entretanto, não foram encontrados na fração hexânica de *P. calomelanos* e a rutina estava ausente na fração diclorometano de *L. venustum*. O kaempferol também não constava na fração metanólica, nem no extrato etanólico desta espécie.

Compostos fenólicos e alguns de seus derivados são considerados agentes eficazes na prevenção da oxidação, inibindo ou eliminando radicais livres que comprometem os sistemas orgânicos. São muito reativos quimicamente e a maior parte destes encontra-se sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo solúveis em água e em solventes orgânicos polares [75].

Conforme os dados obtidos, observamos que o teor de compostos fenólicos totais presentes em *P. calomelanos* foi mais alto do que o encontrado em *L. venustum*. A quercetina, o flavonóide encontrado em maior quantidade em *L. venustum* apresentou maior afinidade com o solvente acetato de etila, o mesmo ocorrendo com o flavonóide kaempferol, composto majoritário de *P. calomelanos*. A fração acetato de etila foi, entre todos os produtos naturais testados, a que mais se destacou em conteúdo fenólico e os mais baixos teores foram verificados na fração hexânica em ambas as plantas. A ocorrência está de acordo com que foi preconizado por Simões *et al.* [75], ao afirmar que flavonóides são preferencialmente extraídos pelo solvente acetato de etila.

No screening por atividade antioxidante e compostos fenólicos realizado por Lai e Lim [59], *P. calomelanos* constou entre as quinze espécies avaliadas e seus dados mostraram que esta apresentou uma quantidade moderada de compostos fenólicos no extrato metanólico, porém os autores não chegaram a especificar quais e em que percentuais estavam presentes. Vale ressaltar que estes ensaios foram realizados utilizando extrato metanólico, enquanto nosso estudo avaliou, além do extrato (etanólico), frações com polaridades diferentes.

Esta foi a primeira triagem para compostos fenólicos em *L. venustum*. Jeetendra e Manish [76] analisaram diferentes tipos de extrato de outra espécie do mesmo gênero, *L. flexuosum*, e encontraram quantidades consideráveis dos compostos que variavam de acordo com o extrator utilizado, encontrando-se mais elevados quando extraídos pelo solvente metanol. Em *L. venustum* e *P. calomelanos*, a fração metanólica foi a segunda melhor fração extratora, só perdendo para acetato de etila, esta também considerada polar.

A capacidade de inibir a formação de radicais livres pode ser medida, entre outros métodos, pela descoloração da solução etanólica pelo DPPH. Segundo o método descrito por Choi, [74] A solução de DPPH absorve na banda de 518 nm que mede a intensidade da

coloração violeta. Na presença de boa atividade contra radicais livres ocorre descoloração [77].

A atuação do ácido ascórbico (conhecida substância antioxidante) ligando-se ao radical livre 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) é usada muitas vezes como parâmetro para avaliar o poder antioxidante de extratos e frações de plantas *in vitro* [78].

A IC₅₀ de extratos etanólicos e frações foram obtidos através da equação das retas $y = -0,7104x + 98,01$ $n = 6$ ($R = 0,9953$) e $y = -16,51\ln(x) + 112,25$ $n = 6$ ($R^2 = 0,8764$), respectivamente (Figuras 7 e 9). Foram considerados os quatro primeiros pontos da curva, resultando no IC₅₀ de ambas as pteridófitas. Para o ácido ascórbico o IC₅₀ foi estimado matematicamente a partir da primeira concentração utilizada (7,81µg/mL), que demonstrou atividade antioxidante próxima ou superior a 50%. Para o ácido ascórbico não foi possível demonstrar linearidade nas demais concentrações testadas. O ácido ascórbico, cuja atividade antioxidante é bastante documentada, apresentou um IC₅₀ de 17,64 e 8,47 µg/mL.

Em nosso estudo verificamos que entre todos os produtos analisados, os extratos etanólicos de *P. calomelanos* e *L. venustum* exibiram os melhores resultados para atividade antioxidante, apresentando respectivamente IC₅₀ nas concentrações de 43,4 µg/mL e 67,58 µg/mL (Figuras 8 e 10). Já no que dizem respeito às frações, as plantas divergiram em potencial de atividade uma vez que aquela que apresentou melhor desempenho em *P. calomelanos* foi a metanólica, enquanto a acetato de etila foi a que mais se destacou quanto a capacidade de seqüestrar radicais livres, entre todas as frações de *L. venustum*.

Este comportamento pode ser justificado devido à presença de compostos com propriedades polares nos extratos, como é o caso dos ácidos fenólicos e flavonóides, os quais possuem comprovada atividade antioxidante.

Figura 7. Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão); extrato etanólico de *Pityrogramma calomelanos* (EEPC); fração acetato de etila de *Pityrogramma calomelanos* (FAEPC); fração clorofórmica de *P. calomelanos* (FCPC); fração metanólica de *P. calomelanos* (MFPC) e fração hexânica de *P. calomelanos* (FHPC).

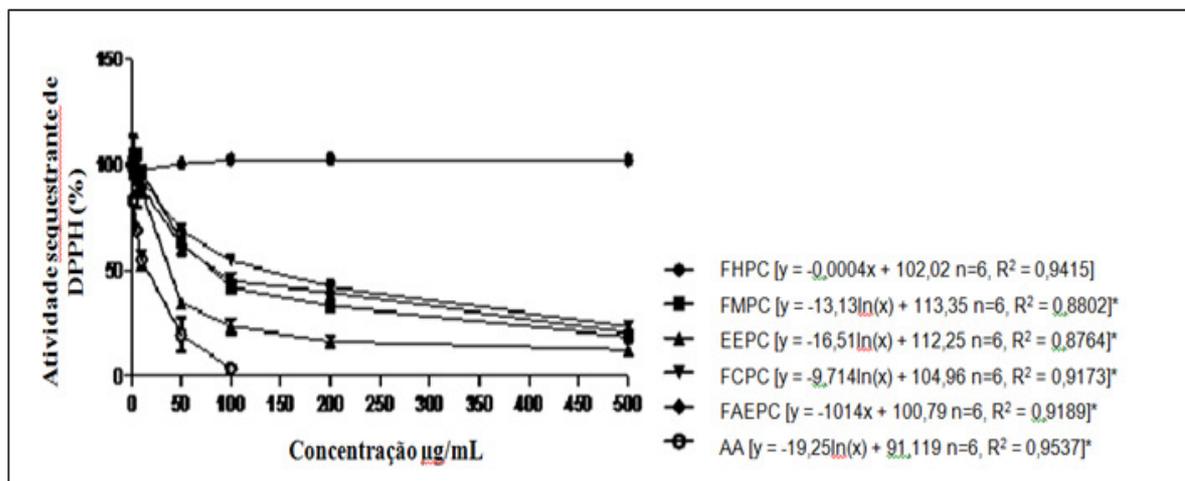


Figura 8. Gráfico do teste do seqüestro de radicais livres (DPPH) do ácido ascórbico (padrão); extrato etanólico de *Pityrogramma calomelanos* (EEPC); fração acetato de etila de *Pityrogramma calomelanos* (FAEPC); fração clorofórmica de *P. calomelanos* (FCPC); fração metanólica de *P. calomelanos* (MFPC) e fração hexânica de *P. calomelanos* (FHPC), bem como seus respectivos valores de EC₅₀.

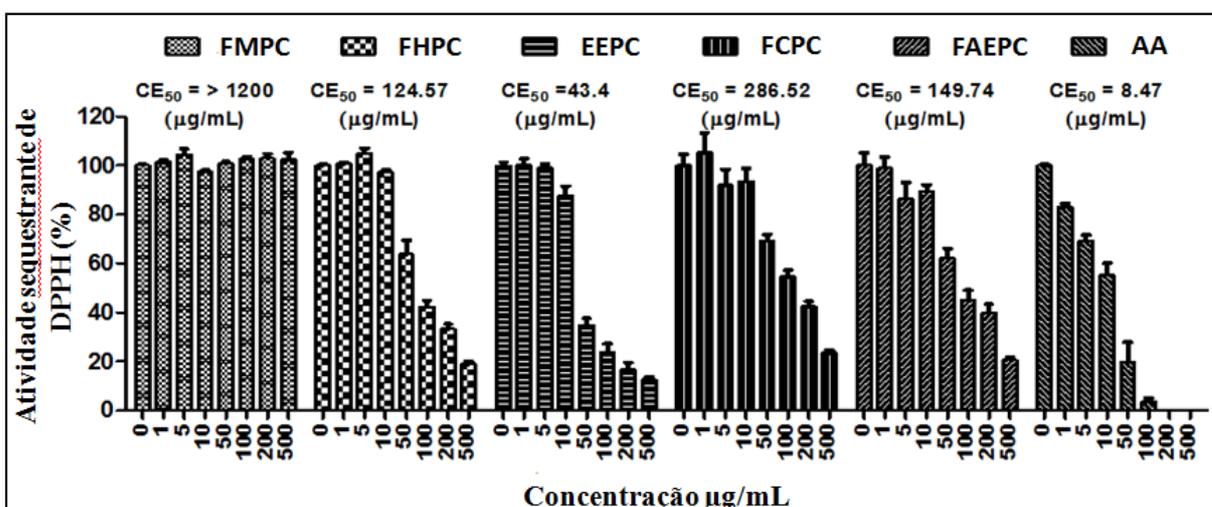


Figura 9. Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão); extrato etanólico de *Lygodium venustum* (EELV); fração acetato de etila de *Lygodium venustum* (FAELV); fração diclorometano de *L. venustum* (FDMLV); fração metanólica de *L. venustum* (FMLV) e fração hexânica de *L. venustum* (FHLV).

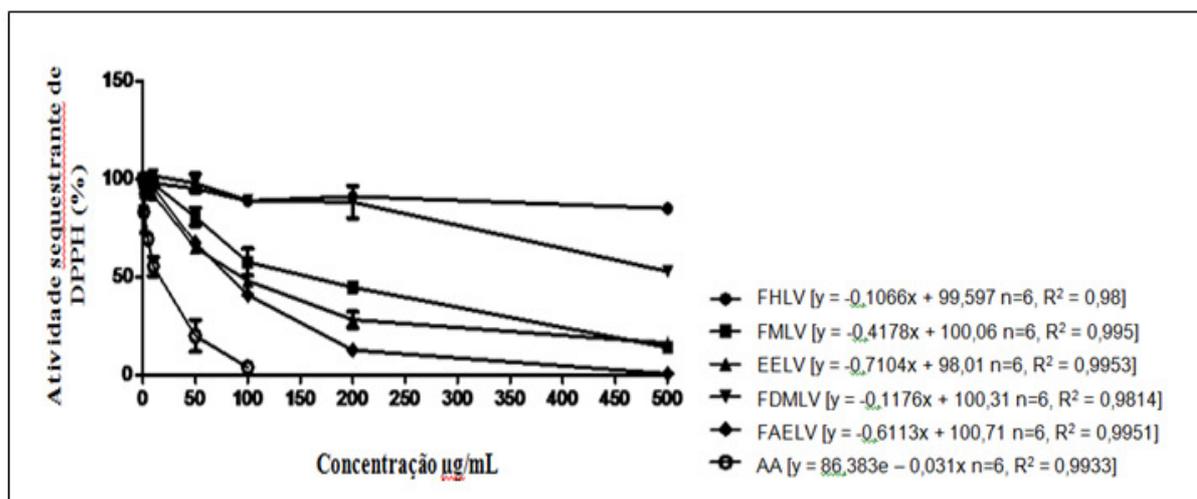
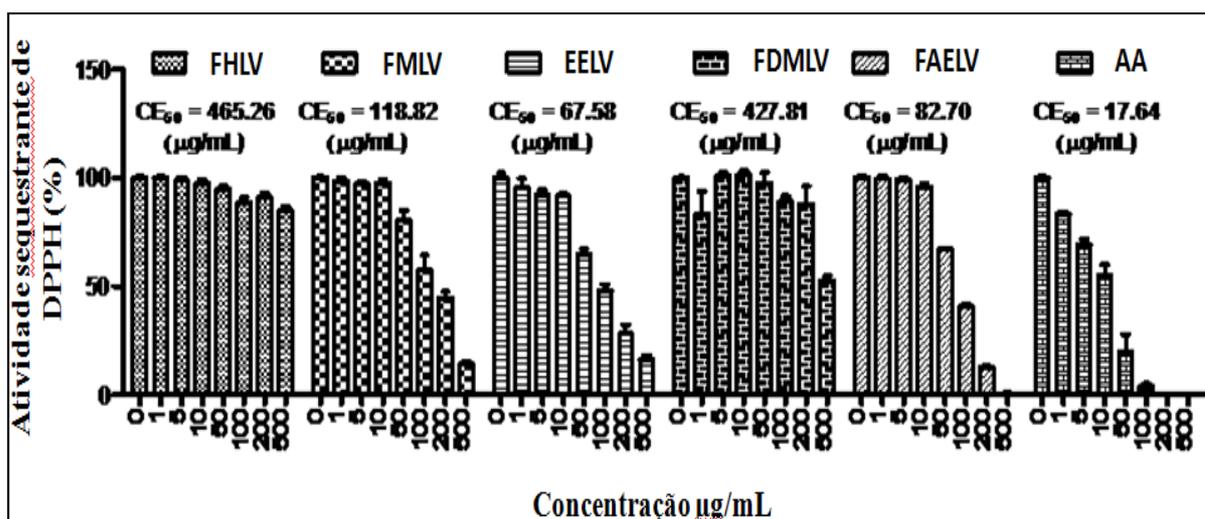


Figura 10. Gráficos do teste do seqüestro de radicais livres (DPPH) do ácido ascórbico (padrão); extrato etanólico de *Lygodium venustum* (EELV); fração acetato de etila de *Lygodium venustum* (FAELV); fração diclorometano de *L. venustum* (FDMLV); fração metanólica de *L. venustum* (FMLV) e fração hexânica de *L. venustum* FHLV, bem como seus respectivos valores de EC₅₀.



Diversas pesquisas têm evidenciado a presença de quercetina e kaempferol em samambaias e algumas delas inclusive têm demonstrado que estes compostos, alguns já isolados e apropriadamente descritos, contribuem efetivamente na captação de radicais livres e auxiliam na proteção de moléculas essenciais à vida, como foi o caso do estudo realizado por Chowdhary, anteriormente descrito.

O potencial antioxidante de ácidos fenólicos caféico e clorogênico já é conhecido [79], possuindo boa atividade antioxidante em sistemas lipídicos e na inibição da peroxidação celular.

Os resultados obtidos a partir deste estudo indicam que as espécies analisadas possuem compostos químicos capazes de capturarem radicais livres, e estas substâncias podem ser consideradas promissoras na busca de fármacos antioxidantes que previnem doenças decorrentes do estresse oxidativo. Vale ressaltar que o teste do DPPH não permite uma definição precisa dos efeitos antioxidantes por se tratar de uma metodologia *in vitro* [80]. É sabido que a atividade de extratos e frações de plantas não podem ser avaliadas apenas por um método [74]; portanto, torna-se necessário um estudo *in vivo* para determinar se estas espécies medicinais poderão ser utilizadas em escala industrial.

CONCLUSÃO

As pesquisas etnobiológicas têm demonstrado ao longo dos anos que diversas espécies de plantas são os produtos naturais mais utilizados pelas populações humanas. Sem dúvida alguma, a ampla biodiversidade da pteridoflora mundial fornece variedades de espécies ricas em compostos biologicamente ativos, que por sua vez, são capazes de restabelecerem a homeostase afetada por microrganismos, vírus e estresse oxidativo, entre outros fatores.

A relativa fragilidade dos sistemas orgânicos nos coloca diante de emergentes e reemergentes ameaças à saúde. Com isso, novos desafios surgem a cada vez que somos expostos a elas. A luta incessante pela vida, nossa e de outros seres, é uma guerra onde ambos os lados lançam mão dos mais variados artifícios e mecanismos de sobrevivência. Em cada batalha, os produtos naturais com suas estratégias de defesa, são colocados propositalmente a nosso favor, e a partir destes, “fórmulas mágicas”, os fármacos, são criadas com o objetivo de desarticularem as defesas dos agressores ou reequilibrarem moléculas e sistemas avariados, numa tentativa constante para o restabelecimento do bem-estar humano.

O estudo realizado para composição deste capítulo nos permitiu reconhecer o quanto as pteridófitas são necessárias às populações, contribuindo de forma efetiva para a cura ou

tratamento de enfermidades em localidades onde os sistemas de saúde são precários ou inexistentes. Porém, constatamos também, que as potencialidades deste grupo de vegetal estão ainda muito longe de serem plenamente conhecidas. O conhecimento empírico de fato tem sido o principal contribuinte na elucidação das propriedades biológicas das pteridófitas, entretanto, o conhecimento racional e científico, sem dúvida alguma, é um aspecto decisivo para a segurança de seu uso em terapias.

Em suma, diante de tantas atividades biológicas exibidas por diferentes e numerosas espécies de pteridófitas, uma quantidade maior de estudos ainda se faz necessário. Um olhar especial e criterioso deve ser dado a este grupo em investigações mais aprofundadas e também mais abrangentes, tendo em vista a sua abundância em biodiversidade, ampla distribuição mundial em regiões propícias e, evidentemente, seu uso pelas populações desde tempos antigos onde apenas se poderia contar com a riqueza do seu extrato bruto.

