

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Avaliação das atividades antibacteriana e amebicida dos extratos aquoso e
etanólico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Tese de Doutorado

Luís César de Castro

Porto Alegre, 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Avaliação das atividades antibacteriana e amebicida dos extratos aquoso e
etanólico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Luís César de Castro
Farmacêutico – UFSM

Tese de Doutorado apresentada como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Orientador(a): Dr^a. Sueli T. Van Der Sand
Coorientador: Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil
Junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu Deus e Senhor, doador da vida, cujo Amor me constrange. És Tu, Senhor, meu Castelo Forte, digno de toda honra, glória e louvor.

A todos docentes do PPGMAA, cuja amizade, encorajamento, orientações e cooperação foram fundamentais para execução desse trabalho.

A Professora Sueli T. Van Der Sand e ao Professor José Carlos Germani, de modo muito especial, pela compreensão e amizade em momentos de debilitação da saúde, orientação, dedicação, apoio e estímulo incalculáveis, que foram de total necessidade e importância durante a realização deste trabalho.

À Professora Marilise Brittes Rott, pela contribuição impar, mediante a disponibilização do Laboratório de Parasitologia, que foi fundamental para realização deste trabalho.

A todos colegas e amigos, discentes no PPGMAA, que contribuíram das mais diversas formas, tanto na realização deste trabalho, quanto nas disciplinas cursadas durante o doutoramento. Em especial aos colegas Ismael e Aleksander, pela contribuição mais que necessária e qualificada na realização deste trabalho.

Aos colegas professores e estudantes/laboratoristas do Centro Universitário UNIVATES, aqui representados nos professores e amigos Carla Kauffmann, Eduardo Miranda Ethur, Luciana Carvalho Fernandes e Rodrigo Dall’Agnol e a colega Farmacêutica Juliana de Souza que contribuíram de modo técnico e amigável, bem como do desprendimento dispensados das mais diversas formas, durante os momentos mais dolorosos durante a realização de todas atividades no doutoramento.

Aos membros de minha família, em especial a meu irmão Luciano, minha irmã Luciana, e meu pai Walmor (*in memorium*), que viveram comigo nossa mais dolorosa e longa dor, pela perda de nosso anjo cuidador, nossa Mãe e esposa, durante o período de realização do doutoramento.

In memorium, agradeço a minha Mãe que, durante as madrugadas se dirigia comigo até POA, para a frequência às aulas, apenas para impedir a presença do sono, garantindo minha segurança, e que, junto de meu Pai, teve seus sonhos juvenis ceifados em favor da permissão de meu nascimento, e da minha educação e de meus irmãos. “*Porque para mim tenho por certo que os sofrimentos do tempo presente não podem ser comparados com a glória a ser revelada em nós*” - Romanos 8:18. Mãe, se eu pudesse começaria tudo, tudo de novo. Guardarei as palavras que recebestes e me ensinastes: “*Entrega teu caminho ao SENHOR, confia nele e o mais Ele fará*” - Salmo 37:5.

In memorium, agradeço a meu Pai, que me acolheu desde o ventre de minha mãe e cujos ensinamentos foram ímpares, e que ao Senhor Jesus coube resgatar e salvar, ainda no leito da dor e da morte. Obrigado a ti, grande

herói, que nada me deixou faltar. *“O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará”*
- Salmo 23:1.

Ao amor doado, perdido e rapidamente resgatado em meu coração, que guarda um pedaço de meu corpo e meus pensamentos. Te prometo pedir perdão e perdoar, sempre, meu Castelo Forte Adjunto.

Aos que contribuem nos meus esforços em prol dos cuidados e na educação de minhas filhas: suas mães, seus avós (Gelci e Rui, pais de adoção) e bisavós. *“Se o SENHOR não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam; se o Senhor não guardar a cidade, em vão vigia o sentinela”* - Salmo 127:1.

A minha filha Eveline, cujos anos, meses e dias de vida me são de lembrança constante, em cada dia, desde seu nascimento, e durante a realização de todas atividades de trabalho e ensino, incluindo as realizadas neste trabalho. Obrigado pelo amor e luta que representas.

A minha filha Laura, cuja sabedoria, alegria e amor ultrapassam meu entendimento, cuja existência justifica todos os momentos de dedicação no trabalho. A ti, minha melhor amiga, meu amparo e que, juntamente com a Eve, são meus maiores presentes divinos, agradeço por toda beleza que representam em minha vida e companhia na busca e aceite da Redenção e Salvação em Cristo. *“Herança do SENHOR são os filhos; o fruto do ventre, seu galardão”* - Salmo 127:3.

*“TODAS as coisas cooperam para o bem daqueles que amam
a Deus, que são chamados segundo o seu propósito”.
(Romanos 8:28)*

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E AMEBICIDA DOS
EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE *Acanthospermum australe*
(Loelf.) O. Kuntze¹**

Autor: Luís César de Castro
Orientador(a): Dr. Sueli T. Van Der Sand
Coorientador: Dr. José Carlos Germani

RESUMO

As plantas medicinais têm sido amplamente empregadas, constituindo parte das ferramentas terapêuticas utilizadas no controle das mais variadas moléstias humanas. Neste estudo, foi objetivado a verificação das atividades antibacteriana e antiparasitária de extratos aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe*. Os extratos etanólico e aquoso de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze foram obtidos por maceração estática a frio em etanol/água (9:1), e por infusão, em água deionizada, a 90°C, respectivamente. Ambos foram filtrados e os solventes removidos a 40°C, a pressão reduzida. O rendimento do extrato etanólico foi de 12,8% p/p e do extrato aquoso foi de 17,1% p/p. Os extratos secos foram reconstituídos em metanol para obter concentração final de 100 µg/mL e 200 µg/mL. A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), pelo método de difusão em ágar, e a atividade amebicida frente à *A. polyphaga* (ATCC 30461). O efeito citotóxico dos extratos foi testado em células de mamíferos utilizando brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol2-il]-2,5-difeniltertrazólio (MTT), sendo que ambos apresentaram efeito citotóxico contra células de linhagem VERO (ATCC CCL-81). Foi observada a inibição de crescimento dos microrganismos bacterianos por ambos os extratos, nas concentrações testadas. O extrato etanólico, na concentração de 10 mg/mL, apresentou 100% de letalidade a trofozoítos de *A. polyphaga* (ATCC 30461) nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL, em 24 h. Paralelamente, foi realizada a análise fitoquímica dos extratos aquoso e etanólico para a determinação de compostos fenólicos (taninos, flavonóides, ácidos fenólicos e antraquinonas), alcalóides e compostos terpênicos. Os extratos apresentaram perfis qualitativamente semelhantes, caracterizados pela presença de taninos, flavonóides, ácidos fenólicos e compostos terpênicos.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (XX p.) – Junho de 2012.

ANTIBACTERIAL AND AMEBICIDAL ACTIVITY EVALUATION OF AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze¹

Author: Luís César de Castro
Supervisor: Dr. Sueli T. Van Der Sand
Co-Supervisor: Dr. José Carlos Germani