REFERÊNCIAS

1. Pammel, LH. A Manual of Poisonous Plants - Chiefly of Eastern North America with Brief Notes on Economic and Medical Plants and Numerous illustrations. The Torch Press Cedar Rapids, 1911, p. 323-325.
2. Uddin, MG; Mirza, MM; Pasha, MK. The medicinal uses of pteridophytes of Bangladesh. Journal Plant Taxonomy, 1998, v. 5, n. 2, p. 29-41.
3. Kimura, K; Noro, Y. Pharmacognostical studies on Chinese drug "Gu-sui-bu". I. consideration on "gu-sui-bu" in old herbals (Pharmacognostical studies on fern drugs XI). Syoy - akugaku Zasshi, 1965, v. 19, p. 25-31.
4. Benerjee, RD; Sen, SP. Antibiotic activities of Pteridophytes. Ec. Botany, 1980, v. 34, n. 2, p. 284-298.
5. Dixit, RD; Vohra, JN. A Dictionary of the Pteridophytes of India (Flora of India Series 4) Botanical Survey of India Publication, Department of Environment, Government of India, Botanical Garden, Howrah, 1984, p. 1-177.
6. Kaushik, P. Ethnobotanical Importance of Ferns of Rajasthan: Indigenous Medicinal Plants. Today and Tomorrow Printers and Publication, New Delhi, 1998, p. 61-66.
7. Nayar, BK. Medicinal ferns of India. Bulletin of the National Botanic Gardens, 1957, n. 58, p. 1-38.
8. Hodge, WH. Fern food of Japan and the problem of toxicity. American Fern Journal, 1973, n. 63, p. 77-80.
9. Dixit, RD. Ferns - a much neglected group of medicinal plants. III. Journal Research India Medical, 1975, v. 10, n. 2, p. 74-90.
10. Ghosh, SR; Ghosh, B; Biswas, A and Ghosh, RK. The Pteridophytic Flora of Eastern India. Flora of India Series 4. Botanical Survey of India, 2004, v. 1, p. 1-591.
11. Prado, J; Sylvestre, LS. As samambaias e licófitas do Brasil. In: Forzza, RC. *et al.* Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, 2010; p. 69-74.

12. Tryon, RM; Tryon, AF. Ferns and Allied Plants, with Special Reference to Tropical America. Berlin: Springer-Verlag; 1982.
13. Pryer, KM; Schuettpelz, E.; Wolf, PG; Schneider, H; Smith, AR; Cranfill, R. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. American Journal of Botany, 2004, v. 91, n. 10, p. 1582–1598.
14. Smith, AR.; Pryer, KM.; Schuettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H.; Wolf, PG. A Classification for Extant Ferns. Taxon, 2006, v. 55, n. 3, p. 705-731.
15. Pryer, KM; Schneider, H; Smith, AR; Cranfill, R; Wolf, PG; Hunt, JS; Sipes, SD. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. Nature, 2001, v. 409, p. 618-622.
16. Smith, AR; Pryer, KM; Schuettpelz, E; Korall, P; Schneider, H.; Wolf, PG. Fern Classification. In: T.A. Ranker; C.H. Haufler. Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes. Cambridge: Cambridge University Press, 2008; p. 417-467.
17. Moran, RC. Diversity, biogeography, and floristics. In: Ranker, TA; Haufler, CH. Biology and evolution of ferns and lycophytes. Cambridge: Cambridge University Press, 2008; p. 367-394.
18. Pietrobon, MR; Maciel, S; Costa, JM; Souza, MGC; Trindade, MJ; Fonseca, MSS. Licófitas ocorrentes na Floresta Nacional de Caxiuanã, estado do Pará, Brasil: Lycopodiaceae e Selaginellaceae. Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais, Belém, 2009, v. 4, n. 1, p. 37-45.
19. Bateman, RM. An overview of Licophyte phylogeny. In: Camus, JM.; Gibby, M.; Johns, RN. Pteridology in perspective. Kew: Royal Botanical Gardens, 1996; p. 405-415.
20. Kenrick, P; Crane, PR. The origin and early evolution of plants on Land. Nature, 1997, v. 389, p. 33-39.
21. Holttum, RE. The ecology of tropical pteridophytes. In: Veerdorn, F. Manual of Pteridology. Amsterdam: The Hague Martinus Nijhoff, p. 420-450, 1938.
22. Ribas, RP; Miguel, LA. Extração e comercialização de folhagens ornamentais da Mata Atlântica: o caso da verdes (*Rumohra adiantiformis*) no RS. RER, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, 2004, p. 575-596.

23. Santos, MG; Sylvestre, LS. Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta botânica brasílica*, 2006, v. 20, n. 1, p. 115-124.
24. Schmitt, JL; Schneider, PH; Windisch, PG. Crescimento do cáudice e fenologia de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no sul do Brasil. *Acta botânica brasílica*, 2009, v. 23, n. 1, p. 282-291.
25. FUNDECI - Gendered Access: Commodity Chain Analysis of Non-timber Forest Products from Laguna de Apoyo Nature Reserve, Nicaragua, Managua, Nicaragua: WIDTech/USAID; 2002.
26. Rivier, L; Lidgren, JE. "Ayahuasca: the South American hallucinogenic drink. An ethnobotanical and chemical investigation", *Economic Botany*, 1972, v. 26, n.2, p. 101-129.
27. Silva, VA; Andrade, LHC. Etnobotânica Xucuru: espécies místicas. *Biotemas*, 2002, v. 15, n. 1, p. 45-57.
28. Upreti, K; Jalal, JS; Tewari, LM; Joshi, GC; Pangtey, YPS, Tewari, Geeta. Ethnomedicinal uses of Pteridophytes of Kumaun Himalaya, Uttarakhand, India. *Journal of American Science*, 2009, v. 5, n. 4, p. 167-170.
29. Srivastava, K. Ethnobotanical Studies of Some Important Ferns. *Ethnobotanical Leaflets*, 2007, v. 11, p. 164-172.
30. Fenwick, GR. *Bracken (Pteridium aquilinum) - toxic effects and toxic constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1989, v. 46, n. 2, p. 147-173.
31. Karthik, V; Raju, K; Ayyanar, M; Gowrishankar, K; Sekar, T. Ethnomedicinal uses of pteridophytes in Kolli Hills, Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. *Journal of Natural Product Plant Resource*, 2011, v. 1, n. 2, p. 50-55.
32. Kumari, P; Otaghvari, AM; Govindaparyi, H; Bahuguna, YM; Uniyal, PL. Some ethnomedicinally important pteridophytes of India. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2011, v. 1, n. 1, p. 18-22.
33. Benjamin, A; Manickam, VS. Medicinal pteridophytes from the Western Ghats. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 2007, v. 6, n. 4, p. 611-618.

34. Thomas, T. Preliminary Antibacterial and Phytochemical Assessment of *Osmunda regalis* L. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 2011, v. 2, n. 1, p. 559-562.
35. Parihar, P.; Parihar, L.; Bohra, A. *In vitro* antibacterial activity of fronds (leaves) of some important pteridophytes. Journal of Microbiology and Antimicrobials, 2010, v. 2, n. 2, p. 19-22.
36. Singh, M; Singh, N; Khare, PB; Rawat, AKS. Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. Journal of Ethnopharmacology, 2008, v. 115, n. 2, p. 327-329.
37. Rani, D; Khare, PB; Dantu, PK. *In vitro* antibacterial and antifungal properties of aqueous and non-aqueous frond extracts of *Psilotum nudum*, *Nephrolepis biserrata* and *Nephrolepis cordifolia*. Indian Journal of pharmaceutical sciences, 2010, v. 72, n. 6, p. 818-822.
38. Ghosh, PG; Mukhopadhyay, R; Gupta, K. Antifungal activity of the crude extracts and extracted phenols from gametophytes and sporophytes of two species of *Adiantum*. Taiwania, 2005, v. 50, n. 4, p. 272-283.
39. Dalli, AK; Saha, G; Chakraborty, U. Characterization of antimicrobial compounds from a common fern, *Pteris biaurita*. Indian Journal of Experimental Biology, 2007, v. 45, p. 285-290.
40. Lee, J; Choi, Y; Woo, E-R, Lee, DG. Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, v. 379, n. 3, p. 676-680.
41. Ruiz-Bustos, E; Velazquez, C; Garibay-Escobar, A; García, Z; Plascencia-Jatomea, M; Cortez-Rocha, MO; Hernandez-Martínez, J; Robles-Zepeda, RE. Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. Journal of Medicinal Food, 2009, v. 12, n. 6, p. 1398-1402.
42. Sarker, AQ; Mondol, PC; Alam, J; Parvez, MS; Alam, F. Comparative study on antitumor activity of three pteridophytes ethanol extracts. Journal of Agricultural Technology, 2011, v. 7, n. 6, p. 1661-1671.
43. Lai, HY; Lim, YY; Kim, KH. *Blechnum Orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2010, 10:15.

44. Yang, JH; Kondratyuk, TP; Marler, LE; Qiu, X, Choi, Y; Cao, H; Yu, R; Sturdy, M; Pegan, S; Liu, Y; Wang, L; Mesecar, AD; Breemen, RBV; Pezzuto, JM, Fong, HHS; Chen, Y; Zhang, H. Isolation and evaluation of kaempferol glycosides from the fern *Neocheiropteris palmatopedata*. *Phytochemistry*, 2010, v. 71, n. 5-6, p. 641–647.
45. Chang, HL; Wu, YC; Su, JH; Yeh, YT; Yuan, SSF. “Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase 1/2,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008, v. 325, n. 3, p. 841–849.
46. Lin, AS; Chang, FR; Wu, CC; Liaw, CC; Wu, YC. New Cytotoxic Flavonoids from *Thelypteris torresiana*. *Planta Med*, 2005, v. 71, p. 867-870.
47. Ahmad, DS. Review: Natural products from genus *Selaginella* (Selaginellaceae). *Bioscience*, 2001, v. 3, n. 1, p. 44-58.
48. Ma, SC; But, PP; Ooi, VE; He, YH; Lee, SF; Lin, RC. Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, v. 24, p. 311.
49. Hafidh, RR; Abdulmir, AS; Jahanshiri, F; Abas, F; Bakar, FA; Sekawi, Z. Asia is the Mine of Natural Antiviral Products for Public Health. *The Open Complementary Medicine Journal*, 2009, v. 1, p. 58-68.
50. Ma, LY; Ma, SC; Wei, F; Lin, RC; But, PP; Lee, SH; Lee, SF. Uncinoside A and B, two new antiviral chromone glycosides from *Selaginella uncinata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, v. 11, n. 51, p. 1264-7.
51. Min, BS; Tomiyama, M; Ma, CM; Nakamura, N; Hattori, M. Kaempferol Acetylramnosides from the Rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and Their Inhibitory Effects on Three Different Activities of Human Immunodeficiency Virus-1 Reverse Transcriptase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, v. 5, n. 49, p. 546-550.
52. World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2010.
53. El-On, J; Ozer, L; Gopas, J; Sneir, R; Enay, H; Luft, N; Davidov, G; Golan-Goldhirsh, A. Antileishmanial activity in Israeli plants. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2009, v. 4, n. 103, p. 297-306.

54. Olaf, K; Rumalla, CS; Marcel, K; Armin, P; Silke,B; Appa, R; Wolfgang, S. Antiplasmodial and leishmanicidal and activity of biflavonoids from India *Selaginella bryopteris*. *Phytochemistry Letters*, 2008, v. 1, p. 171-174.
55. Esther, DO; Marlon, GA; Jose, LLP; Victoria, M; Eric, D; Arturo, SF. Leishmanicidal Activity of Some Stilbenoids and Related Heterocyclic Compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, v. 11, p. 2123–2126.
56. Bianchi, MLP; Antunes, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição, Campinas*, 1999, v. 12, n. 2, p. 123-130.
57. Halliwell, B. Free radical and antioxidant a personal view. *Nutrition Reviews*, 1994, v. 52, n.8, p. 253-261.
58. Lai, HY; Lim, YY; Tan, SP. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2009, v. 73, n. 6, p. 1362-1366.
59. Lai, HY; Lim, YY. Antioxidant Properties of Some Malaysian Ferns. 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering IPCBEE. Singapore: IACSIT Press, 2011, v. 20.
60. Chowdhary, S; Verma, DL; Pande, R; Kumar, H. Antioxidative properties of flavonoids from *Cheilanthes anceps* Swartz. *Journal of American Science*, 2010, v. 6, n.5, p. 203-207.
61. Mehlreter K. Leaf phenology of the climbing fern *Lygodium venustum* in a Semideciduous Lowland Forest on the Gulf of Mexico, *American Fern Journal*, v. 96, n. 1, p. 21–30, 2006.
62. Duke, JA. *Duke's Handbook of Medicinal plants of Latin America*. New York: CRC Press Taylor & Francis group, 2008; 832 p.
63. Argueta, A; Cano, L; Rodarte, M. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*, vol. I–III. Instituto Nacional Indigenista, Mexico City, 1994.
64. Rodrigues, E; Tabach, R; Galduróz, JCF; Negri, G. Plants with possible anxiolytic and/or hypnotic effects indicated by three Brazilian cultures — Indians, Afro-Brazilians, and river-dwellers. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2008, v. 35 (C), p. 549-595.

65. Albuquerque, U; Barros, ICL; Chiapetta, AA. Pteridófitas utilizadas nos cultos afro-brasileiros em Recife – PE: um estudo etnobotânico, *Biológica Brasílica*, 1997, v. 7, p. 23-30.
66. Moran, RC. *Pityrogramma* Link. In: G. Davidse *et al.* Flora Mesoamericana. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1995, p. 137-140.
67. Prado, J. Flora da Reserva Ducke, Amazonia, Brasil: Pteridophyta - Blechnaceae, *Rodriguesia*, 2005, v. 56, n. 86, p. 33-34.
68. Pietrobon, MR; Barros, ICL. Pteridófitas de um remanescente de Floresta Atlântica em São Vicente Férrer, Pernambuco, Brasil: Pteridaceae. *Acta botânica brasílica*, 2002, v. 16, n. 4, p. 457-479.
- 69 May, LW. The economic uses and associated folklore of ferns and fern allies. *The Botanical Review*, 1978, v. 4, p. 491-528.
70. Corrêa, MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
71. Barros, ICL; Andrade, LHC. Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins). Recife: Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 1997; 213 p.
72. Matos, FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC Edições, 1997; 141 p.
73. Laghari, AH; Memon, S; Nelofar, A; Khan, K.M; Yasmin, A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chemistry*, 2011, v. 126, p. 1850–1855.
74. Choi, CW; Kim, SC; Hwang, SS; Choi, BK; Ahn, HJ; Lee, MY; Park, SH; Kim, SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 2002, v. 163, p. 1161-1168.
75. Simões, CMO; Schenkel, EP; Gosmann, G; Mello, JCP; Mentz, LA; Petrovick, PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010; 1102 p.
76. Jeetendra, N; Manish, B. Correlation of antioxidant activity with phenolic content and isolation of antioxidant compound from *Lygodium flexuosum* (L.) SW. Extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2011, v. 3, n. 2, p. 48-52.

77. Kulisic, T; Radonic, A; Katanilic, V; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 2004, v. 85, p. 633-640.
78. Rice-Evans, CA; Miller, NJ; Paganga, G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, v. 20, n. 7, p. 933-956.
79. Soares, SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição, Campinas*, 2002, v. 15, n. 1, p. 71-81.
80. Ursini, F; Maiorino, M; Marazzoni, P; Roveri, A; Pifferi, G. A novel antioxidant flavonoid (idB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 1994, v. 16, n. 5, p. 547-553.

AGRADECIMENTOS

Aos membros dos Laboratórios de Bioquímica Toxicológica e Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brasil, com menção especial a Rogério de Aquino Saraiva, Diones Caeran Bueno e Pablo Andrei Nogara e Aline Augusto Boligon pela realização dos ensaios laboratoriais.

Carta de submissão

Dear Coutinho,

Good Day.

Thank you for your email message. **I am pleased to confirm preliminary acceptance of your chapter based on the abstract received.** Please send the final version by email attachment to main@novapublisher.com or by regular mail to the address listed below. If the file(s) for the chapter exceeds 10 MB in size, please contact Nova at the same email address main@novapublisher.com for FTP instructions. If you have opportunity, we invite you to visit our website at novapublisher.com we will be send electronic page proofs. As soon as a book is listed, the codes in the status field on the Nova website are changed to show production progress through to publication.

ARTIGO 1**Cytotoxic and Tripanocide Activities of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.****Running Head:** *P. calomelanos* and *T. cruzi*

¹Teógenes M. de Souza*, ¹Maria F. B. M. Braga, ¹Rogério A. Saraiva, ¹Pablo A. Nogara, ¹Diones C. Bueno, ¹Aline A. Boligon, ¹Margareth L. A. Fone, ¹João B. T. da Rocha, ²Miriam Rolon, ²Celeste Vega, ²Antonieta Rojas de Arias, ³Jose G.M. Costa, ⁴Irwin R. Alencar de Menezes, ¹Henrique D. M. Coutinho, ¹Antônio A. F. Saraiva

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil; ²Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay; ³Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil. ⁴Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

* Corresponding author:

Teógenes M. de Souza

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: teogenesms@yahoo.com.br

ABSTRACT - Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, and is considered a public health problem. Currently the available treatment for this disease is synthetic drugs, nifurtimox and benznidazol, that present high toxicity levels. *Pityrogramma calomelanos*, a plant used in traditional medicine as astringent, analgesic, anti-hemorrhagic, pectoral depurative, emmenagogue, anti-hypertensive, anti-pyretic, anti-tussive was tested for antiepipmastigote activity in vitro. **Material and methods:** An ethanol extract and hexane fraction of *P. calomelanos* was prepared and tested against *T. cruzi* (CL-B5 clone). Epimastigotes were inoculated at a $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ concentration in 200 μL triptose-liver infusion. For the cytotoxicity assay J774 macrophages were used. Effective concentration capable of killing 50% of parasites (EC_{50}) was 55.26 $\mu\text{g/mL}$ and 73.57 $\mu\text{g/mL}$ for the ethanol extract and hexane fraction, respectively. This is the first record of tripanocidal activity for *P. calomelanos*. The results indicate that *P. calomelanos* could be a source of antiepipmastigote natural products with only moderate toxicity toward healthy human cells.

Keywords - Antiepipmastigote activity, Chagas disease, cytotoxicity, *Pityrogramma calomelanos*.

Introduction

Developing countries with abundant traditional knowledge and rich biodiversity, as in the case of Brazil, still grapple with a high incidence of so-called “neglected diseases,” such as tuberculosis, malaria and Chagas disease (Croft *et al.*, 2005); diseases that have the potential to be treated with natural products of plant origin of Brazil (Croft *et al.*, 2005). Brazil has the largest biodiversity in the world, with more than 55.000 species of plants catalogued, and a richness estimated total of 550.000 species (Croft and Sundar, 2006), but only 8% have been studied in the search for bioactive compounds (Simões *et al.*, 2007).

Chagas disease (American trypanosomiasis) it is caused by a flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* of order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae and genera *Trypanosoma*, and represents public health problem in South America with 20 million people infected and 90 million are at risk in endemic areas (WHO, 2000). The parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods contaminated with feces, blood, organ transplants, and by the transplacental route (Prata, 2001).

The treatment of Chagas disease remains partially ineffective, despite the research carried out by various laboratories and researches, particularly the South American ones. Several compounds have been tested on animals and some of them have been used in man, but none eliminate the infection by *T. cruzi* and promotes permanent cure in all patients (Lana and

Tafari, 2005). Two drugs have been used: nifurtimox and benznidazole. These drugs are active against blood forms of the parasite and also on the tissue. The undesirable side effects of both are their main drawback, the most frequently observed in the use of nifurtimox are anorexia, weight loss, psychic alterations, excitability, drowsiness, gastrointestinal complications (nausea or vomiting, intestinal cramps and diarrhea). In the treatment with benznidazole, cutaneous manifestations are the most notorious (hypersensitivity, dermatitis with cutaneous eruptions, generalized edema, fever, lymphadenopathy, joint and muscle pain) (Castro *et al.*, 2006).

The disease defies the attempts of an efficient chemotherapy, in addition, the high cost involved in the development and registration of new drugs made the pharmaceutical industry cut subsidies for new drugs to treat tropical disease (Araya *et al.*, 2003). Thus, there is an urgent need for the development of new research on natural products for anti-*T. cruzi* activity (WHO, 2002). As Coura and Castro (2002), there are several herbal products tested against the etiologic agent Chagas disease, for example, alkaloids, taxoids, stilbenoids, anti-juvenile hormones and analogues, propolis, naphthoquinones and derivatives and synthetic crude extract plants and products.

In the work of Structure-Activity Relationships, SAR Menezes *et al.*, (2005), related that coumarins derivatives compound with the highest binding affinity, as example, coumarin chapelin, isolated from *Rutaceae* species promoted inhibition of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) through of linking at receptor site of GAPDH. In the binding study, the affinity of the compounds was determined by their ability to displace NAD⁺ from the enzyme receptor site, as well, by values obtained of binding energy of the coumarins derivatives compound at receptor site of GAPDH. The inhibition these enzyme interferes in the process of achievement of energy, by glycolysis, of amastigotes forms of *T. cruzi*.

Pityrogramma calomelanos (L.) Link. (Pteridaceae), known in Brazil as avenca-branca or avenca-preta is used as ornamental and medicinal plant. Extracts this species present several activities reported in the literature: astringent, analgesic, anti-hemorrhagic, pectoral depurative, emmenagogue, anti-hypertensive, anti-pyretic, anti-tussive (Barros and Andrade, 1997). Many compounds from the leaves of *Pityrogramma calomelanos* were isolated, as flavonoids, [(8-phenylpropionyl)-5,7-dihydroxydihydroxyneoflavone] and {8-[3-(4-*p*-methoxyphenyl)propionyl]-7-dihydroxyneoflavone} named calomelanol (Fujio *et al.*, 1991), terpenes, as calomelanolactone (Victor *et al.*, 1978), chalcones, as 2',6'-dihydroxy-4',4'-dihydroxychalcone (Sukuruman and Ramadasan, 1991). Due the social and economic

importance of Chagas disease, the purpose of this work was to demonstrate the anti-*Trypanosoma* activity of *Pityrogramma calomelanos*.

Materials and methods

Plant material

Leaves of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. were collected in the rainy season (September, 2009) in the city of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva of University of the Region of Cariri, Brazil, and voucher specimen have been deposited with the identification number 5570 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” of University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil.

Preparation of ethanol extract (EEPC) and hexane fraction (HFPC) of Pityrogramma calomelanos

950 g of leaves were dried with no sunlight exposition and kept at room temperature. The powdered material (leaves) was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively (Brasileiro *et al.*, 2006). 950 g of aerial parts yielded 50g of ethanol extract (EEPC). After, 40 g of EEPC was resuspended in 95% ethanol and mixed with silica gel (Merck®), and then fractionated with hexane by percolation of the solvent on the EEPC associated with silica gel (Merck®). The hexane fraction (HFPC) was concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60 °C and 760 mm/Hg of temperature and pressure, producing 0, 56 g of HFPC. The hexane was chosen in order to extract nonpolar compounds of the ethanol extract. After, ethanol extract and hexane fraction were diluted using DMSO.

Phytochemical screening

The phytochemical assays were used for qualitative analysis of the secondary metabolites presence. The tests are based in the visual observation of color modifications or formation of precipitate after addition of the reagents specific to each group of secondary metabolites. The tests were performed allowing the method described for Matos (2009).

Quantification of phenolics compounds of hexane fraction by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively, following the method described by Laghari *et al.*, (2011), with slight modifications. The sample of the fern was analyzed, dissolved in hexane at a concentration of 3 mg/mL. The presence of six phenolics compounds was investigated, namely, gallic, chlorogenic and caffeic acids and the flavonoids quercetin, rutin and kaempferol. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume 40 µL and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 325 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 365 nm for quercetin, rutin and kaempferol. The hexane fraction and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.200 mg/mL for kaempferol, quercetin and rutin; and 0.050 – 0.250 mg/mL for gallic, caffeic and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 400 nm). Calibration curve for caffeic acid: $Y = 10523x + 1478.8$ ($r = 0.9999$); chlorogenic acid: $Y = 12765x + 1381.7$ ($r = 0.9995$); rutin: $Y = 12691 - 1165.0$ ($r = 0.9998$); quercetin: $Y = 13495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$) and kaempferol: $Y = 15692x - 1218.1$ ($r = 0.9997$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Cell strains used

For in vitro studies of *T. cruzi*, the clone CL-B5 was used (Buckner *et al.*, 1996). The stably parasites was transfected with the *Escherichia coli* (*lacZ*) that have gene coding for β-galactosidase, were kindly provided by Dr F. Buckner through Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). Epimastigotes were grown at 28°C in liver infusion tryptose broth (Difco, Detroit, MI) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicillin (Ern, S.A., Barcelona, Spain) and streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), as described previously (Le Senne *et al.*, 2002), and harvested during the exponential growth phase.

Murine J774 macrophages were grown in plastic 25 μ L flasks in RPMI 1640 medium (Sigma[®]), (with glutamine, without bicarbonate and phenol red indicator), supplemented with 20% heat inactivated (30 min, 56 °C) fetal bovine serum (FBS) and penicillin G (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37° C. For the experiments, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cell viability was evaluated colorimetrically with resazurin according to a previously described method (Rolon *et al.*, 2006).

Reagents

Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X- 100 (pH 7.4). Penicillin G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofre S.A., Barcelona, Spain). Resazurin sodium salt was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and stored at 4 °C protected from light. A solution of resazurin was prepared in 1% phosphatebuffered solution (PBS), pH 7, and filter sterilized prior to use.

Epimastigote susceptibility assay

The screening assay was performed in 96-well microplates with cultures that had not reached the stationary phase, as described (Vega *et al.*, 2005). Briefly, epimastigotes were seeded at $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ in 200 μ L of liver tryptose broth medium. The plates were then incubated with EEPC and HFPC (0.1-50 μ g/mL) at 28°C for 72 h, at which time 50 μ L of CPRG solution was added to give a final concentration of 200 μ M. the plates were incubated at 37°C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Nifurtimox was used as the reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the antiepmastigote percent (AE%).

Cytotoxicity assays

Murine J774 macrophages were seeded (5×10^4 cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100 μ L of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h at 37°C, 5% CO₂, after which the medium was removed and replaced with medium containing different concentrations of treatment. Macrophages were incubated with treatment for another 24 h. Growth controls were also included. Afterwards, 20 μ L of 2 mM resazurin solution was added and plates were returned to incubator for another 3 h. to evaluate cell viability. The reduction of resazurin was determined by dual wavelength absorbance measurement at 490 nm and 595

nm. Background was subtracted. Each concentration was assayed three times. Blanks include medium and treatment only. The cytotoxicity of each compound was estimated by calculating the cytotoxic percentual (EC_{50}), cells survive/cells dead.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Prism program 5.0. The effective concentration (EC_{50}) was calculated by the linear regression method.

Results and discussion

The secondary metabolic compounds were identified in table 1, were observed two groups substances in hexane fraction not detected in the ethanol extract, flavonols and chalcones. The results of trypanicidal activity obtained with the hexane fraction could to be assigned for these substances.

TABLE 1

HPLC analysis

Due to the excellent results obtained with the hexane fraction, it was subjected to HPLC analysis for quantification of phenolic compounds. HPLC fingerprinting of hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 17.83$ min; peak 1), chlorogenic acid ($t_R = 28.14$ min; peak 2), caffeic acid ($t_R = 34.09$ min; peak 3), quercetin ($t_R = 49.78$ min; peak 5) and kaempferol ($t_R = 58.96$ min; peak 6) (Fig. 1 and Table 2). The HPLC analysis revealed that flavonoids (quercetin and kaempferol) and phenolics acids (chlorogenic and caffeic acids) are present in the HFPC.

FIGURE 1

TABLE 2

Hayacibara *et al.*, (2005), reported that the chemical composition of propolis is rich in phenylpropanoids (chlorogenic and ceffeic acids). Prytyk *et al.*, (2003), tested *in vitro* propolis extract against *Trypanosoma cruzi* and observed relevant activity against epimastigotes forms this parasite, becoming a possible alternative for the treatment of Chagas disease. These results corroborated our work, showing a strict relation between phenylpropanoids and tripanocidal activity.

Several biological activities have been reported associated with flavonoids. Quercetin, the most common flavonoid detected in foods, presented antiprotozoal effect against *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei* and *T. rhodesiense* (Camacho *et al.*, 2002; Williamson and Finnigan, 1978). Ana *et al.*, (2010), demonstrated that quercetin and taxifolin, isolated from hexane fraction of *Rapanea lancifolia* present low trypanocidal activity. Takeara *et al.*, (2003), shown that Quercetin-3-methyl ether isolated of extract from *Lychnophora staavioides* Mart. (Asteraceae) showed promise for use against *T. cruzi*, it did not cause lysis of blood cells, showing trypanocidal activity of 63, 2%. Our results indicate that HFPC, when tested at a concentration of 50 mg/mL, shown to be active against epimastigotes forms of *T. cruzi*, killing 71% of the parasites with 0% cytotoxicity.

Chalcones isolated from *Myrcia hiamelis* were found to be an enzymatic inhibitor of cruzaine (Deise *et al.*, 2006; Silva, 2007). This is a key cysteine protease in *Trypanosoma cruzi*, it is essential for the parasite survival and replication, and has been validated as a drug target for this organism. (Simeonov, 2008). This article is the first report regarding the chemical composition of *P. calomelanos* emphasizing the trypanocidal activity.

***Trypanosoma cruzi* epimastigote susceptibility assay**

The trypanocidal activity of EEPC and HFPC is shown in Table 3. The results demonstrated activity against the strain CL-B5 strain of *T. cruzi* for the hexane fraction at a concentration 50 µg/mL showing a inhibition of 71% for *T. cruzi* and an EC₅₀ = 73, 57 µg/mL. This is impressive considering an EC₅₀ less than 500 µg/mL is considered clinically relevant (Rosas *et al.*, 2007). The ethanol extract of *P. calomelanos* did not show clinically relevant inhibition of epimastigotes forms, due to its toxicity towards healthy murine macrophages.

TABLE 3

This is the first report of trypanocidal activity for *Pityrogramma calomelanos*. Other plants of the Brazilian flora have shown substantial trypanocidal activity, such as extracts and fractions of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rosas *et al.*, 2007), the ethyl acetate fraction of *Camellia sinensis* (Paveto *et al.*, 2004) and polar extracts of *Siphoneugena densiflora* (Gallo *et al.*, 2008).

Cytotoxic activity

An important criterion in the search for active compounds with trypanocidal activity is toxicity toward mammalian host cells. J774 macrophages were utilized to evaluate this cytotoxicity, and determine the selectivity of EEPC and HFPC. The results are presented in Table 2. No toxicity was observed at concentrations of 12, 5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$ to the hexane fraction, being a very significant result. The hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* showed low toxicity against macrophages J774 compared with the results presents for Roldos *et al.* (2008). In this study the substance semi-synthetic 1, 4-Hydroxylunularin, a natural hydroxybibenzyl bryophyte constituent, showed a toxicity of 18, 88% at a concentration of 21, 7 $\mu\text{g/mL}$. The hexane fraction (HFPC) of *P. calomelanos* appears to be promising in the development of more effective therapies, mainly due to the low level of toxicity *in vitro* and potent antiepipmastigote activity, which allows us to proceed with *in vivo* studies for drug evaluation.

Conclusion

Our results indicate that *Pityrogramma calomelanos* could be a source of plant-derived natural products with antiepipmastigote activity with low toxicity, representing an interesting alternative in efforts to combat infectious diseases such Chagas disease.

LITERATURE CITED

- Ana, C. Leite., Artur, P. N., Alessandra, R. P., Ambrozini, J. B., Fernandes, P. C., Vieira, M. F., das G. F. da Silva, Sérgio de Albuquerque. 2010. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from *Myrsinaceae* and *Meliaceae* active plant extracts Rev. bras. farmacogn. 20: 1-6.
- Araya, J. E., Neira, I., Silva, S., Mortara, R. A., Manque, P., Cordero, E. 2003. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98: 413-418.
- Barros, I. C. L. & Andrade, L. H. C. 1997. Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins). Recife, Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco.
- Brasileiro, B. G., Pizziolo, V. R., Raslan, D. S., Jamal, C. M., Silveira, D. 2006. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. Braz. J. Pharm. Sci. 42: 195-202.
- Buckner, F. S., Verlinde, C. L., La Flamme, A. C., Van, V. W. C. 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. Antimicrob. Agents Chemother, 40: 2592–2597.
- Camacho, M. D., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Marley, D., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., 2002. Assessment of the antiprotozoal activity of *Galphimia glauca* and the isolation of new nor-secofriedelanes and nor-friedelanes. J. Nat. Prod. 65: 1457-1461.
- Castro, J. A., De Mecca, M. M., Bartel, L. C., 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol 25: 471-479.
- Coura, J. R., Castro, S. L., 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97: 3-24.
- Croft, S. L. and Sundar, A. H. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clinical Microbiology Reviews. 19: 111-126.
- Croft, S. L., M. P. Barrett, J. A. Urbina. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. Trends Parasitol. 21: 508-512.
- Deise, M. B., Alessandra, M. L. D. C., Ricardo, J. N., Glaucius, O., Rosendo, A. Y., Adriano, D. A. 2006. Síntese e avaliação bioquímica de uma série de Chalconas como inibidores da cruzaina de *Trypanosoma cruzi*. In: 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- Fujio, A., Munekazu, I., Thoshiyuki, T., Mizuo, M. 1991. Complex flavonoids in farinose exudate from *Pityrogramma calomelanos*. Phytochemistry, 30: 3091-3093.
- Gallo, M. B. C., Marques, A. S. F., Vieira, P. C., Silva, M. F. G. D., Fernandes, J. B., Silva, M. 2008. Enzymatic Inhibitory activity and trypanocidal effects of extracts and compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* Cham. Z Naturforsch C, 63: 371-382.