ABSTRACT

Medicinal plants have been widely employed, constituting part of the therapeutic tools used in the control of various human diseases. In this study, was aimed do verify the antibacterial and amebicidal active evaluation of aqueous and athanolic extracts of *Acanthospermum austral*. The aqueous and ethanolic extracts of *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze were obtained by static maceration in cold ethanol / water (9:1), and infusion in deionized water at 90°C, respectively. Both were filtered and the solvents were removed at 40°C under reduced pressure. The yield of a ethanolic extract was 12.8% p/p and the aqueous extract was 17.1% w/p. The dried extracts were reconstituted in methanol to obtain final concentration of 100 µg/mL and 200 µg/mL. The antibacterial activity of extracts was evaluated against the bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) by agar diffusion method, and the amebic activity against *A. Polyphaga* (ATCC 30461). The cytotoxic effect of the extracts was tested in mammalian cells using bromide of 3-[4,5-dimethyl-tiazol2-yl]-difeniltertrazólio -2.5 (MTT), both of which showed cytotoxic effect against Vero cell line (ATCC CCL -81). It was observed inhibition of bacterial growth of microorganisms by both extracts at the concentrations tested. The ethanolic extract at a concentration of 10 mg/mL, showed 100% lethality of the trophozoites of *A. Polyphaga* (ATCC 30461) in concentrations of 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg / mL in 24 hours. In parallel, we performed the phytochemical analysis of aqueous and ethanolic for the determination of phenolic compounds (tannins, flavonoids, phenolic acids and anthraquinones), alkaloids and terpene compounds. The extracts showed qualitatively similar profiles, characterized by the presence of tannins, flavonoids, phenolic acids and terpene compounds.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (XX p.) – June de 2012.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	4
2.1. Asteraceae.....	4
2.1.1 A espécie <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) O. Kuntze.....	5
2.1.2. Fitoquímica e Atividade Farmacológica.....	8
2.1.3. Atividades Farmacológicas e Etnofarmacologia.....	9
2.2. Gênero <i>Acanthamoeba</i>	11
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	14
3.1. Artigo Científico aceito para publicação na revista <i>Caderno Pedagógico</i> , em 28 de maio de 2012.....	14
3.2 . Artigo Científico submetido à revista <i>Brazilian Journal of Medicinal Plants</i> em 24 de abril de 2012.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL.....	44
4.1. Análise Fitoquímica dos Extratos Aquoso e Etanólico de <i>A. australe</i>	44
4.2. Atividade Antibacteriana dos Extratos Aquoso e Etanólico de <i>A. australe</i>	45
4.3. Atividade Amebicida dos Extratos Aquoso e Etanólico de <i>A. australe</i>	47
4.4. Atividade Citotóxica dos Extratos Aquoso e Etanólico de <i>A. australe</i> sobre células de mamíferos.....	49
5. CONCLUSÕES.....	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	59
ANEXO A. Meio Proteose Peptona - Extrato de Levedo - Glicose (PYG).	59

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Genótipos de <i>Acanthospermum australe</i> e suas associações com doenças humanas (ceratites e encefalites).....	13
----------	---	----

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) O. Kuntze.....	6
Figura 2	Ocorrência de <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) O. Kuntze.....	7
Figura 3	Distribuição geográfica de <i>Acanthospermum australe</i>	8
Figura 4	Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i>	11
Figura 5	Cistos de <i>Acanthamoeba</i>	12

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AP2 – *Acanthamoeba polyphaga* 2

ATCC – *American Type Culture Collection*

AVL – amebas de vida livre

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

CECT – Central Institute of Classical Tamil

Cm – Centímetro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

mg – Miligrama

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

mL – Mililitro

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

°C – Graus Celsius

pH – potencial hidrogeniônico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal

µm – Micrômetro

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais é quase tão antigo quanto à civilização humana. Estes vegetais tem servido como fonte constante de substâncias biologicamente ativas e possibilitado o tratamento de uma gama de doenças. O estudo de plantas com atividade antimicrobiana e antiparasitária é uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos.

Neste contexto, a família *Asteraceae*, dotada de elevada diversidade química e biológica, tem sido caracterizada como uma importante fonte de plantas e, conseqüentemente, substâncias farmacologicamente ativas.

A família *Asteraceae* contém por volta de 1.100 gêneros, com aproximadamente 25.000 espécies, e representa cerca de 10% da biota mundial. Embora 98% das *Asteraceae* sejam plantas de pequeno porte, a família também inclui arbustos ou subarbustos, trepadeiras, algumas árvores (raramente) e espécies aquáticas. A principal característica da família é a organização das flores em conjuntos denominados capítulos.

Entre os representantes desta família, *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, popularmente conhecida como carrapichinho ou carrapicho-de-carneiro, tem merecido atenção, pois, trata-se de uma espécie vegetal encontrada nas regiões tropicais e subtropicais das Américas e da África. No

Brasil encontra-se amplamente distribuída, podendo ser localizada desde a região Norte até a região Sul do país.

Tendo em vista a sua capacidade de crescer de modo abundante em solos agrícolas e pastagens, esta planta tem sido encarada como uma espécie invasiva. Entre a população humana destas regiões, os seus ramos são amplamente utilizados sob a forma de “chás”, sendo considerados tônicos, diaforéticos, eupépticos, vermífugos, antidiarréicos, antimaláricos, antiblenorrágicos, febrífugos e antianêmicos. Mediante o uso oral, inúmeros são os relatos para o tratamento de estagnações sangüíneas, reumatismos e artrites e, topicamente, em inchaços e hemorragias.

No Rio Grande do Sul, preparações desta planta vêm sendo utilizadas para o tratamento de “infecções” ou “inflamações” do trato urinário.

Mediante a alegação de dados efeitos terapêuticos em humanos, grande parte dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica são isolados de plantas medicinais. Devido ao amplo espectro de substâncias biologicamente ativas passíveis de serem isoladas de plantas medicinais a investigação de suas mais amplas atividades justificam a busca de novos compostos, isolados ou consorciados, que possibilitem o emprego medicamentoso dos mesmos.

Acanthamoeba polyphaga é considerada um patógeno oportunista que pode causar encefalite amebiana granulomatosa e ceratite crônica amebiana, bem como passível de ser associada com lesões cutâneas e sinusite em pacientes imunocomprometidos.

Desta forma, considerando as indicações de uso, bem como a necessidade e a importância da avaliação de plantas ou substâncias dotadas de potenciais propriedades antimicrobianas, objetivou-se verificar as potenciais atividades antibacteriana e antiparasitária de extratos aquoso e etanólico de *A. australe*, bem como a análise de citotoxicidade sobre células de mamíferos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

2.1. Asteraceae

Excetuando o continente Antártico, a família Asteraceae apresenta ampla distribuição em todas as partes do mundo, nos mais variados ecossistemas (HEINRICH *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2006). Sua principal ocorrência é percebida nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul (VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005).

Principal constituinte entre as Angiospermas, a família Asteraceae apresenta por volta de 25.000 espécies, distribuídas em 1.100 gêneros (MARTINS *et al.*, 2006; VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005), dos quais, cerca de 180 apresentam ocorrência em solo brasileiro (MARTINS *et al.*, 2006).

Embora cerca de 98% das Asteraceae sejam plantas pequenas, a família também inclui plantas subarbustivas, trepadeiras, raramente arbóreas e espécies aquáticas. A principal característica da família é a organização das flores em conjuntos denominados capítulos (CRONQUIST, 1981; HEINRICH *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2006).

É atribuído aos representantes da família Asteraceae propriedades medicinais, destacando entre os mesmos a *Arnica montana* L. (Arnica), *Artemisia absinthum* L. (Losna), *Calendula officinalis* L. (Calêndula), *Cynarascolumus* L.

(Alcachofra), *Matricaria chamomilla* (Camomila) (HEINRICH *et al.*, 2004) e *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze (Carrapichinho), de grande ocorrência no Brasil (ADATI, 2006).

Entendidas como espécies vegetais de crescimento indesejável, as plantas definidas como invasoras normalmente são percebidas por aspectos negativos (LORENZI, 2000a; VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005). Disseminam-se de modo eficiente, visto sua alta produção de sementes e rápido desenvolvimento (LORENZI, 2000a). Entretanto, apresentam potencial capacidade de proteção do solo quanto à erosão (VERDI, BRIGHENTE, PIZZOLATTI, 2005). Considerando estes aspectos culturais, seu manejo pode ser facilitado e estratégico, à medida que potencialidades terapêuticas e farmacológicas possam ser verificadas e entendidas.

Representantes da família Asteraceae apresentam importantes aspectos econômicos, tanto enquanto alimentos (Alcachofra, Alface, Girassol), quanto ornamentais (Margaridas) e medicinais (Artemísia, Camomila), além de invasoras (Dente-de-leão) (JOLY, 1998).

2.1.1. A espécie *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze

Dentre os representantes da família Asteraceae, *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, popularmente conhecida como carrapichinho ou carrapicho-de-carneiro, tem sido estudada. Sua ocorrência é percebida nas regiões tropicais e subtropicais da América e África.

Originária da América Tropical, *Acanthospermum australe* (FIGURA 1) constitui-se como uma planta herbácea, anual e prostrada, de caules

pubescentes e arroxeados, medindo de 20 a 40 cm de comprimento (LORENZI, 2000a/b). É uma planta muito variável, cujas folhas podem ser simples, inteiras ou de margens irregularmente serradas, medindo de 1,5 a 3,5 cm de comprimento. Possui capítulos terminais, com poucas flores de cor amarela e seus frutos são providos de projeções rígidas. Reproduz-se por sementes (LORENZI, 2000a; LORENZI e MATOS, 2002).



Figura 1 – *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze.

Fonte: http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/carrapicho-rasteiro_54.html, em 30 de janeiro de 2012.

A espécie *Acanthospermum australe* ocorre, enquanto planta invasiva, nos mais diversos solos, principalmente no campo e no cerrado de textura arenosa, pastagens e terrenos baldios (LORENZI, 2000a; LORENZI e MATOS, 2002) (FIGURA 2). A diminuição da ocorrência pode ser determinada pela correção das condições de fertilidade do solo (LORENZI, 2000a).



Figura 2 – Ocorrência de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze.

Fonte: http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/carrapicho-rasteiro_54.html
em 30 de janeiro de 2012.

No Brasil, encontra-se amplamente distribuída, podendo ser localizada em estados da região Norte até a região Sul do país. A ocorrência, no Brasil, se dá desde o Piauí até o Rio Grande do Sul, principalmente no estado de Goiás (FIGURA 3) (ADATI, 2006).



Figura 3 – Distribuição geográfica de *Acanthospermum australe*

Fonte: Adaptado de Adati, 2006.

Devido a sua capacidade para crescer de forma abundante em solos agrícolas, pastagens e terrenos baldios tem sido considerada como uma espécie invasiva (LORENZI e MATOS, 2002).

Shimizu *et al.* (1987) relataram o uso da planta, por via oral, para o tratamento de estagnações sangüíneas, reumatismos e artrites e, topicamente, em inchaços e hemorragias. No estado do Rio Grande do Sul, preparações da planta tem sido utilizadas para diferentes finalidades, entre elas o tratamento de “infecções” ou “inflamações” do trato urinário.

2.1.2. Fitoquímica e Atividade Farmacológica

A partir de extratos brutos etanólicos das partes aéreas de *A. australe*, foram isolados 6-metóxi flavonóides, quercetina, ácido caféico, além de

flavonóides trifolina, hiperina, rutina, penduletina, axilarina, crisosplenol D, 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (Inibidores da Aldolase) (DEBENEDETTI *et al.*, 1987; SHIMIZU *et al.*, 1987).

Segundo Adati (2006), *A. australe* apresenta, nas partes aéreas, flavonóides, taninos, saponinas, mucilagens e óleo essencial, constituído em sua maioria por sesquiterpenos. Ainda, segundo Martins *et al.* (2006), as mesmas partes aéreas apresentam diterpenos. Adati (2006) identificou diterpenos como timol e isotimol. Matsunaga, Saitoh e Ohizumi (1996) isolaram o acanthostral (com atividade antineoplásica), a partir do extrato benzênico de *A. australe*.

2.1.3. Atividades Farmacológicas e Etnofarmacologia

Independentemente ao fator insegurança, não percebido pelos usuários de plantas medicinais, somado à inexistência de estudos que comprovem a eficácia e segurança da espécie, tanto folhas como raízes tem sido empregadas na forma de chás, produtos de infusão e decocção, devido as propriedades medicinais a elas atribuídas em práticas caseiras (LORENZI e MATOS, 2002). Aos autores reportam que *A. australe* é entendida como tônica, diaforética, eupética, vermífuga, antidiarréica, antimalárica, aromática, antiblenorrágica, febrífuga, antianêmica. Ainda é utilizada no tratamento de erisipela, tosses, bronquite e, especialmente, em doenças do sistema urinário.

A via oral é utilizada para tratamento de estagnações sanguíneas, reumatismos e artrites, bem como o uso externo, na forma de banho, é alternativa para uso em inchaços e hemorragias (MARTINS *et al.*, 2006), além

da indicação contra dores lombares, renais, úlceras, feridas e micoses (LORENZI e MATOS, 2002). Na Colômbia, segundo Garcia-Barriga (1975) *apud* Adati (2006), extratos da planta íntegra de *A. australe* têm sido utilizados no tratamento do câncer.

Extratos de *A. australe* apresentaram parcial atividade frente a *Plasmodium falciparum*, em ratos infectados (LORENZI e MATOS, 2002). Segundo Adati *et. al.* (2006), extratos hidroetanólicos e liofilizados de clorofórmio demonstraram importante atividade antiprotozoária frente a *Plasmodium chabaudi*, também causador de malária. Macêdo *et al.* (1997) reportam atividade larvicida de *A. australe* sobre larvas de *Aedes fluviatilis*. Mendes *et al.* (1999) reportam não haver atividade moluscicida do extrato etanólico de *A. australe*, frente ao modelo experimental utilizado.

Adati (2006) observou significativa atividade antifúngica frente a *Aspergillus niger*, utilizando extrato hidroetanólico liofilizado das partes aéreas de *A. australe*. Mediante a verificação da atividade antifúngica sobre fungos leveduriformes e dermatófitos, empregando extrato aquoso, diclorometano e metanólico das partes aéreas de *A. australe*, Portillo *et al.*, (2001) verificou importante atividade do extrato diclorometanólico frente a *Cladosporium cladosporioides* CECT 2111, *Fusarium oxysporum* var. *pinaster*, *Microsporium gypseum* CECT 2908 e *Trichophyton mentagrophytes* CECT 2795. Quanto ao extrato aquoso, somente frente a *Microsporium gypseum* CECT 2908 foi percebida atividade pouco significativa.

Mediante o emprego de tinturas de folhas da *A. australe*, Mirandola (2002) expressou que extratos da espécie vegetal podem apresentar atividade imune antitumoral na indução de tumores hematopoiéticos em ratos.

2.2. Gênero *Acanthamoeba*

Acanthamoeba é um gênero de protozoários que pertencem ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina e que compõe junto com *Naegleria fowleri* e *Balamuthia mandrillaris* as Amebas de Vida Livre (AVL) (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Apresenta microprojeções (acantopódios) responsáveis, especialmente, pela adesão a superfícies (biológicas ou inertes), movimento celular e captura de presas (KHAN, 2006).

O ciclo de vida compreende dois estágios: trofozoítico e cístico. Os trofozoítos, forma celular metabolicamente ativa, possuem normalmente um tamanho entre 12 e 35 μm de diâmetro, podendo variar entre isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos (FIGURA 4). Sua forma de divisão celular é assexuada e se dá por fissão binária (KHAN, 2006).

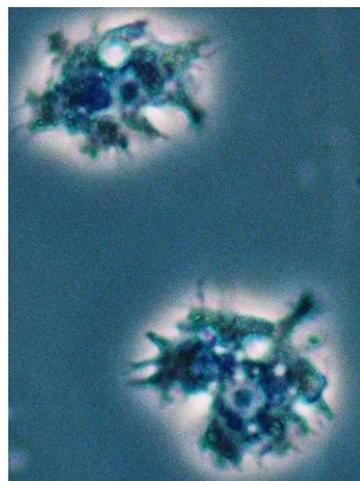


Figura 4 – Trofozoíto de *Acanthamoeba*
Fonte: Karin Caumo

Enquanto estrutura de resistência, o cisto possui tamanho de 9 a 12 μm , de ocorrência quando da deficiência nutricional do meio, dessecação, alterações no pH e alterações de temperatura (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003) (FIGURA 5). Os cistos são constituídos de celulose e proteínas, apresentando duas paredes: o endocisto e o ectocisto. Enquanto o ectocisto é mais esférico, o endocisto apresenta diversas formas poligonais, característico de determinados genótipos (ALVES, 2001; KHAN, 2006).