- Hayacibara, M. F., Koo, H., Rosalen, P. L., Duarte, S., Franco, E. M., Browen, W. H., Ikegaki, M., Cury, J. A. 2005. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J. Ethnopharmacol.* 101: 110-115.
- Laghari, A. H., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K. M., Yasmin, A. 2011. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chem.* 126: 1850–1855.
- Lana, M. de, TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Neves, D. P., Melo, A. L. de, Genaro, O., Linard, P. M. 2005. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu. cap. 11, p. 85-108.
- Le Senne, A., Muelas-Serrano S., Fernandez-Portillo, C., Escario, J. A., Gomez-Barrio, A. 2002. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 1101–1105.
- Matos, F. J. A. 2009. Edições UFC. Introdução à química experimental, 3: 45-74.
- Menezes, I. R. J. C., Lopes, C. A., Montanari, G. O., Pavão, F. M. S., Castilho, V. P. C. 2003. 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 17: 277-90.
- Paveto, C., Güida, M. C., Esteva, M. I., Martino, V., Coussio, J., Flawiá, M. M. 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Green tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48: 69-79.
- Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.* 1: 92–100.
- Prytyk, E., Dantas, A. P., Salomão, K., Pereira, A. S., Bankova, V. S, De Castro, S. L., Aquino, N. F. R. 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of *Bulgarian propolis*. *J. Ethnopharmacol.* 88: 189-193.
- Roldos, V., Nakayama, H., Rolón, M., Montero-Torres, A., Trucco, F., Torres, S. 2008. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. *J. Med. Chem.* 43: 1797-1807.
- Rolon, M., Seco, E., Vega, C., Nogal, J. J., Escario, J. A., Gomez-Barrio, A. 2006. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 28: 104–109.
- Rosas, L. V., Cordeiro, M. S. C., Campos, F. R., Nascimento, S. K. R., Januário, A. H., França, S. C. 2007. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 663-670.
- Silva, P. D. 2007. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos flavonóides isolados de *Myrcia hiemalis* (Myrtaceae). Universidade Federal da Bahia, Instituto de química, Programa de Pós Graduação em Química (MSc Thesis).

- Simeonov, A., Jadhav, A., Thomas, C. J., Wang, Y., Huang, R., Southall, N. T., Shinn, P., Smith, J., Austin, C. P., Auld, D. S., Inglese, J. Fluorescence spectroscopic profiling of compound libraries. *J Med Chem* 2008, 51: 236371.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC.
- Sukuruman, K. and Ramadasan, K. 1991. Screening of 11 ferns for cytotoxic and antitumor potencial with special reference to *Pityrogramma calomelanos*. *J. Ethnopharmacol.*, 34: 93-96.
- Takeara, R., Albuquerque, S., Lopes, N. P., Lopes, J. L. C. 2003. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae). *Phytomedicine* 10: 490-493.
- Vega, C., Rolon, M., Martínez-Fernandez, A. R., Escario, J. A., Gomez-Barrio, A. 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. *Parasitol. Res.* 95: 296–298.
- Victor, B., Baldwin, S. M., Ken H., Jon, C. 1978. Sesquiterpenes from *Pityrogramma calomelanos*. *Phytochemistry*, 17: 275-277.
- WHO - World Health Organization. 2000. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Natural products for parasitic diseases. *TDR News* 62: 4.
- WHO - World Health Organization. Police perspectives on medicines. Geneva: World Health Organization. 2002.
- Williamson, J., Finnigan, T. J. S. 1978. Trypanocidal activity of antitumor antibiotics and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 13: 735-744.

Table 1: Phytochemical screening of ethanol extract and hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

METABOLITES															
	Alkaloids	Anthocyanidins	Anthocyanins	Aurones	Catechins	Chalcones	Flavones	Flavonones	Flavonols	Flavononols	Phenols	Leucoanthocyanidins	Xanthones	Pyrogallics Tannins	Saponins
EEPC	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
HFPC	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-

Table 2 – Phenolics and flavonoids composition of hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Compounds	HFPC	
	mg/g	Percent
Gallic acid	-	-
Chlorogenic acid	1.05 ± 0.01 a	0.10
Caffeic acid	4.59 ± 0.03 b	0.45
Rutin	-	-
Quercetin	1.14 ± 0.02 a	0.11
Kaempferol	0.93 ± 0.01 a	0.09

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.005$.

Table 3: Percent of parasite lysis induced by ethanol extract and hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* against the epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* CL-B5 strain.

Extract	Concentrations (µg/mL)	%AE	%SD	% C	EC ₅₀
EEPC	500	91	3,3	100	55,26
	200	77	3,1	86	
	100	74	2,7	73	
	50	37	1,8	6	
HFPC	50	71	1,2	0	73,57
	25	67	0,7	0	
	12,5	47	0,9	0	
Nifurtimox	10	89,1	3,3	-	0,91
	1	54,9	0,7	-	
	0,5	45,6	4,2	-	

%AE – Percent of inhibition of epimastigote forms; %SD – Standard deviation; % C – cytotoxic effect; EC₅₀ – Concentration with 50% of the maximum activity; EEPC (ethanol extract of *P. calomelanos*), HFPC (hexane fraction of *P. calomelanos*).

Figure 1 - Hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

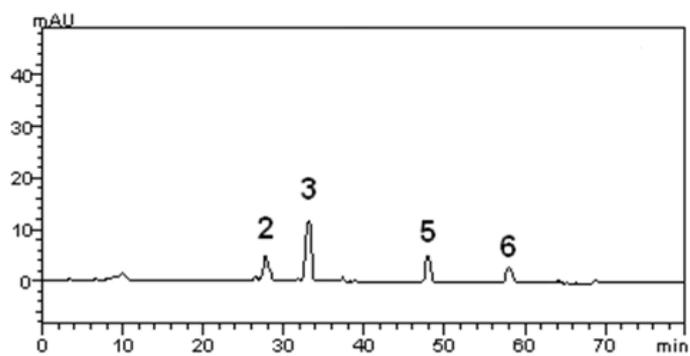


Figure 1 – Representative high performance liquid chromatography profile of (HFPC), detection UV was at 327nm. Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5) and kaempferol (peak 6).

Carta de submissão

From: Jennifer Geiger <amerfern@hotmail.com>

To: teogenesms@yahoo.com.br

Subject: RE: submission of article

Dear **TEÓGENES MATIAS DE SOUZA**,

Thank you for your submission. I will send your manuscript out for review as soon as possible and be in touch when the reviews are completed.

Kind regards,

Jennifer,

Jennifer Geiger, PhD

Editor in Chief, American Fern Journal

Department of Natural Sciences

Carroll College

Helena, MT 59625

jgeiger@carrolleu; amerfern@hotmail.com

406-447-4461

ARTIGO 2**Evaluation of the anti-*Leishmania* activity of ethanol extract and fractions of the leaves from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.**

T.M. SOUZA¹, M.F.B. MORAIS-BRAGA¹, A.A.F. SARAIVA¹, M. ROLÓN², C. VEGA²,
A.R. ARIAS², J.G.M. COSTA³, I.R.A. MENEZES⁴ and H.D.M. COUTINHO^{1*}

¹Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil; ²Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay; ³Laboratory of Natural Products Research, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil; ⁴Laboratory of Pharmacology and Medicinal Chemical, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil.

*CORRESPONDING AUTHOR:

Henrique D.M. Coutinho

Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Av. Cel. Antônio Luiz, 1161, CEP:63105-000. Crato, CE. Brasil. Phone: +558831021212. Fax: +558831021291. E-Mail: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract

Context: Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, mainly founded in regions with forests, as the Amazonia. Recent reports about the Leishmaniasis indicate a deficit of therapeutic drugs available against this disease and reinforce the necessity of the discovering of new drugs.

Objective: In this study the ethanol extract (EEPC) and fractions of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. (Pteridaceae) was tested for its cytotoxicity and leishmanicidal activity against to *Leishmania brasiliensis*.

Material and methods: In this study, the ethanol extract and fractions of *Pityrogramma calomelanos* was prepared and tested for its action cytotoxicity and leishmanicidal activity. For the in vitro assays against *Leishmania*, were used promastigote forms. The cytotoxic assay was performed using NCTC929 fibroblasts.

Results: The studies indicated that the effect anti-leishmanicidal of EEPC and EAFPC was demonstrated, however present high cytotoxicity in fibroblasts. In HFPC and MFPC was not demonstrated leishmanicidal activity. The cytotoxicity to HFPC was not observed. In this work were detected alkaloids in EEPC and MFPC. Alkaloids are reported with effect anti-leishmanicidal.

Conclusion: This is the first work that reported about effect anti-leishmanicidal and cytotoxicity from *Pityrogramma calomelanos*, constituting a new approach in the search involving this specie.

Keywords: Cytotoxic activity, *Leishmania braziliensi* and *Pityrogramma calomelanos*.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, endemic around the world and affecting more of 12 million people worldwide. This disease are endemic and cause an enhanced morbidity and mortality in populations in Africa, Asia and Latin America (Who, 2002; Dujardin, 2006). In Brazil, this disease is present as Visceral Leishmaniasis (VL) and as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), mainly in the northeastern and north regions (Rath *et al.*, 2003; Luz *et al.*, 2001).

Developing countries with traditional communities and high biodiversity, as the Brazil, still suffer with the called “neglected diseases,” such as tuberculosis, malaria, Chagas disease and Leishmaniasis (Croft *et al.*, 2005). Al these diseases have potential to be treated with natural products (Funari and Ferro, 2005). Brazil present one of the highest biodiversity

in the world (Croft and Sundar, 2006), but only 8% of all species have been studied in the search for bioactive compounds (Tesh, 1989).

Reviews about the chemotherapy of Leishmaniasis indicates that the therapeutic agents currently available against this disease are few and low effective, being necessary the discovery of new drugs candidates (Croft *et al.*, 2005; 2006). The use of natural products with medicinal purposes to treat, cure and prevent diseases is one of the oldest forms of medical practice. In the 1990's, the World Health Organization (WHO, 2002) informed that 65-80% of population of developing countries used medicinal plants as exclusive form of basic health care (Carvalho and Ferreira, 2001). Due the difficulty to access remedies, many patients use natural products together with industrialized drugs (Chan-Bacab and Pena-Rodriguez, 2001). Many plants present phytochemicals as alkaloids, terpenes, lignans, chalcones, flavonoids and sesquiterpenic lactones, all of them with leishmanicidal activities reported in the literature (Iwu *et al.*, 1994; Queiroz *et al.*, 1996; Torres-Santos, 1999; Kam *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2005). The evaluation of the toxicity of substances with biological activities is the first step to the use of these compounds in animal models. Currently, the drugs against *L. braziliensis* demonstrated toxicity associated with these metabolites (Dias and Dessoy, 2009).

Pityrogramma calomelanos (Pteridaceae), called in Brazil as Avenca-branca or Avenca-preta is used as ornamental and medicinal plant. Natural products from this species present several activities (Barros and Andrade, 1997). Many compounds from the leaves of *Pityrogramma calomelanos* were isolated, as flavonoids (Fujio *et al.*, 1991), terpenes (Victor *et al.*, 1978), chalcones (Sukuruman and Ramadasan, 1991) and phenols (Dervilla *et al.*, 1979).

The objective of this work was identify the phytochemical composition and evaluate the *in vitro* activity of the ethanol extract and fractions of *P. calomelanos* against *Leishmania* and the cytotoxic effect.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Leaves of *P. calomelanos* were collected in the rainy season (September, 2009) in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva of Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil, and a voucher specimen was deposited with the identification number 5570 at the Herbarium "Dárdano de Andrade Lima", URCA, Crato - CE, Brazil.

Preparation of ethanol Extract (EEPC), methanol (MFPC), Ethyl Acetate (EAFPC) and hexane fractions (HFPC) of *Pityrogramma calomelanos*

950 g of leaves were dried and kept at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively (Brasileiro *et al.*, 2006). 950 g of aerial parts yielded 50g of ethanol extract. 40 g of EEPC was fractionated with hexane, ethyl acetate and methanol, producing 0.56, 18.5 and 14.3g of each fractions respectively. The ethanol extract and fractions were diluted using DMSO.

Phytochemical Screening

The phytochemical assays is to use for qualitative analysis of the presence secondary metabolites as: heterosides, saponins, tannins, flavonoids, steroids, triperpenes, cumarins, quinones, organics acids and alkaloids were performed (Matos, 2009). In the tests is observed the visual modification of color and formation of precipitate after of the addition of the reagents specifics. The table 1 present the metabolites observed in the ethanol extract and fractions.

Strains used

Cultures of *Leishmania* spp. were obtained from the Institute of Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay – IICS and identified by isoenzyme analysis. The maintenance of the cells, manner of culture and isolation of promastigote forms of *Leishmania* spp. followed the procedures described by Roldos *et al.* (2008). The inhibition assays against promastigote forms were performed using the *L. braziliensis* strain MHOM/BR/75/M2903, growing at 22 °C in Schneider's Drosophila medium, supplemented with FBS 20%. The cytotoxic assays used the fibroblast strain NCTC929, cultivated in Minimal Essential Medium (Sigma). The medium culture was supplemented with FBS inactivated by heat (10%), penicillin G (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/mL). The strain was cultivated at 37°C in humid atmosphere with 5% of CO₂. The viability of this strain was evaluated through the colorimetric method using resazurin (Rolón *et al.*, 2006).

Reagents

Sodium resazurin was obtained from Sigma–Aldrich (St Louis, MO) and stored at 4°C in the dark. The resazurin solution was prepared with phosphate buffer 1%, pH 7 and sterilized by filter prior the use. The Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; Roche,

Indianapolis, IN) was dissolved in a solution of Triton X-100 0.9% (pH 7.4). Penicilin G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofre S.A., Barcelona, Spain) e Dimethylsulfoxide (DMSO) also were used.

Test of antipromastigota activity

Cultures of promastigote forms from *L. braziliense* were grown to a concentration of 10^6 cells/mL and so transferred to the test. The compounds were dissolved in DMSO to a concentration to be tested and were transferred to the micro plates. Each assay was performed in triplicate. The activity of the compounds was evaluated after 72h by direct counting of the cells after two fold serial dilutions and compared with an untreated control.

Cytotoxic Test

NCTC929 fibroblasts were plated in micro plates of 96 well at a final concentration of 3×10^4 cells/well. The cells were grown at 37°C in atmosphere with 5% of CO₂. After that, the medium culture was removed and the compounds were added to 200 µL, being performed a new incubation by 24h. After this incubation, 20 µL of a solution of resazurina 2 mM was added in each well. The plates were incubated for 3h and the reduction of resazurina was measured using dual absorbance in the wavelengths of 490 and 595 nm. The value of control (white) was subtracted. Each concentration was tested in triplicate.

RESULTS

The EEPC and EAFPC demonstrated a leishmanicidal activity against the promastigotes of *L. brasiliensis* (concentration of 500 µg/mL inhibited 100% of the parasite cells). The EEPC was more effective than EAFPC. However, these natural products showed a cytotoxic activity, except in the assays with HFPC (Table 2). None activity against *L. brasiliensis* were observed in the assays with MFPC and HFPC.

DISCUSSION

Several phytochemical compounds have demonstrated *in vitro* activity against promastigotes and/or amastigotes of *Leishmania*. According with the phytochemical screening, EEPC presents alkaloids and saponines. These metabolites have demonstrated several biological activities against infectious agents (Alberton *et al.*, 2001). Also had been reported the anti- inflammatory, antitumoral, analgesic and other activities. The leishmanicidal activity of alkaloids is well reported (Mahiou *et al.*, 1994; Fournet *et al.*, 1996; Queiroz *et al.*, 1996). The action mechanisms of alkaloids are related with the capacity of these metabolites to interact with the DNA of parasite (Tempone *et al.*, 2005).

The strategies to research new drugs to the leishmaniasis treatment involves *in vitro* and *in vivo* assays. According with the World Health Organization (WHO), a new drug candidate to be used must be submitted to *in vitro* assays to verify the cytotoxicity and anti-parasitic activity. After these first tests, the results must be analysed to define the possibility of *in vivo* assays (Dias and Dessoy, 2009).

An important point to be evaluated in the search by compounds with leishmanicidal activity is the toxicity against host cells. The cytotoxic activity can be evaluated using different models with human cells as: human lymphocytes (Reyes-Chilpa *et al.*, 2008), MRC-5 cells (Cabral *et al.*, 2010) and macrophages (Houghton *et al.*, 2007).

Pityrogramma calomelanos is a fern used in the traditional medicine. However, there are no reports of anti-leishmanicidal or cytotoxic activity for this species. So, this is the first report of these activities to *P.calomelanos*. Besides the toxicity, these natural products must be studied using the isolated phytocompounds. With this strategy, *P. calomelanos* can be a source of products to be used against the leishmaniasis, reducing the infection and helping in the treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP with funding and grants (HDMC BPI-0031-00118.01.00/10 and IRAM BPI-031-00107.01.00/10).

References

- Alberton, J.R., Ribeiro, A., Sacramento, L.V.S., Franco, S.L. & Lima, M.A.P. (2001). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **11**, 37-50.
- Barros, I.C.L. & Andrade, L.H.C. (1997). *Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)*. Recife: Ed. Universitária (Universidade Federal de Pernambuco).
- Cabral, M.M.O., Barbosa-Filho, J.M., Maia, G.L.A., Chaves, M.C.O., Braga, M.V., De Souza, W. and Soares, R.O. (2010). *Experimental Parasitology*, **124**, 319-324.
- Chan-Bocab, M.J. & Pena-Rodríguez, L.M. (2001). *The royal society of chemistry*, **18**, 674-688.
- Croft, S.L., Barrett, M.P. and Urbina, J.A. (2005). *Trends In Parasitology*, **21**, 508-512.