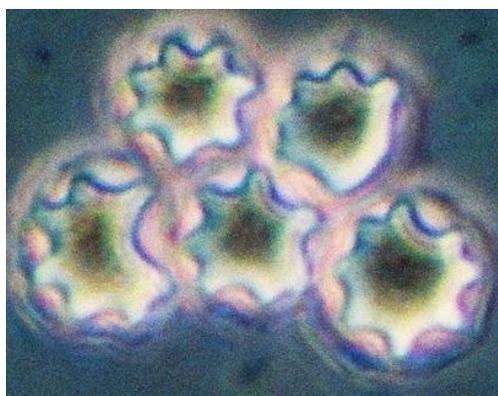


Figura 5 – Cisto de *Acanthamoeba*
Fonte: Karin Caumo

A taxonomia molecular descreve pelo menos 16 genótipos diferentes dentro do gênero *Acanthamoeba*, sendo eles nomeados T1, T2, T2a até T15, baseado no sequenciamento do gene de rRNA (STOTHARD *et al.*, 1998; MAGHSOOD *et al.*, 2005; CORSARO e VENDITTI, 2010). Os genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido isolados clinicamente como agentes causadores da ceratite amebiana, sendo o genótipo T4 o principal causador desta patologia (Tabela 1) (BOOTON *et al.*, 2005).

Isolada dos mais diversos ambientes, incluindo amostras de água da rede pública, piscinas, lagos, rios, mares, reservatórios d'água, condicionadores de ar, esgotos, sedimentos, solo, praias, vegetais,

instrumentos cirúrgicos, lentes de contatos e seus estojos e recentemente em amostras de ar atmosférico, a *Acanthamoeba* tem a habilidade de sobreviver em diversos ambientes (KHAN, 2006). Sua interação com o meio em que se encontra é bastante importante, já que podem carregar no seu interior bactérias de interesse clínico como *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella* spp., estando também associadas a fungos, vírus e outros protozoários (AKSOZEK *et al.*, 2002; ALVES, 2001; KHAN, 2006). Tais protozoários não necessitam de um hospedeiro para estabelecer seu ciclo de vida, o que designa como acidental ou oportunista as infecções causadas pelos mesmos (BOOTON *et al.*, 2005). Espécies do gênero *Acanthamoeba* podem causar graves patologias como a ceratite crônica amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa (JONES *et al.*, 1975).

Tabela 1 - Genótipos de *Acanthamoeba* e suas associações com doenças humanas (ceratites e encefalites).

Genótipo	Doença
T1	Encefalites
T2a	Ceratites
T2b	NA
T3	Ceratites
T4	Ceratites e Encefalites
T5	NA
T6	Ceratites
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Encefalites
T11	Ceratites
T12	Encefalites
T13	NA
T14	NA
T15	NA

NA – ainda não associado à doenças.

Fonte: adaptado de Khan (2006).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1. Artigo Científico aceito para publicação na revista *Caderno Pedagógico*, em 28 de maio de 2012.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extrato Aquoso e Etanólico de *Acanthospermum australe*

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extrato Aquoso e Etanólico de
Acanthospermum australe

Castro, L.C.^{1,2}; Dall'Agnol, R.²; Ethur, E.M.³; Weidlich, L.²; Kauffmann, C.^{2,3}; Sauter, I.P.¹; Muniz, A.W.⁵; Lohmann, P. M.³; Bouchacourt, O.²; Germani, J.C.^{1,6}; Van Der Sand, S.T.^{1,4}

(1) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; ICBS/UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 052, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

(2) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIVATES, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, RS, Brasil.

(3) Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, UNIVATES, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, RS, Brasil.

(4) Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS/UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 158, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

(5) Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural – CEP 69010-970, Cx Postal 319, Manaus/AM, Brazil.

(6) Departamento de Produção de Matérias Primas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3714 7000; fax: +55 51 3714 7001.

E-mail address: lucamsc@univates.br (L.C. Castro). Curso de Farmácia, UNIVATES, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, RS, Brazil

Resumo

As plantas medicinais tem sido amplamente empregadas, constituindo parte das ferramentas terapêuticas utilizadas no controle das mais variadas moléstias humanas. A atividade antibacteriana dos extratos aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze foi avaliada frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), pelo método de difusão em Agar. Foi observada a inibição de crescimento destes microrganismos por ambos os extratos, nas concentrações testadas. Paralelamente, foi realizada a análise fitoquímica dos extratos aquoso e hidroetanólico para a determinação de compostos fenólicos (taninos, flavonóides, ácidos fenólicos e antraquinonas), alcalóides e compostos terpênicos. Os extratos apresentaram perfis qualitativamente semelhantes, apresentando taninos, flavonóides, ácidos fenólicos e compostos terpênicos. *Acanthospermum australe* apresentou potencial atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Palavras chave: *Acanthospermum*, Asteraceae, atividade antimicrobiana, bactéria, flavonóides, taninos, compostos terpênicos

Abstract

Medicinal plants have been widely employed, constituting part of the therapeutic tools used in the control of various human diseases. The antibacterial activity of aqueous and ethanolic *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze was evaluated against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) by agar diffusion method. It was observed growth inhibition of microorganisms, for both extracts at the concentrations tested. In addition, phytochemical analysis was performed for the determination of phenolic compounds (tannins, flavonoids, phenolic acids and anthraquinones), alkaloids and terpene compounds. The extracts showed qualitatively similar profiles, characterized by the presence of tannins, flavonoids, phenolic acids and

terpene compounds. *Acanthospermum australe* has a potential antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Acanthospermum*, *Asteraceae*, antimicrobial activity, bacteria, flavonoids, tannins, terpene compounds.

1 Introdução

O uso de plantas medicinais é quase tão antigo quanto à civilização humana, de modo que estas têm servido como uma fonte constante de substâncias biologicamente ativas, possibilitando o tratamento de uma gama de doenças. A família *Asteraceae*, dotada de elevada diversidade química e biológica, tem sido caracterizada como uma importante fonte de plantas e, conseqüentemente, substâncias farmacologicamente ativas (Magner, 2005).

A família *Asteraceae*, contendo mais de 1100 gêneros e aproximadamente 25000 espécies, representa em torno de 10% da flora mundial. Embora, cerca de 98% das *Asteraceae* sejam plantas pequenas, a família também inclui subarbustos, trepadeiras, algumas árvores e espécies aquáticas. A principal característica da família é a organização das flores em conjuntos denominados capítulos (Cronquist, 1981). Entre os representantes desta família, *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, popularmente conhecida como carrapichinho ou carrapicho-de-carneiro, tem merecido atenção, tratando-se de uma espécie vegetal encontrada nas regiões tropicais e subtropicais da América e África. No Brasil, encontra-se amplamente distribuída, podendo ser localizada em estados da região Norte, até a região Sul do país.

Devido a sua capacidade para crescer de forma abundante em solos agrícolas, pastagens e terrenos baldios é considerada como uma espécie invasiva. Entre a população destas regiões, seus ramos são amplamente utilizados sob a forma de chás, sendo considerados como tônicos, diaforéticos, eupépticos, vermífugos, antidiarréicos, antimaláricos, antiblenorrágicos,

febrífugos e antianêmicos (Lorenzi e Matos, 2002). Shimizu et al. (1987) relataram o uso da planta, por via oral, para o tratamento de estagnações sangüíneas, reumatismos e artrites e, topicamente, em inchaços e hemorragias. No estado do Rio Grande do Sul, preparações da planta tem sido utilizada para diferentes finalidades entre elas no tratamento de “infecções” ou “inflamações” do trato urinário. Tendo em vista as diferentes aplicações populares e considerando a necessidade e a importância da avaliação de plantas ou substâncias dotadas de potencial atividade antimicrobiana, este trabalho teve como objetivo avaliar os extratos aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe* quanto à atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Material vegetal Coleta e preparo do material vegetal.

Acanthospermum australe (Loefl.) O. Kuntze foi coletada em Abril de 2009, no município de Lajeado. A exsicata foi depositada no herbário do Vale do Taquari, HVAT, do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES, com o código HVAT 2346. A planta foi submetida à secagem em uma estufa com circulação forçada de ar, por 22 horas, a uma temperatura máxima de 40°C. Após a completa secagem, o material foi moído por abrasão em peneira de aço inox (1 mm).