Croft, S.L., Sundar, S. & Fairlamb, A.H. (2006). *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 111-126.

Dervilla, M.X.D., Mary, J.M. and Brandan, O.D. (1979). *Tetrahedron letters*, **44**, 4269-4272.

Dias, L.C. and Dessoay, M.A. (2009). *Quimica Nova*, **32**, 2444-2457.

Dujardin, J.C. (2006). *Trends in Parasitology*, **22**, 4-6.

Fournet, A., Ferreira, M.E., Rojas, A.A., Torres, O.S., Fuentes, S., Nakayama, H. & Schinini, A. (1996). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 2447-2451.

Fujio, A., Munekazu, I., Thoshiyuki, T. & Mizuo, M. (1991). *Phytochemistry*, **30**, 3091-3093.

Funari, C.S. & Ferro, V.O. (2005). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **15**, 178-182.

Houghton, P.J., Howes, M.J., Lee, C.C. & Steventon, G. (2007). *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, 391-400.

Iwu, M.M., Jackson, J.E. & Schuster, B.G. (1994). *Parasitology Today*, **10**, 65-68.

Kam, T.S., Sim, K.M., Koyano, T., Toyoshima, M. & Komiyama, K. (1999). *Phytochemistry*, **50**, 75-79.

Lacerda, M.M. (1994). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**, 489-495.

Luz, Z.M.P., Pimenta, D.N., Cabral, A.L.L.V., Fiúza, V.O.P., Rabello, A., Carvalho, P.B.D. & Ferreira, E.I. (2001). *Fitoterapia*, **72**, 599-618.

Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cave, A., Rojas de Arias, A., Inchausti, A., Yaluff, G. & Fournet, A. (1994). *Journal of Natural Products*, **57**, 890-895.

Matos, F.J.A. (2009). *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições UFC.

Queiroz, E.F., Roblot, F. & Cave, A. (1996). *Journal of Natural Products*, **59**, 438-440.

Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunito, T.R., Tomazela, D.M., Jesus, M.N., Marzal, P.C., Andrade Júnior, H.F. & Tempone, A.G. (2003). *Quimica Nova*, **26**, 550-553.

Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Veja-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J. & Hernández-Ortega, S. (2008). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **103**, 431-436.

Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macêdo, R.O. & Barbosa Filho, J.M. (2005). *Phytomedicine*, **12**, 514-535.

Roldos, V., Nakayama, H., Rolón, M., Montero-Torres, A., Trucco, F. & Torres, S. (2008). *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 1797-1807.

Rolón, M., Seco, E., Vega, C., Nogal, J.J., Escario, J.A., Gómez-Barrio, A. & Malpartida, F. (2006). *International Journal of Antimicrobial Agents*, **28**, 104-109.

Sukuruman, K. & Ramadasan, K. (1991). *Journal of Ethnopharmacology*, **34**, 93-96.

Tempone, A.G., Borborema, S.E.T., Andrade Jr, H.F., Gualda, N.C.A., Yogi, A., Carvalho, C.S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V. & Fischer, D.C.H. (2005). *Phytomedicine*, **12**, 382-390.

Tesh, R.B. (1989). *Israel Journal of Medical Sciences*, **25**, 214-217.

Torres-Santos, E.C., Moreira, D.L., Kaplan, M.A.C., Meirelles, M.N. & Bergmann, B.R. (1999). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 1234-1241.

Victor, B., Baldwin, S.M., Ken, H. & Jon, C. (1978). *Phytochemistry*, **17**, 275-277.

WHO - World Health Organization (2002). *The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>. Access at 10/11/05.

Table 1. Phytochemical screening of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

METABOLITES															
	Alkaloids	Anthocyanidins	Anthocyanins	Aurones	Catechins	Chalcones	Flavones	Flavonones	Flavonols	Flavononols	Phenols	Leucoanthocyanidins	Xanthones	Pyrogallics Tannins	Saponins
EEPC	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
HFPC	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
FMPC	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
EAFPC	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

(+) presence; (-) absence; EEPC, ethanol extract of *Pityrogramma calomelanos*; EAFPC, ethyl acetate fraction from *Pityrogramma calomelanos*; MFPC, methanol extract from *Pityrogramma calomelanos*; HFPC, hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos*.

Table 2: Antipromastigote activity to *L. brasiliensis* and cytotoxicity.

Extracts/fractions	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	(%AP)	%SD	% C
EEPC	500	100	2,4	100
	200	96	0,5	86
	100	62	4,2	73
	50	20	2,0	6
MFPC	500	0	0,7	73
	200	0	4,4	0
EAFPC	500	100	0,8	100
	200	80	2,2	89
	100	47	2,6	47
	50	10	3,2	14
HFPC	50	0	7,1	0
	25	0	5,2	0
	12,5	0	6,5	0

EEPC, ethanol extract from *Pityrogramma calomelanos*; EAFPC, ethyl acetate fraction from *Pityrogramma calomelanos*; HFPC, hexane fraction from *Pityrogramma calomelanos*; MFPC, methanol extract from *Pityrogramma calomelanos*; %AP, percentage inhibition promastigote; %C, cytotoxicity; %SD, standard deviation.

Carta de submissão

Dear Prof. Coutinho

We acknowledge receipt of your submission entitled “Evaluation of the anti-leishmania activity of ethanol extract and fractions of the leaves from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.” To: pathogens and Global Health.

You will be able to check the progress of your paper by logging on to Editorial manager as an author at the URL. <http://pgh.edmgr.com/>

Your username is: hdmcoutinho@gmail.com

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards.

ARTIGO 3**Evaluation of antimicrobial and modulation activity of ethyl acetate fraction and hexane fraction of the leaves from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.**

^aTeógenes M. de Souza, ^aMaria F.B.M. Braga, ^aHenrique D.M. Coutinho, ^bJosé G.M Costa,
^aAntônio A.F. Saraiva

^a Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil; ^b Laboratory of Research of Natural Products, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil

* Corresponding author:

Teógenes Matias de Souza.

Science Biological Department, Regional University of Cariri – URCA, Crato-CE, Brazil.
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.

E-mail: teogenesms@yahoo.com.br

ABSTRACT

In the work, the ethyl acetate fraction and hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. were evaluated to antibacterial and antifungal activity against strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*. The study, was performed with the objective of assess the antimicrobial effect with the method of dilution in HIA. The hexane fraction (HFPC) and ethyl acetate fraction (EAFPC) of specie *P. calomelanos* showed good activity against *S. aureus* when associated with gentamicin. The fractions when associated with the antifungal were not observed relevant activity against at species of *Candida*. These results indicate that the specie of plant can be worked how a possible source of natural products with interest antibacterial, mainly when combined with aminoglycosides.

Keywords: Antimicrobial activity; ethyl acetate fraction; hexane fraction; *Pytirogramma calomelanos*; modifying antibiotic activity

INTRODUCTION

The infections hospital are a serious problem of public health, both in developed and developing countries, causing significant increases in morbidity, mortality and hospital costs.¹ Among the major pathogens involved the etiology these infections stands *Staphylococcus aureus*.² The clinical manifestations of *S. aureus* can be cutaneous or systemics.³ The symptoms cutaneous include: folliculitis, impetigo, boils, carbuncles and the skin scalded syndrome staphylocococic. *S. aureus* is frequently isolated in post-surgical wounds, and is therefore a serious problem to systemic infections. When cause bacteremia, that bacteria can produce endocarditis, osteomyelitis, piocardite and meningitis.⁴

In health, other clinical important bacterium is *Escherichia coli*. In humans, have been identified as the primary cause of infections urinary tract, neonatal meningitis, nosocomal septicemia and enteritis. *Pseudomonas aeruginosa* also is among the bacteria of greater clinical relevance, because can cause infections in imunedeficiencies, as occurs in cystic fibrosis where the secretions stasis favors the initial colonization by the bacteria. Furthermore, this bacterium present high rate of mutations, that result in progressive resistance to antibiotics and difficult the anti-infective therapy.⁵

In this context, a growing and important problem is the increase of bacterial resistance to antibiotics.⁶ The resistance at two or more classes of antimicrobial have been a common

finding reported how in human medicine as veterinary, limiting the therapeutic options available.⁷ To the patients, the resistance at antibiotics increase the morbidity and mortality, while that to the institutions of health means increase of costs.⁸

In folk medicine, the plants are used concurrently with the use of conventional medicines.⁹ In this association, the medicinal plants or yours sub-products can act inhibiting or increase the therapeutic effect of conventional drugs.¹⁰ The plants with therapeutics properties used in folk medicine are an important source of news biologically active compounds. The uses of extracts with antimicrobial agents present a low possibility of microorganisms acquire resistance to their action, because are complex mixtures.¹¹

Efflux pumps are integral proteins of bacterial plasmatic membrane and that have been blamed for several cases of drugs resistance, which are expelled to out of cell.¹² Modifiers of antibiotic activity is a term used to substances that modulate or even reverse bacterial resistance to specifics antibiotics, how is the case of several natural products of plant origin (extracts and phytoconstituents) that change the microbial susceptibility to antibiotics for inhibition of efflux of pumps.¹³

The family Pteridaceae presents greater morphological diversity, the most of species occurs in tropics and arid regions. Are known about of 50 genus and 950 species.¹⁴ *Pityrogramma* is a genus with about of 17 species occurring mainly in Tropical America.¹⁵ The specie *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. is knowed by the popular names fetó-white, avenca-white or avenca-black.¹⁶ and is used as ornamental and medicinal plant.¹⁷

Due to the scarcity of data concern the biological activity of the ferns of Brazil, especially in the northeast, beyond the serious problem of resistance to antibiotics is very common. The present work search edified of chemical compounds main of the specie, as well evaluate the potential modulator and antimicrobial antibiotic activity of ethyl acetate fraction and hexane fraction of leaves *P. calomelanos*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Material:

The bacterial strains used were: *E. coli* (EC-ATCC10536 and EC27), *S aureus* (SA-ATCC25923 and SA358) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442 e PSU 03) with profile of resistance showed in table 1. All the strains were kept in *heart infusion Agar slants* (HIA; Difco) and before of assays, the cells were cultured during 24h at 37°C in *brain heart infusion*

(BHI, Difco). All the strains were obtained of collection microorganisms of Mycology Laboratory - UFPB.

Fungal Material

The fungal strains used were: *Candida albicans* ATCC 40227, *Candida krusei* ATCC 6538 and *Candida tropicalis* ATCC 13803. All the strains were kept in *heart infusion Agar slants* (HIA; Difco) and before of the assays, the cells were cultured during 24h to 37°C in *brain heart infusion* (BHI, Difco). The strains were obtained of collection microorganisms of Mycology laboratory - UFPB.

Plant Material

Leaves of *P. calomelanos* were collected in the rainy season (September, 2009) in the city of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva of University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil, and voucher specimen have been deposited with the identification number 5570 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil.

Were produced antibacterial solutions of 5.000 µg/mL to amikacin, kanamycin, gentamicin and neomycin, obtained of industry (Sigma Co., St. Louis, USA). About to antifungal drugs, were prepared solutions of 1024 µg/ml to anphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazole (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nystatin (Brazilian Laboratory Teuto S/A, Brazil), e Benzoilmetronidazol (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil). The antibiotic solutions were prepared allowing the recommendations of NCCLS.¹⁸

Preparation of ethyl acetate fraction (EAFPC) and hexane fraction (HFPC) of leaves *P. calomelanos* (L.) Link.

Leaves of the plant (950 g) were dried and kept at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The homogenate was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator (Q-344B – Quimis, Brazil) and ultrathermic bath (Q-214M2 - Quimis, Brazil) under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively (Brasileiro *et al.*, 2006). Each 500 g of aerial parts yielded 26, 3 g of ethanol extract. After, 20 g of ethanol extract was fractionated with hexane and ethyl acetate,

producing 0, 28 g and 9, 25 g of material fractionated respectively. The fractions were diluted using DMSO.

Phytochemical Screening

The phytochemical assays is to use for qualitative analysis of the presence secondary metabolites as: heterosides, saponins, tannins, flavonoids, steroids, triperpens, cumarins, quinones, organics acids and alkaloids were performed allowing the method described for Matos.²⁰ The tests are analyzed by the observation visual of modification of color and formation of precipitate after of the addition of the reagents specifics. The table 2 presents the metabolites observes in hexane and ethyl acetate fractions.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined in BHI 10% by method of microtitulation, using a suspension of 10^5 UFC/mL and an initial drug concentration 1024 $\mu\text{g/mL}$ for fungi and 5.000 $\mu\text{g/mL}$ for bacteria.²¹ The MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed. To the evaluation of the ethyl acetate fraction and hexane fraction as modulators of resistance to antibiotics and antifungal agents, the sub-inhibitory concentration was determined by MIC/8 with values of 128 $\mu\text{g/mL}$ to EC27, MRSA 358, *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*. The plates were incubated for 24 horas at 37 °C using to the reading of strains resazurina, no dye was used to fungi.

RESULTS

In the assays antimicrobial evaluation with the ethyl acetate fraction and hexane fraction was determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC $\mu\text{g/mL}$). To these fractions, was not observed antimicrobial activity relevant clinically to fungi and bacteria. The values of MIC are exposed in table 3.

In the test of modulation to bacterial was verified in *E. coli* that ethyl acetate fraction potentiated only the effect amikacin. The hexane fraction potentiated the effect of two antibiotics, amikacin and kanamycin. This indicating, a relevant property these fractions in to facilitate the action of aminoglycosides on *E. coli*. In the modulator activity to *S. aureus* was observed that ethyl acetate fraction promoted potentiation in action kanamycin, gentamicin and neomycin. The hexane fraction potentiated the effect only in the gentamicin. For *P. aeruginosa* was not observed potentiation of antibacterial activity. In the assay to fungi was not observed modulation of the effect antifungal of antibiotics against the species of Candida

tested. In the test of modulation to fungi was observed that only the Benzoilmetronidazole suffered potentiation in your antifungal effect against *C. albicans* when associated with the hexane fraction. These are the first results published with the specie *P. calomelanos* to antimicrobial activity and modifying antibiotic activity.

DISCUSSIONS

The mechanisms by which the extracts may inhibit the grown of microorganisms are several, and can due at hydrophofobic nature of some components. This components can interact with the lipidlyier of the cell membrane, affecting the respiratory chain and energy production,²² or even make the cell more permeable at antibiotics, leading to disruption of vital cellular activity.²³ Varied components of extracts or fractions increase the permeability of the cell, raising the penetration of antibiotics.²⁴ This mechanism can be obtained by combination of antibiotics with extract or fractions in concentration sub-inhibitory applied directly to the culture medium.²⁵

This strategy is called "herbal shotgun" or " synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations, which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible.^{26,27}

This information are promising and can incentive search futures about pharmacological aspects and toxicity of sub products of *P. calomelanos* with the objective of promote the possible using rational in the antifungal and antibacterial therapy as well resolve in parts the question of resistance at antibiotics.

Future work to identification of the chemical compounds of fractions are relevant and necessary to the discovery of their active principles, moreover, studies *in vitro* and *in vivo* are important to a possible synthesizing of new drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP, by the financial support.

REFERENCES

1. Boyce, J.M. (2001). MARSА patients: proven methods to treat colonization and infection. *J Hosp Infec*, 48: 9-14.
2. Moraes, B.A. De., Cravo, C.A.M., Loureiro, M.M., Solari, C.A., Asensi, M.D. (2000). Epidemiological analysis of bacteria strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. *Rev Inst Med Tropical*, 42: 201-207.
3. Ferreira, W.A., & Avila, S.L.M. (2001). Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. *Guanabara Koogan*, 2: 147-159.
4. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. (2001). Diagnóstico Microbiológico. São Paulo, *MEDSI*, 5: 795-865.
5. Oliver, A., Cánton, R., Campo, P., Baquero, F., Blázquez, J. (2000). High frequency of hypemutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 3: 1251.
6. Georgopapadakou, N.H. (2005). Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 5: 181-191.
7. Von Baum, H., Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 503-511.
8. Dancer, S.J. (2001). The problem with cephalosporins. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48: 463-478.
9. Amorim, J. A. (1999). Fitoterapia popular e saúde da comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba. MSc Thesis. Universidade de São Paulo. 206p.
10. Nascimento, G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Rev Bras Microbiol*, 31: 48-53.
11. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., & Polissiou, M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39-44.
12. Piddock, L.J.V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 382-402.
13. Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Reps* 21, 263-277.
14. Prado, J. (2005). Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Pteridophyta – Pteridaceae. *Rodriguésia*, 56: 85-92.

15. Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P.G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*, 55: 705-731.
16. Ambrósio, S.T. & Barros, I.C.L., (1997). Pteridófitas de uma área remanescente de floresta atlântica do estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 11(2): 105-113.
17. Corrêa, M.P. (1984). *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. 1th ed. Min. da agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro. 687 p.
18. NCCLS (2003). National committee for clinical laboratory standards. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test. Atlanta, USA, 8, 2-8.
19. Brasileiro, B.G., Pizziolo, V.R., Raslan, D.S., Jamal, C.M., Silveira, D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz J Pharm Sci*, 42: 195-202.
20. Matos, F.J.A. (2009). *Introdução à química experimental*. 3th ed. Universidade Federal do Ceará, Edições UFC. 148 p.
21. Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, S.L., Mclaughlin, M.L. (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of medicinal chemistry*, 39: 3107-3113.
22. Nicolson, K., Evans, G., O'toole, P.W. (1999). Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiology letters*, 179: 233-239.
23. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International journal of food microbiology*, 94: 223-253.
24. Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-kala, K., Mattila S.T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von, W.A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46: 3590-3595.
25. Coutinho, H.D.M., Matias, E.F.F., Santos, .K.K.A., Tintino, S.R., Souza, C.E.S., Guedes, G.M.M., Santos, F.A.D., Costa, J.G.M., Falcão-Silva., V.S., Siqueira-Júnior, J.P. (2010). Enhancement of the Norfloxacin Antibiotic activity by Gaseous Contact With the Essencial Oil of *Croton zehntneri*. *Journal of young Pharmacists*, 2: 4.
26. Coutinho, H.D.M., Costa, J.G., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P. (2008). Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54: 328-330.
27. Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16: 97-110.

Table 1. Origin of bacterial strains and profile of resistance at antibiotics.

Bacteria	Origin	Resistance Profile
<i>Escherichia coli</i> 27	Surgical wound	Aztreonan, Amoxacillin, Amicillin, Amoxillin, Cefadroxil, Cefadroxil, Cphalothin, Ceftazididima, iprofloxacin, Chloraphenicol, Imipenem, Kanamycin, Sulphametrim, Tetracycline and Tobramycin.
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Surgical wound	Oxacillin, Gentamicin, Tobramycin, Amicillin, Kanamycin, Neomycin, Paramomicin, Butirosin, Sisomicin and Netilmicin.
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Uroculture	Cfepime, Ceftazidime, Imipenem, Ciprofloxacin, Piperacilin Levofloxacin, Merpenem and Amicillin

Table 2. Phytochemical screening of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

METABOLITES															
	Alkaloids	Anthocyanidins	Anthocyanins	Aurones	Catechins	Chalcones	Flavones	Flavonones	Flavonols	Flavononols	Phenols	Leucoanthocyanidins	Xanthones	Pyrogallics Tannins	Saponins
HFPC	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
EAFPC	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

(+) presence; (-) ausence; EAFPC, ethyl acetate fraction from *Pityrogramma calomelanos*; HFPC, hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos*.

Table 3: Evaluation of antifungal and antibacterial activity of hexane fraction (HFPC) and ethyl acetate fraction (EAFPC) of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ($\mu\text{g/mL}$)		
Srains	HFPC	EAFPC
<i>C. albicans</i> (ATCC 40227)	≥ 1024	≥ 1024
<i>C. krusei</i> (ATCC6538)	≥ 1024	≥ 1024
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	≥ 1024	≥ 1024
<i>E. coli</i> (ATCC 10536)	≥ 1024	≥ 1024
<i>S.aureus</i> (ATCC 25923)	≥ 1024	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥ 1024	≥ 1024

Hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (HFPC); Ethyl acetate fraction *Pityrogramma calomelanos* (EAFPC).

Table 4. Evaluation of modulator antifungals effect of hexane fraction (HFPC) and ethyl acetate fraction (EAFPC) of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

	<i>C. albicans</i>			<i>C. krusei</i>			<i>C. tropicalis</i>		
	ALONE	+ HF	+ EAF	ALONE	+ HF	+ EAF	ALONE	+ HF	+ EAF
Anfoterycin B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazole	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nystatin	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	128	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024

Hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (HFPC); Ethyl acetate fraction *Pityrogramma calomelanos* (EAFPC).

Table 5. Evaluation of modulator antibacterial effect of hexane fraction (HFPC) and ethyl acetate fraction (EAFPC) of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	ALONE	+ HF	+ EAF	ALONE	+ HF	+ EAF	ALONE	+ HF	+ EAF
Amikacin	5000	9,765	9,765	78,125	78,125	625	1250	1250	1250
Kanamycin	2500	312,5	2500	156,25	156,25	39,06	2500	2500	2500
Gentamicin	625	625	625	312,5	4,88	4,88	1250	1250	1250
Neomycin	156,25	156,25	156,25	156,25	156,2	19,53	625	625	625

Hexane fraction of *Pityrogramma calomelanos* (HFPC); Ethyl acetate fraction *Pityrogramma calomelanos* (EAFPC).

Carta de submissão

Dear Dr. Coutinho,

Your submission entitled “Phytochemical and modulatory activity of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.” has been received by Central European Journal of Chemistry.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on the Editorial Manager as an author. The URL is <http://ceic.edmgr.com/>

Your will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Transfer of Copyyriigth Agreement is available at:

<http://www.versita.com/UserFiles/File/Autors/CEJC/TCA-CEJC.pdf>

Please read the terms of this agreement, print and then fill, sing and send a scanned document by email to the Editor of this journal.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards.

ARTIGO 4**Enhancement of antimicrobial activity of antibiotics and antifungals by the use of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.**

Short Title: *Pityrogramma calomelanos*

TEÓGENES M SOUZA¹, MARIA FB MORAIS-BRAGA¹, JOSÉ GM COSTA²,
ANTÔNIO AF SARAIVA³, HENRIQUE D.M. COUTINHO^{1*}

¹ *Laboratory of Microbiology and Molecular Biology;* ² *Laboratory of Natural Products Research;* ³ *Laboratory of Paleontology, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil.*

* Corresponding author:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract

In this work, the ethanol extract and methanol fraction of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link were evaluated to antibacterial, antifungal and modulatory activity against strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*. The antimicrobial activity of the natural products was evaluated by microdilution method associated or not with aminoglycosides and antifungals. The ethanol extract and methanol fraction of *P. calomelanos* showed good activity against *S. aureus* when associated with aminoglycosides and with benzoilmetronidazole against the species of genus *Candida*. These results indicate that *P. calomelanos* can be studied as a possible source of natural products to combat bacteria and fungi directly or modulating the mechanisms of resistance of these microorganisms, enhancing the antimicrobial activity of these drugs and combating the microbial resistance.

Keywords: Antimicrobial activity; ethanol extract; methanol fraction; *Pytirogramma calomelanos*; modifying antibiotic activity.

INTRODUCTION

Nosocomial infections represent a serious problem of public health, causing a significant increase in morbidity, mortality and hospital costs (Boyce, 2001). Among the major pathogens involved in these infections, *Staphylococcus aureus* is one of the most important causal agents (Moraes et al., 2000). The clinical manifestations of *S. aureus* can be cutaneous or systemic (Ferreira & Ávila, 2001). The cutaneous symptoms include: folliculitis, boils, carbuncles and the skin scalded syndrome staphylocococic. *S. aureus* is frequently isolated in post-surgical wounds, and is therefore, a serious risk to systemic infections. When cause bacteremia, that bacteria can produce endocarditis, osteomyelitis, piocardite and meningitis (Koneman et al., 2001).

Other clinical important bacteria are *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *E. coli* has been identified as the primary cause of infections urinary tract, neonatal meningitis, nosocomial septicemia and enteritis. *P. aeruginosa* also is among the bacteria of greater clinical relevance, causing infections in immunocompromised patients as occurs in cystic fibrosis where the secretions stasis make possible the colonization by this bacterium. Furthermore, this bacterium present high rate of mutations, that result in progressive resistance to antibiotics and difficult the anti-infective therapy (Oliver et al., 2000).

In this context, a growing and important problem is the increase of bacterial resistance to antibiotics (Georgopapadakou, 2005). The resistance against two or more classes of antimicrobials has been a common finding reported in human and veterinary medicine, limiting the therapeutic options available (Von Baum & Marre, 2005). To the patients, the resistance at antibiotics increases the morbidity and mortality, while that to the institutions of health means increase of costs (Dancer, 2001).

In folk medicine, the plants are used alone or together with the use of conventional medicines (Amorim, 1999). In this association, the medicinal plants or yours sub-products can act inhibiting or increase the therapeutic effect of conventional drugs (Nascimento et al., 2000). The plants with therapeutics properties used in folk medicine are an important source of news biologically active compounds. The uses of extracts with antimicrobial agents present a low possibility of microorganisms acquire resistance because are complex mixtures (Daferera et al., 2003). Modifiers of antibiotic activity is a term used to substances that modulate or even reverse bacterial resistance to specific antibiotics, how is the case of several natural products of plant origin (extracts and phytoconstituents) that change the microbial susceptibility to antibiotics for inhibition of efflux of pumps (Pidcock, 2006; Gibbons, 2004).

The family Pteridaceae presents greater morphological diversity, the most of species occurs in tropics and arid regions. There are 50 genus and 950 species (Prado, 2005). *Pityrogramma* is a genus with about of 17 species occurring mainly in Tropical America (Smith et al., 2006). The specie *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link is used as ornamental and medicinal plant (Ambrósio & Barros, 1997; Corrêa, 1984).

Due to the lack of data about the biological activity of the Brazilian ferns and due the serious problems of resistance to antibiotics, the objective of this work is identify qualitatively the chemical composition of *P. calomelanos*, as well evaluate the antimicrobial and modulatory of antibiotic activity of ethanol extract and methanol fraction from leaves of *P. calomelanos*.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial and Fungal strains

The bacterial strains used were: *E. coli* (EC-ATCC10536 and EC27), *S. aureus* (SA-ATCC25923 and SA358) and *P. aeruginosa* (ATCC15442 e PSU03) with profile of resistance showed in Table 1. The fungal strains used were: *Candida albicans* ATCC 40227, *C. krusei* ATCC 6538 and *C. tropicalis* ATCC 13803. All the strains were kept in heart infusion Agar slants (HIA; Difco) and before of assays, the cells were cultured during 24h at

37°C in brain heart infusion (BHI, Difco). All the strains were obtained of collection microorganisms of Laboratory of Clinical Mycology - UFPB.

Plant Material

Leaves of *P. calomelanos* were collected in the city of Crato, Ceará, Brazil. The plant material was identified by Dr. Antônio Álamo Feitosa Saraiva, of Regional University of Cariri, Brazil, and voucher specimen have been deposited with the identification number 5570 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” of Universidade Regional do Cariri – URCA.

Drugs

Solutions with 5 mg/mL of antibiotics amikacin, kanamycin, gentamicin and neomycin were prepared and these drugs were obtained from Sigma Co. (St. Louis, USA). About to antifungal drugs, were prepared solutions of 1024 µg/ml to anphotericin B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazole (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nystatin (Brazilian Laboratory Teuto S/A, Brazil), and Benzoilmetronidazol (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil). The solutions of antibiotic and antifungals were prepared allowing the recommendations of NCCLS (2003).

Preparation of ethanol extract (EEPC) and methanol fraction (MFPC) of leaves P. calomelanos

The leaves (950 g) were dried and kept at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of ethanol 95% as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure, respectively (Brasileiro et al., 2006). 950 g of aerial parts yielded 50g of ethanol extract. 40 g of EEPC was fractionated with methanol producing 14,3 g of methanol fraction. The ethanol extract and methanol fraction were diluted using DMSO.

Phytochemical Screening

The phytochemical assays is to use for qualitative analysis of the presence secondary metabolites as: heterosides, saponins, tannins, flavonoids, steroids, triperpens, cumarins, quinones, organics acids and alkaloids were performed allowing the method described for Matos (2009). The tests are based in the observation of color modification and precipitates formation after the addition of specific reagents. The Table 2 present the metabolites observe in ethanol extract and methanol fraction.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined in BHI 10% by method of microdilution, using a suspension of 10^5 UFC/mL and an initial drug concentration 1024

$\mu\text{g/mL}$ for fungi and $5.000 \mu\text{g/mL}$ for bacteria (JAVADPOUR et al., 1996). The MIC was defined as the lowest concentration at which no growth was observed. To the evaluation of the ethanol extract and methanol fraction as modulators of resistance to antibiotics and antifungal agents, the sub-inhibitory concentration was used associated with the antibiotic solution ($\text{MIC}/8 = 128 \mu\text{g/mL}$). The plates were incubated for 24 horas at 37°C . To visualize the bacterial growth, were used resazurine. No dye was used in the fungal assay.

RESULTS AND DISCUSSION

Neither EE or MF demonstrated an antimicrobial activity clinically relevant to fungi or bacteria. The values of MIC are exposed in Table 3. However, in the modulation assay, was verified that ethanol extract and methanol fraction modulators the most of antibiotics tested against *S. aureus*, with exception to amikacin associated with MF and neomycin with EE, indicating a relevant property of this fraction and extract to enhance the action of aminoglycosides against *S. aureus*. Against *E. coli*, the ethanol extract promoted modulation of the action of amikacin and kanamycin. Against *P. aeruginosa* was not observed modulatory activity. In the modulation of antifungal activity was observed that MF modulated the antifungal action of Benzoilmetranidazole against *C. albicans*. Against *C. Krusei* and *C. tropicalis*, the EE promoted the modulation in effect of Benzoilmetranidazole. These results are the first reports about the antimicrobial or modulatory activities of *P. calomelanos*.(Table 4 and 5).

The mechanisms by which the extracts may inhibit the grown of microorganisms are several, and can due at hydrophobic nature of some components. This components can interact with the lipid layer of the cell membrane, affecting the respiratory chain and energy production, or even make the cell more permeable at antibiotics, leading to disruption of vital cellular activity (Nicolson et al., 1999; Burt, 2004). Varied components of extracts or fractions increase the permeability of the cell, raising the penetration of antibiotics (Helander et al., 1998). This mechanism can be obtained by combination of antibiotics with extract or fractions in concentration sub-inhibitory applied directly to the culture medium (Coutinho et al., 2010a). None report about the modulatory activity was found associated with a fern. However, several natural products from plants and animals have been studied to this activity (Ferreira et al., 2009; Coutinho et al., 2010b; Rodrigues et al., 2009).

This strategy is called "herbal shotgun" or " synergistic multi-effect targeting" and refers to the utilization of plants and drugs in an approach using mono- or multi-extract combinations,

which can affect not only a single target but various targets, where the different therapeutic components collaborate in a synergistic-agonistic manner. This approach is not only meant for combinations of extracts; combinations between natural products or extracts and synthetic products or antibiotics are also possible (Coutinho et al., 2008; Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009).

The results obtained in this study are promising and can incentive future researchs about pharmacological aspects and toxicity of subproducts of *P. calomelanos* with the objective of promote the possible using rational in the antifungal and antibacterial therapy as well resolve in parts the question of resistance at antibiotics.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies FUNCAP and CNPq.

REFERENCES

- Ambrósio, S.T. and I.C.L. Barros (1997). Pteridófitas de uma área remanescente de floresta atlântica do estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Brasilica* **11**: 105-113.
- Amorim, J.Á. (1999). *Fitoterapia popular e saúde da comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde em Campina Grande, Paraíba*. MSc Thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, 206p.
- Boyce, J.M. (2001). MARSAs patients: proven methods to treat colonization and infection. *J. Hosp. Infec.* **48**: 9-14.
- Brasileiro, B.G., V.R. Pizziolo, D.S. Raslan, C.M. Jamal and D. Silveira (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006; **42**: 195-202.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253.
- Corrêa, M.P. (1984). *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. 1th ed. Min. da agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 687 p.
- Coutinho, H.D.M., J.G.M. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva and J.P. Siqueira Jr (2008). Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* **54**: 328-330.
- Coutinho, H.D.M., E.E.F. Matias, K.K.A. Santos, S.R. Tintino, C.E.S. Souza, G.M.M. Guedes, F.A.D Santos, J.G.M. Costa, V.S. Falcão-Silva and J.P. Siqueira-Júnior (2010a). Enhancement of the Norfloxacin Antibiotic activity by Gaseous Contact With the Essencial Oil of *Croton zehntneri*. *J. Young Pharma.* **2**: 362-364.
- Coutinho, H.D.M., J.G.M. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva and J.P. Siqueira Jr (2010b). Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **131**: 106-108.
- Daferera, D.J., B.N. Ziogas and M.G. Polissiou (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop. Protect.* **22**: 39-44.
- Dancer, S.J. (2001). The problem with cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemoth.* **48**: 463-478.
- Ferreira, F.S., S.V. Brito, J.G.M. Costa, R.R.N. Alves, H.D.M. Coutinho and W.O. Almeida (2009). Is the body fat of the lizard *Tupinambis merianae* effective against bacterial infections? *J. Ethnopharmacol.* **126**: 233-237.
- Ferreira, W.A. and S.L.M. Ávila (2001). *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 147-159.
- Georgopapadakou, N.H. (2005). Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. *Drug Res. Updates* **5**: 181-191.
- Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* **21**: 263-277.

Helander, I.M., H.L. Alakomi, K. Latva-kala, S.T. Mattila, I. Pol, E.J. Smid, L.G.M. Gorris and W.A. Von Wright (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agricult. Food Chem.* **46**: 3590-3595.

Javadpour, M.M., M.M. Juban, W.C. Lo, S.M. Bishop, J.B. Alberty, S.M. Cowell, S.L. Becker and M.L. Mclaughlin (1996). *De novo* antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* **39**: 3107-3113.

Koneman, E.W., S.D. Allen and W.M. Janda (2001). *Diagnóstico Microbiológico*. MEDSI, São Paulo, 795-865.

Matos, F.J.A. (2009). *Introdução à química experimental*. 3th ed. Universidade Federal do Ceará, Edições UFC, Fortaleza, 148 p.

Moraes, B.A., C.A. Cravo, M.M. Loureiro, C.A. Solari, and M.D. Asensi (2000). Epidemiological analysis of bacteria strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. *Rev. Inst. Med. Tropical* **42**: 201-207.

Nascimento, G.F., J. Locatelli, P.C. Freitas and G.L. Silva (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Rev. Bras. Microbiol.* **31**: 48-53.

NCCLS - National committee for clinical laboratory standards (2003). *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*. NIH, Atlanta.

Nicolson, K., G. Evans and P.W. O'toole (1999). Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 233-239.

Oliver, A., R. Cánton, P. Campo, F. Baquero and J. Blázquez (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **3**: 1251.

Piddock, L.J.V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 382-402.

Prado, J. (2005). Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Pteridophyta – Pteridaceae. *Rodriguésia* **56**: 85-92.

Rodrigues, F.F.G., J.G.M. Costa and H.D.M. Coutinho (2009). Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine* **16**: 1052-1055.

Smith, A.R., K.M. Pryer, E. Schuettpelz, P. Korall, H. Schneider and P.G. Wolf (2006). A classification for extant ferns. *Taxon* **55**: 705-731.

von Baum, H. and R. Marre (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 503-511.

Wagner, H. and G. Ulrich-Merzenich (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **16**: 97-110.

Table 1. Origin of bacterial strains and profile of resistance at antibiotics.

Bacteria	Origin	Resistance Profile
<i>Escherichia coli</i> 27	Surgical wound	Aztreonan, Amoxicillin, Amicillin, Amoxillin, Cefadroxil, Cefadroxil, Cphalothin, Ceftazidima, iprofloxacin, Chloraphenicol, Imipenem, Kanamycin, Sulphametrim, Tetracycline and Tobramycin.
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Surgical wound	Oxacillin, Gentamicin, Tobramycin, Amicillin, Kanamycin, Neomycin, Paramomicin, Butirosin, Sisomicin and Netilmicin.
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Uroculture	Cfepime, Ceftazidime, Imipenem, Ciprofloxacin, Piperacilin Levofloxacin, Merpenem and Amicillin

Table 2. Phytochemical screening of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

METABOLITES															
	Alkaloids	Anthocyanidins	Anthocyanins	Aurones	Catechins	Chalcones	Flavones	Flavonones	Flavonols	Flavononols	Phenols	Leucoanthocyanidins	Xanthones	Pyrogallics Tannins	Saponins
EEPC	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
FMPC	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

(+) presence; (-) ausence; EEPC, ethanol extract of *Pityrogramma calomelanos*); MFPC, methanol extract from *Pityrogramma calomelanos*.

Table 3. Evaluation of antifungal and antibacterial activity of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ($\mu\text{g/mL}$)		
Strains	EEPC	MFPC
<i>C. albicans</i> (ATCC40227)	≥ 1024	≥ 1024
<i>C. krusei</i> (ATCC6538)	≥ 1024	≥ 1024
<i>C. tropicalis</i> (ATCC13803)	≥ 1024	≥ 1024
<i>E. coli</i> (ATCC10536)	≥ 1024	≥ 1024
<i>S.aureus</i> (ATCC25923)	≥ 1024	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC15442)	≥ 1024	≥ 1024

Table 4. Evaluation of modulatory antifungal effect of ethanol extract (EE) and methanol fraction (MF) of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

	<i>C. albicans</i>			<i>C.krusei</i>			<i>C.tropicalis</i>		
	ALONE	+ EE	+ MF	ALONE	+ EE	+ MF	ALONE	+ EE	+ MF
Anphotericin B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazole	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nystatin	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazole	≥1024	≥1024	128	≥1024	256	≥1024	≥1024	256	≥1024

Table 5. Evaluation of modulatory antibacterial effect of ethanol extract (EE) and methanol fraction (MF) of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

	<i>E. coli 27</i>			<i>S. aureus 358</i>			<i>P. aeruginosa 03</i>		
	Alone	+ EE	+ MF	Alone	+ EE	+ MF	Alone	+ EE	+ MF
Amikacin	≥5000	312,5	1250	78,125	9,765	78,125	1250	1250	1250
Kanamycin	2500	625	2500	156,25	39,06	39,06	2500	2500	2500
Gentamicin	625	625	625	312,5	4,88	4,88	1250	2500	2500
Neomycin	156,25	156,25	156,25	156,25	156,25	39,06	625	625	625

Carta de submissão

From: Henrique Douglas Coutinho [mailto: hdmcoutinho@gmail.com]

To: bcurci@bio.bq.ac.rs

Sent: Sun, 16 Oct2011 17:47:50 + 0200

Subject: Re: Fw: Informations

Dear editor, I would like to submit to be evaluated by the referees of **ARCHIVES BIOLOGICAL SCIENCES** the article entitled “enhancement of antimicrobial activity of antibiotic and antifungals by the use of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.

I affirm that all authors are according with this submission and this article is not being considered for publication elsewhere. I affirm too the copyright will be under authorization of the publisher.

This article is according with to the international, national and institutional rules considering biodiversity rights.

Sincerely yours.

ARTIGO 5**Additive effects of *Pityrogramma calomelanos* L. (Link.) combined with aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*****ABSTRACT**

Background & Objectives: This study is the first report about the enhancement of additive effect of *Pityrogramma calomelanos* L. (Link) associated with aminoglycosides against a multiresistant *Staphylococcus aureus*. In this study, the ethanol extract and the ethyl acetate fraction were assayed to identify the relationship between these natural products and the aminoglycosides using the checkerboard method.

Methods: The checkerboard assay was realized to verify if the relationship between these drugs and natural products represent a synergistic, additive, indifferent or antagonistic effect.

Results: All natural products and antibiotics assayed demonstrated an additive effect, with FIC index = 0.5.

Interpretations & Conclusions: These results indicate that the ethanol extract and the ethyl acetate fraction of *P. calomelanos* can be a source of plant derived products with antibiotic modifier activity, affecting positively the antibiotic activity of aminoglycosides.

Keywords: *Pityrogramma calomelanos*; checkerboard method; aminoglycosides; *Staphylococcus aureus*; additive effect.

Sir,

With the increase of the antibiotic resistance, the research about the antimicrobial activities of natural products becomes an interesting alternative^{1,2}. Several plant extracts and phytochemicals present important antimicrobial properties, showing a great significance in the therapeutic treatments of several diseases as demonstrated by several scientific reports^{3,4}.

Pityrogramma calomelanos (Pteridaceae), known in Brazil as “avenca-branca” or “avenca-preta” is used as ornamental and medicinal plant. Natural products isolated from this plant as flavonoids, terpenes, chalcones, phenols, present several biological activities reported in the literature: adstringent, analgesic, anti-hemorrhagic, depurative, anti-hypertensive, anti-pyretic and stimulating of blood circulation⁵⁻⁹.

The aminoglycosides are potent antibiotics that affect the bacterial ribosome, been the enhancement of the resistance to these antibiotics widely recognized as a serious health problem¹⁰. The main mechanisms of resistance to aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* is the active efflux and enzymatic inactivation¹¹. In this study, we assayed the ethanol extract and acetyl acetate fraction of *P. calomelanos* as a resistance modifying agent against a multiresistant strain of *S. aureus*.

The experiments were performed in the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (Department of Biological Chemistry) in the University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil. The experiments were performed with clinical *S. aureus* isolate (SA358) presenting multiresistance to antibiotics¹². The strains were maintained in heart infusion agar slants (HIA, Difco, USA), and prior to assay, the cells were grown overnight at 37°C in brain heart infusion agar (BHI, Difco).

Leaves of *P. calomelanos* were collected in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva of University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil, and a voucher specimen have been deposited with the identification number 5570 at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima”, University of the Region of Cariri, Crato, CE, Brazil. The antibiotics used were gentamicin, amikacin and neomycin, and were obtained from Sigma Chemical Co., USA. All drugs were dissolved in sterile water.

Leaves of the plant (950 g) were dried and kept at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 3 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The homogenate was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator (Q-344B – Quimis, Brazil) and ultrathermic bath (Q-214M2 - Quimis, Brazil) under 60°C and 760mm/Hg of temperature and pressure,

respectively¹². Each 500 g of aerial parts yielded 26.3 g of ethanol extract. 20 g of ethanol extract of *P. calomelanos* (EEPC) was fractionated with ethyl acetate, obtained 9.25 g of ethyl acetate fraction of *P. calomelanos* (EAFPC). For the tests, the dry ethanol extract and ethyl acetate fraction were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO).

Only the SA358 strain was tested by the microdilution checkerboard technique¹³. In order to evaluate the activity of combinations of drugs, fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated as $FIC^A + FIC^B$, where FIC^A and FIC^B represent the minimum concentrations that inhibited the bacterial growth for drugs A and B, respectively: $FIC^A = MIC^A \text{ combined} / MIC^A$ alone and $FIC^B = MIC^B \text{ combined} / MIC^B$ alone. Mean FIC index was calculated based on the following equation: $FIC \text{ index} = FIC^A + FIC^B$ and the interpretation made as follows: synergistic (<0.5), additive (0.5-1.0), indifferent (>1), or antagonistic (>4.0).

Additive effect aminoglycosides was observed with combination of EEPC and EAFPC and all aminoglycosides tested. The combinations of EEPC and EAFPC and amikacin, gentamicin and neomycin showed a FIC index of 0.5 (Table).

This strategy is named as “herbal shotgun” or “synergistic multi-target effects” and refers to the use of herbals and drugs in a multitargeted approach, due the fact of mono or multi-extract combinations affecting not only a single target, but several ones, co-operating in an agonistic-synergistic way. This approach is not exclusive for extract combinations, but combinations between single natural products or extracts with chemosynthetics or antibiotics are also possible¹⁴⁻¹⁸.

P. calomelanos is used in the folk medicine. However, there is not data in the literature about the combinatory effect of natural products from this plant with synthetic drugs. These are the first results published with the specie *P. calomelanos* demonstrating the additive effect of the association with aminoglycosides. The additive effect of these natural products with antibiotics may represent an interesting approach in the antibiotic therapy. In conclusion, *P. calomelanos* could represent a source of natural products with modifying antibiotic activity, being an interesting alternative to combat infectious agents with multiresistance to antibiotics.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP, by the financial support.

REFERENCES

1. Lu Y, Zhao YP, Wang ZC, Chen SY, Fu CX. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Actinidia macrosperma* from China. *Nat Prod Res* 2007; 21 : 227-33.
2. Mbwambo ZH, Moshi MJ, Masimba PJ, Kapingu MC, Nondo RS. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. *BMC Complement Altern Med* 2007; 7 : 9.
3. Benoit-Vical F, Grellier P, Abdoulaye A, Moussa I, Ousmane A, Berry A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of *Momordica balsamina* alone or in a traditional mixture. *Chemotherapy* 2006; 52 : 288-92.
4. Gibbons S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Rep* 2004; 21 : 263-77.
Barros ICL, Andrade LHC (1997): Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins). Recife, Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco.
5. Barros ICL, Andrade LHC (1997): Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins). Recife, Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco.
6. Fujio A, Munekazu I, Thoshiyuki T, Mizuo, M. 1991. Complex flavonoids in farinose exudate from *Pityrogramma calomelanos*. *Phytochemistry*, 30: 3091-3093.
7. Victor B, Baldwin SM, Ken H, Jon C. (1978): Sesquiterpenes from *Pityrogramma calomelanos*. *Phytochemistry* 17: 275-277.
8. Sukuruman K, Ramadasan K (1991): Screening of 11 ferns for cytotoxic and antitumor potential with special reference to *Pityrogramma calomelanos*. *J. Ethnopharmacol* 34: 93-96.
9. Dervilla MXD, Mary JM, Brandan OD (1979): Strukturell Neuartige 4 phenyl- Benzopyran-2-one aus *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. *Tetrahedron letters* 44: 4269-4272.
10. Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 70 :140-50.
11. Smith E, Williamson M, Wareham N, Kaatz G, Gibbons S. Antibacterial and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry* 2007; 68 : 210-7.
12. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9: 13.
13. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: MD; 1991. p. 434-41.

14. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Júnior JP. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* 2010; 131: 106-8.
15. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 2009; 16 : 97-110.
16. Rodrigues FFG, Costa JGM, Coutinho HDM. Enhancement of the antibiotic activity of gentamicin by volatile compounds of *Zanthoxylum articulatum*. *India J Med Res* 2010; 131: 833-5.
17. Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. *Lat Am J Pharm* 2010; 29: 1049-52.
18. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008a; 54: 328-30.

Table. Fractional Inhibitory Concentration (FIC) of antibiotics aminoglycosides and the effect of combinations with ethanol extract (EE) and ethyl acetate fraction (EAF) against *S. aureus* 358.

FIC A				FIC B				FIC index (type of interaction)
Ami	39,06	Ami + EE	19,53	EE	512	EE + Ami	4	0,5 (additive)
Gen	39,06	Gen + EE	19,53	EE	512	EE + Gen	4	0,5 (additive)
Neo	39,06	Neo + EE	19,53	EE	512	EE + Neo	4	0,5 (additive)
Ami	39,06	Ami + EAF	19,53	EAF	64	EAF + Ami	4	0,5 (additive)
Gen	39,06	Gen + EAF	19,53	EAF	128	EAF + Gen	4	0,5 (additive)
Neo	39,06	Neo + EAF	19,53	EAF	64	EAF + Neo	4	0,5 (additive)

Ami - Amikacin; Gen - Gentamicin; Neo - Neomycin; EE – Ethanol Extract; EAF – Ethyl Acetate Fraction

Carta de submissão

Dear Dr. Coutinho

Indian Journal of Medical Research has your manuscript entitled “Additive effects of *Pityrogramma calomelanos* L. (Link.) combined with aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*” for consideration for publication. The reference number for this manuscript is “**IJMR_647_11**”. Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

We thank you for submitting your valuable work to the Indian Journal of Medical Research.

Yours sincerely,

The Editorial Team

Indian journal of Medical Research

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A fitoquímica de *Pityrogramma calomelanos* apresentou inúmeros metabólitos de interesse farmacológico como: alcalóides, saponinas, flavonóides, fenóis e terpenos.

O extrato etanólico e frações de *P. calomelanos* não apresentaram ação antimicrobiana clinicamente relevante quando testados de forma isolada.

Na modulação de antifúngicos foi verificado que apenas o benzoilmetronidazol sofreu modulação quando associado aos produtos naturais de *P. calomelanos*.

Na modulação de antibacterianos foi visto que, a gentamicina promoveu os melhores resultados, pois sofreu modulação com todos os produtos naturais de *P. calomelanos* testados.

Não foi observado efeito modulador dos produtos naturais de *P. calomelanos* frente à *Pseudomonas aeruginosa* 03.

Extrato etanólico e fração acetato de etila contribuíram de forma aditiva para a inibição do crescimento de *S. aureus* 358 quando associado à fármacos aminoglicosídeos.

A fração hexânica apresentou citotoxicidade nula quando testado em três concentrações diferentes. Já o EE, FAE e FM apresentaram níveis citotóxicos relativamente altos.

A fração hexânica apresentou os melhores resultados tripanocidas em termos de citotoxicidade.

A fração hexânica poderá ser utilizada em pesquisas futuras para isolamento de seus constituintes, com o objetivo de serem testados contra formas epimastigotas de *T cruzi*.

A atividade leishmanicida do extrato e frações mostrou-se clinicamente ineficaz.

O efeito antioxidante foi melhor observado para o extrato etanólico, assemelhando-se ao ácido ascórbico (padrão).

Este foi o primeiro relato científico sobre ensaios microbiológicos e citotóxicos de *Pityrogramma calomelanos*, merecendo destaque os bons resultados encontrados para a fração hexânica frente a formas epimastigotas de *T cruzi*.

Este trabalho contribui para um maior conhecimento sobre a espécie *Pityrogramma calomelanos* e conseqüentemente as pteridófitas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M. B. R.; FERREIRA, R. C. C.; PADILLA, G.; FERREIRA, L. C. S.; COSTA, S. O. P. Altered Expression of Oligopeptide-Binding Protein (OppA) and Aminoglycoside Resistance in Laboratory and Clinical *Escherichia coli* strains. **Journal of Medical Microbiology**, 49: 409-413. 2000.
- AKERELE, O. **Herbal Gram**, 28: 13, 1993.
- AMBRÓSIO, S. T. & BARROS, I. C. L. Pteridófitas de uma área remanescente de Floresta Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, 11: 105-113, 1997.
- BARROS, I. C. L. & ANDRADE, L. H. C. **Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)**. Recife, Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 1997.
- BASTOS, C. C. C. & CUTRIN, M. V. J. Pteridoflora da Reserva florestal do Sacavém, São Luis – Maranhão. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, 15: 3-37. 1999.
- BERG, M. E. Plantas medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém, **Museu paraense Emílio Goeldi**, 207 p. 1993.
- BRADE, A. C. Contribuição para o estudo da Flora Pteridofítica da Serra do Baturité, Estado de Ceará. **Rodriguésia**, 4: 289-314, 1940.
- BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, 42: 195-202, 2006.
- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN, V. W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 40: 2592-2597, 1996.
- CALIXTO, J. B. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 49: 433–437, 1997.
- C.D.C. *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin - United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 51: 565-567, 2002.
- CHERYL, A. L. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2: 45, 2006.
- CHOPRA, R. N.; CHOPRA, J. C.; HONDA, K. L.; APUR, L. D. **Indigenous Drugs of India**. Calcutta: U.N. Dhur & Sons, 1958.
- COLLINSON, M. E. “What use are fossil ferns?” – 20 years on: with a review of the fossil history of extant pteridophyte families and genera. In: CAMUS, J. M.; GIBBY, M. & JOHNS, R. J. (eds.). *Pteridology in Perspective*. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 349-394, 1996.