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

2.2.1 Obtenção do extrato etanólico (EE).

O EE de *A. australe* foi obtido por maceração estática a frio em etanol/água (9:1), utilizando-se 100 g de folhas moídas em 1,5 L do solvente. Após sete dias, o material foi filtrado e o solvente foi totalmente removido a 40°C, sob pressão reduzida, em rota-evaporador. O rendimento do EE foi de 12,8% p/p.

2.2.2 Obtenção do extrato aquoso (EA)

O EA de *A. australe* foi obtido por infusão, em água deionizada, a 90°C, utilizando 100 g de folhas moídas em 1,5 L do solvente. Após 30 minutos de repouso, o material foi filtrado e o solvente foi totalmente removido a 40°C, a pressão reduzida, em rota-evaporador. O rendimento do EA foi de 17,1% p/p.

Os extratos secos foram reconstituídos em metanol de modo a obter concentrações finais de 100 µg/mL e 200 µg/mL.

2.3 Ensaio para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e aquoso

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), adquiridos do *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos obtidos a partir das culturas estoque foram transferidos para tubos contendo ágar nutriente e mantidos à 37°C +/- 1°C, por 24 h, de modo a obter subculturas. Os inóculos bacterianos foram preparados a partir das subculturas e mantidos em condições ótimas de crescimento para cada microrganismo por 24 h. Após o período de incubação, os inóculos foram ajustados, com auxílio de uma escala de turbidez de McFarland, de modo a apresentarem uma concentração aproximada de 1.5×10^8 CFU/mL. O meio de cultura empregado para a manutenção dos microrganismos e elaboração das

subculturas foi o meio No.1 de Grove- Randall, enquanto os inóculos foram preparados utilizando-se o meio No. 3 de Grove-Randall.

As atividades antimicrobianas dos extratos etanólico e aquoso foram avaliadas separadamente, utilizando-se o método de difusão em ágar, como descrito por Schapoval et al. (1988). Alíquotas de 20 mL de meio No.11 de Grove Randall, recém preparado, foram distribuídas em placas de Petri (20x100 mm). Porções de 5 mL de meio No.11 contendo o inóculo bacteriano (0,5%) foram distribuídas diretamente sobre a superfície das placas obtidas. As placas foram deixadas em repouso por 5 minutos e cilindros de vidro (7 por placa) foram distribuídos, com auxílio de pinça esterilizada, sobre a superfície das placas inoculadas. Volumes de 200 µL dos extratos aquoso e etanólico (em concentrações de 100 ou 200 µg/mL) foram aplicados em 5 cilindros de cada placa. Em todas as placas, dois dos cilindros foram usados como controle (200 µL de metanol e 200 µL de água). No centro de cada placa, um disco de papel contendo cloranfenicol (30µg) foi utilizado como controle positivo.

2.4 Screening fitoquímico

A análise química dos extratos foi realizada utilizando-se métodos fitoquímicos padrões segundo Harborne (1998) para a determinação da presença de alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, antraquinonas e terpenos.

2.5 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas visando determinar a presença de flavonóides, taninos, fenóis simples, antraquinonas, alcalóides e compostos terpênicos nos extratos aquoso e etanólico foram realizadas em placas de gel de sílica F₂₅₄ (Merck) e envolveram a utilização dos seguintes sistemas cromatográficos: a) Flavonóides: Fase móvel: *n*-butanol-ácido acético-água;

4:1:5, fase superior; Reveladores: UV (254 e 365 nm); cloreto de alumínio + aquecimento a 110°C, seguido de visualização sob UV (365 nm); b) Taninos e fenóis simples: Fase móvel: acetato de etila-ácido fórmico-água (90:5:5); Revelador: UV (254 e 365 nm) e cloreto férrico 5% (em metanol) c) Antraquinonas: Fase móvel: acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10); Revelador: UV (254 e 365 nm) e KOH 5% SR em etanol; d) Alcalóides: Fase móvel: diclorometano-metanol (95:5); Revelador: UV (254 e 365 nm) e Dragendorff; e) Compostos terpênicos: Fase móvel: diclorometano: acetato de etila (80:20); Revelador: anisaldeído sulfúrico 5%

3 Resultados e Discussão

Microrganismos vem desenvolvendo resistência a muitos antibióticos devido à utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos, agravando os problemas clínicos no tratamento de doenças infectocontagiosas. Além disso, o uso de antibióticos está eventualmente associado a efeitos adversos que incluem hipersensibilidade, destruição da microbiota bacteriana intestinal, imunossupressão e reações alérgicas. Desta forma, há uma necessidade evidente para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos àqueles disponíveis atualmente. Para efetuar esta busca, uma abordagem de interesse consiste em avaliar plantas medicinais dotadas de potenciais propriedades antimicrobianas. Plantas medicinais representam uma fonte importante de compostos farmacologicamente ativos, e novos agentes antifúngicos e antibacterianos podem ser eventualmente obtidos a partir das mesmas (Cowan, 1999; Levy, 2000; Weckesser et al., 2007).

Os extratos aquoso e etanólico de *A. australe* foram testados para a atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, uma bactéria Gram positiva conhecida por representar um papel significativo em doenças de pele, incluindo lesões superficiais e foliculares profundas, e *E. coli*, uma bactéria Gram negativa relacionada a doenças do trato digestivo, incluindo síndrome de Crohn e outros quadros infecciosos potencialmente letais (Barnich e Darfeuille-

Michaud, 2007; Cheng et al., 2011). A escolha destes microrganismos deve-se ao fato de que, além da contribuição dos mesmos na manifestação dos quadros infecciosos, tais bactérias também estão envolvidas no desenvolvimento de infecção urinária (Baraboutis et al., 2010; Emamghorashi et al., 2011). Desta forma, os microrganismos foram selecionados considerando a indicação tradicional da planta.

De acordo com os resultados obtidos, os extratos avaliados apresentaram uma atividade significativa contra *S. aureus*, não havendo, neste caso, diferença estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas (Tabela 01). Por outro lado, o extrato etanólico, em sua maior concentração, exerceu um efeito inibitório mais pronunciado do que as demais amostras, quando o microrganismo confrontado foi a *E. coli*.

Muitos antibióticos empregados clinicamente são ativos a uma concentração de 10 µg/mL. Se uma substância pura não é ativa a 100 µg/mL, a mesma não será clinicamente útil. Extratos vegetais que são ativos a 100 µg/mL possuem uma boa potência, de modo que a determinação dos componentes ativos dos mesmos é recomendada (Rios et al., 1988).

É conhecido que polifenóis podem apresentar atividade antimicrobiana. Polifenóis podem combinar-se com as adesinas bacterianas de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular. A literatura demonstra, também, que taninos podem afetar a síntese da parede celular ao formarem complexos irreversíveis com proteínas (Chusri e Voravuthikunchai, 2009; Cowan, 1999). Diversos ensaios *in vitro* demonstram interações potencialmente significativas com bactérias e outros organismos, além de propriedade antioxidante, sequestradora de radicais livres e de inibição enzimática (De Bruyne et al., 1999). Flavonóides, por sua vez, podem eventualmente atuar como inibidores da topoisomerase tipo-II bacteriana, constituindo-se, também, como substâncias potencialmente ativas (Cushnie e Lamb, 2011).

Compostos de natureza terpênica tem sido relacionados com a inibição do crescimento microbiano. Óleos voláteis de diversas espécies vegetais tem

exibido atividade inibitória contra fungos e bactérias (Espina et al., 2011; Huang et al., 2010). Além dos terpenos presentes nos óleos voláteis, outros terpenos fixos, como lactonas sesquiterpênicas e diterpenos, também tem sido relacionados a este tipo de atividade (Radulović et al., 2010; Wedge et al., 2000).

Visando identificar os grupos de compostos ativos, uma análise fitoquímica foi efetuada, evidenciando a presença de compostos terpênicos e polifenólicos, como taninos e flavonóides.

Sánchez et al. (2009), fazendo uso do mesmo sistema cromatográfico empregado neste estudo, juntamente com a análise por RMN 2D, determinaram a presença de 8 melampolídeos a partir do extrato etanólico de *A. australe*. Os Rf observados por estes autores para os compostos foram: 0.74, 0.73, 0.73, 0.53, 0.53, 0.43, 0.40 e 0.34.