CORBELLA X.; DOMÍNGUEZ, M. A.; PUJOL, M.; AYATS, J.; SENDRA, M.; PALLARES, R.; ARIZA, J.; GUDIOL, F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, 16: 351-357, 1997.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, 1984.

COSTA, D. M. L. Ototoxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos e sistema eferente: comparação entre a administração aguda e crônica com a gentamicina e os efeitos agudos de outros antibióticos. **Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, 19: 186-196, 1999.

CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, 19: 502-508, 2003.

CUNDLIFFE, E. Self-Protection Mechanisms in Antibiotic Producers. Ciba Found. **Symposium**, 171: 199-214, 1992.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, 54: 328-330, 2008.

CULEBRAS, E.; MARTINEZ, J. L.; Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme 6'-N- Aminoglycoside Acetyltransferase-2-O-Aminoglycoside Phosphotransferase. **Front Biosci**, 4: 1-8, 1999.

DALBOSCO, V.; SROUGI, M.; DALL'OGGIO, M. Infecções do trato urinário. **Revista Brasileira de Medicina**, 60: 149-155, 2003.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. Leishmaniasis. In: COOK, G. C.; ZUMLA, A. (eds). **Manson's Tropical Diseases**, Londres: W. B. Saunders, 1339-1364, 2003.

DERVILLA, M. X. D.; MARY, J. M.; BRANDAN, O. D. Strukturell Neuartige 4 phenyl-Benzopyran-2-one aus *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. **Tetrahedron letters**, 44: 4269-4272, 1979.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The Southern Cone initiative against Chagas disease, In: **Advanced Parasitology**, 42: 1-27, 1999.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. (eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 48-74, 2000.

DUJARDIN J-C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, 22: 4-6, 2006.

FREITAS, C. C.; ESPÓSITO, R. C.; CABALLIDO, J. M.; ARAGÃO, T.V. G. Resistência e Tolerância a antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes do HUAP-UFF, **Revista Brasileira de Medicina**, 46: 312-316, 1989.

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.

FUJIO, A.; MUNEKAZU, I.; THOSHIYUKI, T.; MIZUO, M. Complex flavonoids in farinose exudate from *Pityrogramma calomelanos*. **Phytochemistry**, 30: 3091-3093, 1991.

FUNARI, C. S., FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev Bras Farmacogn**, 15: 178-182. 2005.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: Novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Médica**, 66: 99-105, 2000.

GENARO, O. & REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 47-66. 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**, 21: 263-277, 2004.

GILBERT, D. N. Aminoglycosides. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. **New York: Churchill Livingstone**, 279-306, 1995.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, L. B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, 36: 71-80, 2003.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, 27: 91-93, 2006.

HARBORNE, J. B. & BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Francis, 1993.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-Resistance *Staphylococcus aureus* a New Model of Antibiotic Resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, 1: 147-155, 2001.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese Hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* Heterogeneously to Vancomycin. **The Lancet**, 350: 1670-1673, 1997.

HUBERT, S. K., *et al.* Glicopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus*: Evaluation of a novel Screening Method and Results of a Survey of Selected U, S. Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, 37: 3590-3593, 1999.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied microbiology and biotechnology**, 70: 140–150, 2006.

KISKA, D. L. & GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas*. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Tenover, M. C.; & Tenover, R.H. (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, D.C. **American Society for Microbiology**, 1: 719-728, 2003.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, E. D.; JANDA, S. D.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 5. Ed. Buenos Aires. **Médica Panamericana**, 1999.

LAGHARI, A. H.; MEMON, S.; NELOFAR, A.; KHAN, K. M.; YASMIN, A. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. **Food Chemotherapy**, 126: 1850–1855. 2011.

LE SENNE, A.; MUELAS-SERRANO S.; FERNANDEZ-PORTILLO, C.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97: 1101–1105, 2002.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Ecologia e Conservação da Caatinga. **Editora Universitária – UFPE**, 1ª ed., Recife – PE, 2003.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* infections. **New England Journal of Medicine**, 313: 445-447, 1985.

LÉVI-STRAUSS, C. A ciência do concreto. In: O pensamento selvagem. Campinas: **Papirus**, 15-50, 1989.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. G. *Staphylococcus aureus*: super bug, super genome? **Trends in Microbiology**, 12: 378-385, 2004.

LIU, Y. AND ENGLUND, P. T. The dynamics of Kinetoplast DNA replication. **Molecular Microbiology**, 64: 676-690, 2007.

LYRA, A. L. R. T. Efeito do relevo na vegetação de duas áreas do município do Brejo da Madrede Deus (PE). I – Condições climáticas. In: **Anais do XXXV Congresso Nacional de Botânica**, Porto Alegre, 263-277, 1983.

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

DUARTE. M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciência**. 2006.

MAY, L. W. The economic uses and associated folklore of ferns and fern allies. **The Botanical Review**, 4: 491-528, 1978.

MELO, S. K. Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). **Universidade Federal de Ouro Preto**, 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15: 127-130, 2001.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: **Robe Editorial**, 1999.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. *et al.*, Parasitologia Humana. **Atheneu**, 41-46, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: **Centro Nacional de Epidemiologia**, 2^o edição atualizada, 182 p, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota Técnica Doença de Chagas Aguda por transmissão oral. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27898, 2007.

MOLNAR, J.; MOLNAR, A.; SPENGLER, G., MANDI, Y. Infectious plasmid resistance and efflux pump mediated resistance. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, 51: 333-349, 2004.

MOORE, R. A.; DESHAZER, D.; RECKSEIDLER, S.; WEISSMAN, A.; WOODS, D. E. efflux mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 43: 465-470, 1999.

MORAN, R. C. Polypodiaceae. In Psilotaceae a Salviniaceae (R.C. Moran & R. Ribas, eds.). In Flora Mesoamericana. (G. Davidse, M. Souza & S. Knapp, orgs.). **Universidad Nacional Autónoma de México**, Ciudad de México, 1: 333-365, 1995.

MORS, W. Plantas Mediciniais. **Ciências Hoje**, Rio de Janeiro, 1: 51-54, 1982.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, 336, 1561-1577, 2005.

LINUMA, M.; TANAKA, T.; ASAI, F.; MIAIUCHI, K.; WOLLENWEBER, E. Spectral characters of a complex flavonoid isolated from the farinose exudates of *Pityrogramma calomelanos*. **Phytochemistry**, 33: 1247-1248, 1993.

NASCIMENTO, G. G.; F, LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31: 247-256, 2000.

NCCLS. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test. **Atlanta**, USA, 8: 2-8, 2003.

NISHI, H.; KOMATSUZAWA, H.; FUJIWARA, T.; MCCALLUM, N.; SUGAI, M. Reduced Content of Lysyl-Phosphatidylglycerol in the Cytoplasmic Membrane Affects Susceptibility to Moenomycin, as Well as Vancomycin, Gentamicin, and Antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48, 4800-4007, 2004.

NOVAIS, T. S.; Costa, J. F. O.; David, J. P. L.; David, J. M.; Queiroz, L. P.; França, F.; Giulietti, A. M.; Soares, M. B. P.; Santos, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 13: 5-8, 2003.

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet Infectious Diseases**, 2: 180-189, 2002.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal Cardiovascular Surgery**, 21: 444-452, 2006.

PACIENCIA, M. L. B. Diversidade de Pteridófitas em gradientes de altitude na Mata Atlântica do Paraná, Brasil. 230p. 2008.

PALOMBO, E. A.; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of Australian plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Journal Basic Microbiology**, 42: 444-448, 2002.

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**, 32: 27, 1992.

PRADO, J. & SUNDUE, M. Typification and identity of *Adiantum tetragonum* (Pteridaceae). **American Fern Journal**, 95: 89-93, 2005.

PRADO, J. Flora Da Reserva Ducke, Amazônia, Brasil: Pteridophyta – Pteridaceae. **Instituto De Botânica**, Seção de Briologia e Pteridologia. São Paulo, SP, 2005.

PRADO, J. Pteridófitas do estado de São Paulo. In: BICUDO, C. E. M & SHEPHERD, G. J. (ed.). Biodiversidade do Estado de São Paulo: Síntese do Conhecimento ao Final do século XX – Fungos Macroscópicos e Plantas. **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo**. São Paulo, 49-61, 1998.

RAJILICESTOJANOVIĆ, M.; SMIDT, H.; de VOS, W. M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. **Environmental Microbiology**, 9: 2125–2136, 2007.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE J. H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova** 26: 550-553, 2003.

REIS, V. W. Fatores de risco da diarreia humana associado às condições de saneamento básico em Ouro Preto, MG. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). **Universidade Federal de Ouro Preto**, 2007.

RECIO, M. C. & RIOS, J. L. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the lieteratura 1978-1988. **Phytotherapy Research**, 3: 117-125, 1989.

REY, L. Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: ecologia, epidemiologia e controle. In: Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 13, 179-199, 2001.

SABRÁ, A. ECEP, ECET, ECEA, ECEH, ECEI, ECAD: a *E. coli* revisitada no contexto da diarreia aguda . **Jornal de Pediatria**, 77: 5-7, 2002.

SADERI, H.; OWLIA, P.; SHANRBANOOIE, R. Vancomycin Resistance Among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Archives Iranian Medicine**, 8: 100-103, 2005.

SIQUEIRA, A. M. Subfilo Mastigophora. In: NEVES, D. P; MELO, A. L.; GENARO, O;

LINARD, P. M. Parasitologia Humana. 11. ed. São Paulo: **Atheneu**, cap. 6, 37-4, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessidade da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12: 35-40, 2002.

SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H. & WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxon**, 55:705-731, 2006.

SPOO, J. R.; RIVIERE, J. E. Antibióticos Aminoglicosídeos. In: SPOO, J. R.; RIVIERE, J. E. Antibióticos Aminoglicosídeos. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 8: 703-719, 2003.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 11: 16-21, 1999.

TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; KIUCHI, F. *In vitro* Leishmanicidal constituents of *Millettia pendula*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, 6: 915 - 917, 2006.

TAVARES, W. Aminociclitolis aminoglicosídeos. In: TAVARES W, ed. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo: **Atheneu**, 573-626, 2001.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33: 281-301, 2000.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas. Resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [on line], 2001.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 1: 780 p. 2008.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. E. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMAN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 5: 1234-1241, 1999.

TROVÃO, D. M. B. M.; SILVA, S. C.; SILVA, A. B.; JUNIOR, R. L. V. Estudo comparativo entre três fisionomias da caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. **Revista de Biologia e ciências da terra**, 4: 2, 2004.

TRYON, R. M. & TRYON, A. F. Ferns and Allies plants with Special References to Tropical America. - **SpringerVerlag**, New York, Heidelberg, Berlin, 1982.

TRYON, R. M. The biogeography of species, with special reference to ferns. **The Botanical Review**, New York, 52: 117-156, 1986.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. & KRAMER, K. U. Pteridaceae, *In* The families and genera of vascular plants. (K.U. Kramer & P.S.Green, eds.) Springer Verlag, Berlin, **Pteridophytes and Gymnosperms, 1**: 230-256, 1990.

VALDIR, F.; JUNIOR, V.; ANGELO, C. Pinto. Plantas Mediciniais: Cura Segura? **Química Nova**, 28: 519-528, 2005.

VEGA, C.; ROLON, M.; MARTÍNEZ-FERNANDEZ, A. R.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotas expressing beta-galactosidase. **Parasitology Research**, 95: 296-298, 2005.

VICTOR, B.; BALDWIN, S. M.; KEN, H.; JON, C. Sesquiterpenes from *Pityrogramma calomelanos*. **Phytochemistry**, 17: 275-277, 1978.

VIEIRA, R. H. S. F. Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado. São Paulo: **Varela**, 380p. 2004.

WHO - World Health Organization. Police perspectives on medicines. Geneva: **World Health Organization**, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Life cycle of *Leishmania* sp. (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>), 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/leish-poster.pdf>), 2005.

WHO - World Health Organ fact sheet n° 340. Chagas disease (American trypanosomiasis). Located: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> accessed: September 2010.

WINDISCH, P. G. Pteridófitas da Região Norte-Occidental do Estado de São Paulo – **Guia para excursões**. 2a ed. Campus de São José do Rio Preto - SP: UNESP, 110 p. 1992.

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**, 20: 367-372, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

**PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES AO TRABALHO
DESENVOLVIDO**

Resumos publicados em anais de congressos

SOUZA, T. M. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; COUTINHO, H. D.M. ; SARAIVA, A. A. F. ; MENEZES, I. R. A. ; COSTA, J. G. M. ; TINTINO,S.R . Enhancement of antibiotic activity of aminoglycosides by natural products from *Pityrogramma calomelanos* against *Escherichia coli*. In: **26 Congresso Internacional de Microbiologia**, 2011, Foz do Iguaçu.

SOUZA, T. M. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; COUTINHO, H. D.M. ; SARAIVA, A. A. F. ; COSTA, J. G. M. ; MENEZES, I. R. A. ; SOUZA,E.S.S ; GUEDES,G.M.M . Modifying-antibiotic activity of natural products from *Pityrogramma calomelanos* associated with aminoglycosides against MRSA. In: **26 Congresso Internacional de Microbiologia**, 2011, Foz do Iguaçu.

ANEXO 2

PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS DE CO-AUTORIA

BRAGA, M.F.B.M.; **SOUZA, T.M.**; SANTOS, K. K.A.; GUEDES, G.M.M ; SOUZA, E.S.S ; COSTAS, J.G.M.; MENEZES, I.R.A ; SARAIVA, A.A.F; COUTINHO, H.D.M. Potentiation of aminoglycosides antibiotic activity by *Lygodium venustum* (sw) against mrsa. In: **26 Congresso Internacional de Microbiologia**, 2011, Foz do Iguaçu.

BRAGA, M.F.B.M.; **SOUZA, T.M.**; SANTOS, K.K.A. ; GUEDES,G.M.M ; TINTINO,S.R; TAVARES.C.C.A ; LEITE, N.F. ; COSTAS, J.G.M. ; SARAIVA, A.A.F ; COUTINHO, H. D.M . In vitro interference of *Lygodium venustum* in the *Escherichia coli* resistance to aminoglycosides. In: **26 Congresso Internacional de Microbiologia**, 2011, Foz do Iguaçu.

BUENO, D.C.; NOGARA, P.A.I.; SARAIVA, R.A.; SARAIVA, R.A.; BRAGA, M.F.B.M.; **SOUZA, T.M.**; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; SARAIVA, A.A.F.; ROCHA, J.B.T.; identificação de polifenóis e atividade antioxidante de extratos e frações das folhas de *Pityrogramma calomelanos* L. (Link). (Pteridaceae) e *Lygodium venustum* SW. (Schizaeaceae). III SIMPÓSIO DE BIODIVERSIDADE – Filosofia da Ciência e a Prática Científica. Santa Maria, RS, 2011.

ANEXO 3

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

MARIA F. B. MORAIS-BRAGA¹, TEÓGENES M. SOUZA¹, KARLA K. A. SANTOS¹, JACQUELINE C. ANDRADE¹, GLÁUCIA M. M. GUEDES¹, SAULO R. TINTINO, CELESTINA SOBRAL-SOUZA¹, JOSÉ G. M. COSTA², IRWIN R. A. MENEZES³, ANTONIO A. F. SARAIVA⁴, HENRIQUE D. M. COUTINHO¹. Antimicrobial and Modulatory Activity of Ethanol Extract of the Leaves from *Lygodium venustum* SW. American Fern Journal, Volume 102, 2012.

SANTOS, I.J.M.; MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; BRAGA, M.F.B.M. ; ANDRADE, J.C.; **SOUZA, T.M.**; SANTOS, F.A.V.; SOUSA, A.C. A. ; COSTA, J.G.M. ; MENEZES, I.R.A.; ALVES, R. R.N.; ALMEIDA, W. O. ; COUTINHO, H.D.M. . Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) Used by the Traditional Medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print) , 2012.

COUTINHO, H. D.M. ; MATIAS, E.F.F ; SANTOS, K. K. A. ; SANTOS, F.V.A ; MORAIS - BRAGA, M. F. B. ; Andrade, Jacqueline C. ; **SOUZA, T. M.** ; TINTINO, S.R ; GUEDES, G.M.M ; Falcão S.V.S ; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P ; COSTAS, J. G. M. ; SOUZA, E.S.S . Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. Biomédica (Bogotá), 2011.

ARARUNA, M. K. A. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; **SOUZA, T. M.** ; BRITO, S. A.; SANTOS, K. K. A. ; LEITE, T. R. ; COSTAS, J. G. M. ; COUTINHO, H. D.M. . Evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of pilocarpine and rutin. Indian Journal of Medical Research, 2011.