Sob o ponto de vista prático, a única diferença entre a técnica cromatográfica utilizada por Sánchez et al. (2009) e aquela utilizada na realização deste trabalho reside no emprego dos reveladores. Enquanto os autores do artigo fizeram uso de vanilina sulfúrica 2%, neste estudo foi empregado o anisaldeído 5%. No entanto, é importante destacar que isso não implica em impossibilidade de comparar os resultados das cromatografias em camada delgada, uma vez que ambos os reveladores apresentam comportamentos e afinidades químicas similares.

Apesar de tanto as técnicas cromatográficas quanto os extratos utilizados serem similares, os resultados verificados não foram idênticos. Embora a nossa análise cromatográfica tenha apontado a presença de compostos terpênicos (caracterizados pelas manchas arroxeadas observadas na placa), os valores de Rf (0,11; 0,38; 0,56; 0,67; 0,71; 0,88; 0,93; 0,97) não são totalmente consistentes com aqueles descritos por Sánchez et al., 2009.

A caracterização fitoquímica dos extratos indicou a presença de flavonóides. Tal fato foi corroborado pela análise cromatográfica que permitiu observar que os extratos apresentam um perfil qualitativamente similar com relação a estes metabólitos. Utilizando-se como padrões de referência rotina,

quercetina e hiperosídeo foi possível observar a presença dos dois primeiros em ambos os extratos. Tal observação vai de encontro aos dados obtidos através da literatura (Sánchez et al., 2009), que indicam a presença de diversos flavonóides, incluindo os dois observados em nossa análise.

A análise cromatográfica, além de confirmar a presença de taninos, evidenciada através das reações de caracterização, revelou, também, a presença de ácido caféico em ambos os extratos. Tal observação está em concordância com os resultados obtidos por outros autores (Sánchez et al., 2009).

A análise cromatográfica, assim como as reações empregadas no *screening* fitoquímico, não indicou a presença de alcalóides e antraquinonas em nenhum dos extratos.

Embora os presentes resultados indiquem que *A. australe* trata-se de uma espécie vegetal dotada de potencial atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, novos estudos visando a determinação da MIC dos extratos frente aos microrganismos testados e o isolamento e caracterização dos constituintes ativos devem ser desenvolvidos.

4. Referências

Baraboutis, I. G., Tsagalou, E. P., Lepinski, J. L., Papakonstantinou, I., Papastamopoulos, V., Skoutelis, A. T., Johnson, S., 2010. Primary *Staphylococcus aureus* Urinary Tract Infection: The Role of Undetected Hematogenous Seeding of the Urinary Tract. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 29 (9), 1095-1101,

Barnich, N., Darfeuille-Michaud, A., 2007. Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Crohn's Disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23 (1), 16-20.

Chusri, S., Voravuthikunchai, S. P., 2009. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutmalls) as an Alternative Treatment for Meticillin-Resistant

Staphylococcus aureus Infections. Journal of Applied Microbiology. 106 (1), 89-96.

Cheng, A. G., DeDent, A. C., Schneewind, O., Missiakas, D., 2011. A Play in Four Acts: *Staphylococcus aureus* Abscess Formation. Trends in Microbiology. 19 (5), 225-232.

Cowan, M. M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4), 564-582.

Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University, New York.

Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J., 2011. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 38 (2), 99-107.

De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H., Vlietinck, A., 1999. Condensed Vegetable Tannins: Biodiversity in structure and biological activities. Biochemical Systematics and Ecology 27, 1999, 445-459.

Emamghorashi, F., Farshad, S., Kalani, M., Rajabi, S., Hoseini, M., 2011. The Prevalence of O Serogroups of *Escherichia coli* Strains Causing Acute Urinary Tract Infection in Children in Iran. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation. 22 (3), 597-601.

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., Garcia, D., Pagán, R., 2011. Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes. Food Control. 22 (6), 896-902.

Harborne, J. B., 1998. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, third ed. Chapman & Hall, London.

Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Whang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W., 2010. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and its Main Component Trans-Anethole. *Molecules*. 15 (11), 7558-7569.

Levy, S. B., 2000. Antibiotic and Antiseptic Resistance: Impact on Public Health. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 19 (10), S120-S122.

Lorenzi, H., Matos, F. J. A., 2002. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum, São Paulo.

Magner, L. N., 2005. A History of Medicine, second ed. Taylor & Francis, Boca Raton.

Radulović, N., Denić, M., Stojanović-Radić, Z., 2010 Antimicrobial Phenolic Abietane Diterpene From *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20 (17), 4988-4991,

Rios, J. L., Recio, M. C., Villar, A., 1988. Screening Methods for Natural Products With Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23 (2-3), 127-149.

Sánchez, M., Kramer, F., Bargardi, S., Palermo, J. A., 2009 Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe*. *Phytochemistry Letters*. 2 (3), 93-95.

Schapoal, E. E. S., Alice, C. B.; Silva, G. A. B. E.; Henriques, A. T., 1988. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Sizygium cuminii*. *Revista Portuguesa de Farmácia*. 38 (4), 55-57.

Shimizu, M., Horie, S., Arisawa, M., Hayashi, T., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Kawasaki, S., Ueno, H., Morita, N., Berganza, L. H., Ferro, E., Basualdo, I., 1987. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay. I. Isolation and Identification of Lens Aldose Reductase Inhibitor from "Tapeçué", *Acanthospermum australe* O.K. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 35, 1234-1237.

Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Pelz, K., Schempp, C. M., 2007. Screening of Plant Extracts for Antimicrobial Activity Against Bacteria and Yeasts With Dermatological Relevance. *Phytomedicine*. 14 (7-8), 508-516.

Wedge, D. E., Galindo, J. C. G., Macías, F. A., 2000. Fungicidal Activity of Natural and Synthetic Sesquiterpene Lactone Analogs. *Phytochemistry*. 53 (7), 747-757.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana, zona de inibição medida em mm, do extrato aquoso e etanólico de *A. australe*.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Extrato aquoso 100 µg/mL	22,59 ± 0,23	11,01 ± 0,31
Extrato aquoso 200 µg/mL	23,66 ± 0,08	13,26 ± 0,12
Extrato etanólico 100 µg/mL	22,58 ± 0,13	14,66 ± 0,21
Extrato etanólico 200 µg/mL	24,01 ± 0,39	16,28 ± 0,27
Cloranfenicol	24,42 ± 0,40	19,07 ± 0,47
Água	7,55 ± 0,77	7,01 ± 0,8
Metanol	7,67 ± 0,16	7,08 ± 0,23

± desvio padrão

3.2. Artigo Científico submetido à revista *Brazilian Journal of Medicinal Plants* em 24 de abril de 2012.

***In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Acanthospermum australe*
(Asteraceae) extracts**

In vitro evaluation of the amoebicidal activity of *Acanthospermum australe*
(Asteraceae) extracts

CASTRO LC^{1,2}; SAUTER IP¹; ETHUR EM³; KAUFFMANN C^{2,3}; DALL'AGNOL R²; SOUZA J²; CIBULSKI SP⁴; MUNIZ AW²; WEIDLICH L²; ROEHE PM⁴; GERMANI JC^{1,6}; ROTT MB^{1,5}; VAND DER SAND ST^{1,5}

(1) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; ICBS/UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 052, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

(2) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIVATES, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, RS, Brasil.

(3) Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, UNIVATES, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, RS, Brasil.

(4) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

(5) Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS/UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 158, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

(6) Departamento de Produção de Matérias Primas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3714 7000; fax: +55 51 3714 7001.

E-mail address: lucamsc@univates.br (L.C. Castro).

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIVATES, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, CEP 95900-000, Lajeado, RS, Brazil.

Resumo

A *Acanthamoeba* é um protozoário de vida livre amplamente distribuído no ambiente, ocorrendo sob a forma trofozoítica (metabolicamente ativa) e cística (de resistência), durante seu ciclo de vida. Ela constitui um fator etiológico da Ceratite Amebiana, uma doença que pode causar inflamação ocular severa e cegueira. Novos fármacos podem ser desenvolvidos a partir de moléculas encontradas em plantas e assim ajudar em seu difícil tratamento. Aqui, *Acanthospermum australe* (Asteraceae), uma planta utilizada na medicina popular, teve sua atividade amebicida testada. O extrato aquoso e etanólico de *A. australe* foram obtidos das partes aéreas por infusão e maceração estática, respectivamente. As concentrações 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL dos extratos foram testadas contra trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*. O efeito citotóxico dos extratos foi testado em células de mamífero utilizando o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). A concentração de 10 mg/mL do extrato etanólico foi letal a 100% dos trofozoítos de *A. polyphaga* em 24 h e ambos os extratos apresentaram efeito citotóxico contra as células de mamíferos. Estes resultados sugerem que o extrato etanólico de *A. australe* pode ter componentes com relevância para o desenvolvimento de novos fármacos amebicidas.

Palavras Chave: *Acanthamoeba polyphaga*, atividade amebicida, *Acanthospermum australe*.

Abstract

Acanthamoeba is a free-living protozoan widely distributed in the environment, occurring in vegetative trophozoite and resistance cyst stages during its life cycle. It constitutes an etiological factor of *Acanthamoeba* keratitis, a disease that may cause severe ocular inflammation and blindness. New drugs can be developed from molecules found in plants and so help in its difficult treatment. *Acanthospermum australe* (Asteraceae), a plant used in folk medicine, had tested its amoebicidal activity. Aqueous and ethanolic extracts of *A. austral* were obtained from aerial parts for infusion and static maceration, respectively. Concentrations of 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg/mL of extract were tested against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. Cytotoxic effect of extracts was tested in mammalian cells using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

RESULTS: Concentration of 10 mg/mL of ethanolic extract was lethal to 100% of the *A. polyphaga* trophozoites in 24 h and both extracts presented citotoxic effect against mammalian cells. These findings suggest that the *A. austral* ethanolic extract may have compounds with relevance to development of new amoebicidal drugs.

Keywords: *Acanthamoeba polyphaga*, amoebicidal activity, *Acanthospermum australe*.

1. Introduction

The free-living amoebae (AVL) are a group of protozoa widely dispersed in nature, being found in soil, water and air. Some species can live in humans and domestic animals as facultative parasites. *Acanthamoeba*, an AVL genus, can occur under the trophozoite (metabolically active) and cyst forms during its life cycle. Some *Acanthamoeba* species are opportunistic pathogens that can cause *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis (AGE) and *Acanthamoeba* keratitis, but may also be associated with cutaneous lesions and sinusitis in immunocompromised patients (Khan, 2006).

Acanthamoeba keratitis is a chronic inflammation of the cornea caused by infection with several *Acanthamoeba* species. Keratitis primarily affects users of contact lenses, which in recent years has greatly increased around the world. The treatment is done with aromatic diamidines (hexamidine, pentamidine, or propamidine isothionate), cationic antiseptics, aminoglycosides, imidazoles and polyenes (amphotericin B) (Auran et al. 1987; Chomicz et al., 2005; Obeid et al., 2003). Once the drugs used do not have a great efficacy against the cystic form of this organism, the treatment is long and complex. Thus, the search for new drugs is crucial to obtain dynamic therapies and facilitate treatments (Obeid et al., 2003).

Asteraceae has been used in traditional medicine as antiseptic, antifungal and antiparasitic agent (Portillo et al., 2001; Ródio et al., 2008). The *Acanthospermum australe* plant species is applied by popular medicine to treat different diseases, but studies demonstrating its efficiency and safety are not

available. Here, we tested the amoebicidal activity of *Acanthospermum australe* extracts against *A. polyphaga* and verified their cytotoxicity in mammalian cells.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *A. australe* (Loefl.) O. Kuntze were collected at the city of Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil, in April, 2009. The plant material was identified by botanical Dra. Elisete Maria de Freitas. Voucher specimen (HVAT 2346) was deposited at the Herbarium of the Centro Universitário UNIVATES.

2.1.1 Ethanolic extract (EE)

The EE of *A. australe* was obtained by static maceration, using 100 g of powdered dried leaves in 1.5 L of 90% ethanol for 7 days. The extract was filtered and the solvent was completely removed at 40 °C, under reduced pressure in a rotary evaporator. The yield of HE was 12.8% (w / w).

2.1.2 Aqueous extract (AE)

The AE of *A. australe* was obtained by infusion, using 100 g of powdered dried leaves in 1.5 L of boiling distilled water for 30 minutes. The extract was filtered and the solvent was completely removed at 40 °C, at reduced pressure on rota-evaporator. The yield of EA was 17.1% w/w.

2.2. Amoeba cultures

The clinic strain of *A. polyphaga* (ATCC 30461) was obtained from the American Type Culture Collection. The axenic cultures were kept in PYG medium (2% proteose peptone, 0.2% yeast extract and 1.8% glucose) at a constant temperature of 30°C. For the experiment, one mL (1mL) of the culture was centrifuged for 5 min at 2.000 rpm, the supernatant discarded, and the precipitate washed twice with phosphate-buffered saline buffer (PBS). The precipitate of amoebae was diluted in PYG medium to obtain a final concentration of 2×10^4 trophozoites per milliliter.

2.3. Assessment of amoebicidal activity

Amoebicidal activity was performed according to Sauter et al. (2011). Briefly, the extracts were solubilized with 1% Tween 20 and water to a final concentration of 20 mg/mL and were tested at final concentrations of 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg/mL. For the assessment of amoebicidal activity, 100 μ L of *A. polyphaga* culture and 100 μ L of each test solution were inoculated into each well of a 96-well plate and incubated at 30°C. *Acanthamoeba* were counted in a Fuchs-Rosenthal counting chamber after 24 hours. Viability was assessed using methylene blue. The control used was sterile water containing 1% Tween 20. All experiments were performed in triplicate with at least three repetitions.

2.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxic effect of the *A. australis* extracts were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann

1983). The tests were performed according to Sauter et al. (2011). Briefly, Vero cells (African Green Monkey Kidney, ATCC CCL-81) received Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (E-MEM/FBS); (GIBCO) with extract at different concentrations (10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg/mL). The cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 48h, 50µL of 3-(4,5-dimethyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) solution (2 mg/mL) was added to each well and incubated for further 4 h. The plates were centrifuged (1400 × *g* for 5min) and the untransformed MTT was removed. Ethanol (100 µL) was added to each well to solubilize formazan crystals and the optical density (OD) measured in an ELISA reader (Anthos 2020) at 550 nm with a 620 nm reference filter. The amount of formazan produced was directly proportional to the number of living cells in culture. Results were expressed as the percentual OD of viable cells in comparison to the OD of untreated control cells.

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as percentage and analyzed by analysis of variance and comparison of averages with the Tukey's test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

Amoebicidal activity of *A. australe* (Loefl.) O. Kuntze extract was tested against *A. polyphaga* trophozoites being chosen as standard of clinical origin (isolated from *Acanthamoeba keratitis* lesion). Through the tests in the study,

we determined the amoebicidal activity of *A. australe* extracts after 24 hours of treatment. *A. australe* AE showed no activity at the concentrations tested (Figure 1), when compared with the control group. No statistical difference among them was observed, suggesting that compounds present in the AE did not show amoebicidal activity with the conditions used in this *in vitro* assay.

Using the same *in vitro* assay, the EE was tested. *A. polyphaga* trophozoites underwent the same test with different doses of *A. australe* EE. The dose of 10 mg / mL showed activity against amoeba, eliminating 100% of viable trophozoites (Figure 2). The concentrations 5, 2.5 and 1.25 mg/mL had different amoebicidal activity, maintaining viable 15, 65 and 89% of trophozoites, respectively, when compared to the control group. The concentration 0.625 mg/mL was able to increase the trophozoites growth when compared to control, once there was an increase of 11% in the trophozoites number after 24 h. All concentrations were statistically different ($p < 0.05$) when using the Tukey test.

The results of *in vitro* amoebicidal activity show that the EE of *A. australe* is dose dependent, once the R^2 denotes that the regression equation explains 97.19% of the variance of the experiment (Figure 3). Thus, the minimum inhibitory concentration of EE found against *A. polyphaga* is 8.77 mg/mL. Ethanolic extract from *A. australe* showed a great activity against trophozoites. However, at all concentrations used there was encystment of the same trophozoites (Figure 4), unlike the control group, which has no encystment. This is very important because the ability of trophozoites to turn in cyst form during the therapy is the major problem for reinfection (Schuster and Visvesvara, 2004).

Cytotoxic effect of EE and AE in mammalian cells

The MTT assay was used to test the cytotoxic effect and allowed us to find that both aqueous and hydroethanolic extract are toxic against mammalian cells (data not shown). All concentrations killed 100% (vs control) of the Vero cells. The extract cytotoxicity reveals that its use on the cornea for treatment of keratitis is not feasible.

4. Discussion

The investigation of plants used by traditional medicine is a strategy for finding alternative antibiotics (Brantner and Grein, 1994; Avancini, 2002). Recently, several substances obtained from plant have been studied for amoebicidal activity against *Entamoeba histolytica*, and many of these compounds have proven to be more effective than the currently used therapy (Di Stasi, 1995; Polat et al., 2008).

The *Asteraceae* family has been of interest to researchers due to the presence of many active compounds against a range of microorganisms. *A. australe* (Loefl.) O. Kuntze, a member of this family, has been much studied in different areas. Studies showed that *A. australe* may exert effects on myelopoiesis that may be implicated in antitumor immune responses (Mirandola et al., 2002). A work of Rocha Martins et al. (2011) reported for the first time the antiviral activity of extracts and fractions from *A. australe* aerial parts. The antifungal activity of aqueous, dichloromethane and methanol extracts from *A. australe* was assayed *in vitro* against 11 fungal strains comprising several filamentous fungi and yeasts, showing activity as well (Portillo et al., 2001).

Amoebicidal activity has been reported in recent years for different plants. Extracts and essential oil of plants from *Asteraceae* family has been used in many studies showing a great activity against *Acanthamoeba*. Ródio et al. (2008) showed that hexane extract of the *Pterocaulon polystachyum* (*Asteraceae*) has amoebicidal activity against a clinic strain of *Acanthamoeba*. Essential oil of *P. polystachyum* also showed a great activity in the same conditions (Sauter et al., 2011).

A. australe amoebicidal activity has never been investigated. In this study, we were able to show that the *A. australe* EE has activity against trophozoites of *A. polyphaga*. Citotoxic assay showed that EE from aerial parts of *A. australe* does not allow the use directly in the keratitis therapy. Therefore, further studies are necessary to evaluate the chemical composition of *A. australe* EE and its possible active compounds, as well as identify the molecular targets of these products, isolated or consortium, and thus determine its possible therapeutic use. A possible use for *A. australe* hidroetanolic extract would be its incorporation into contact lenses cleaning solutions and surface disinfection solutions. However, more studies are necessary to evaluate its real utilization.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Naveed Khan for providing *A. polyphaga* strain. The authors thank Dr^a. Elisete Maria de Freitas for identification of plant species.

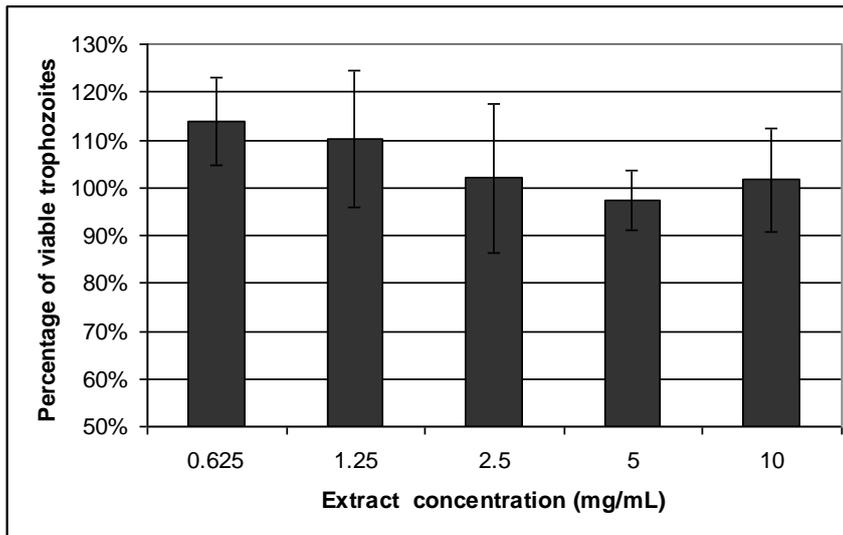


Fig. 1) Amoebicidal activity of aqueous extract (AE) of *A. australe* presented as percentage of viability of *A. polyphaga* trophozoites ($p < 0.05$ vs control).

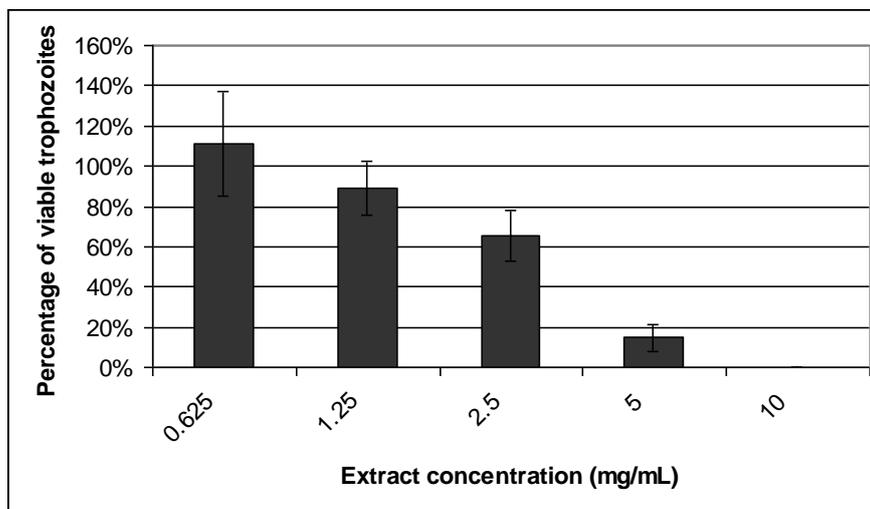


Fig. 2) Amoebicidal activity of ethanolic extract (EE) of *A. australe* presented as percentage of viability of *A. polyphaga* trophozoites ($p < 0.05$ vs control).

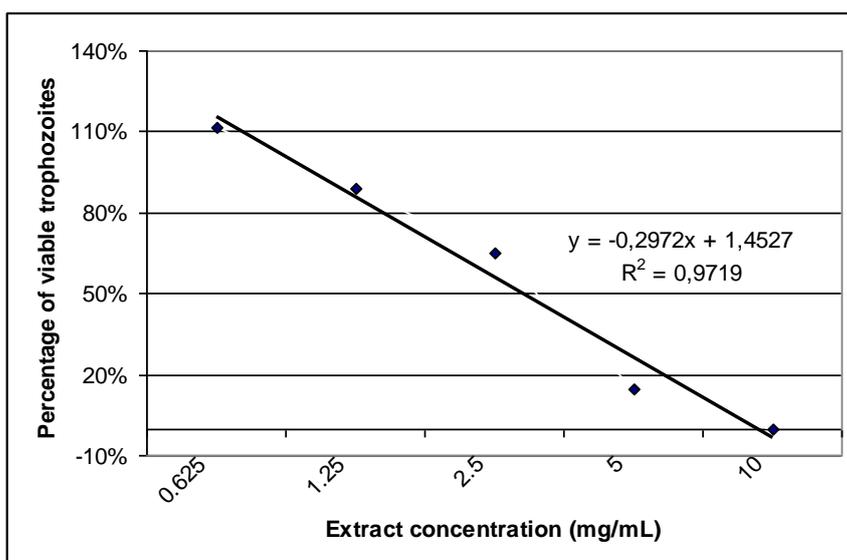


Fig. 3) Linear regression from the concentrations of *A. australe* ethanolic extract (EE) front of the percentage viability of *A. polyphaga* trofozoites.

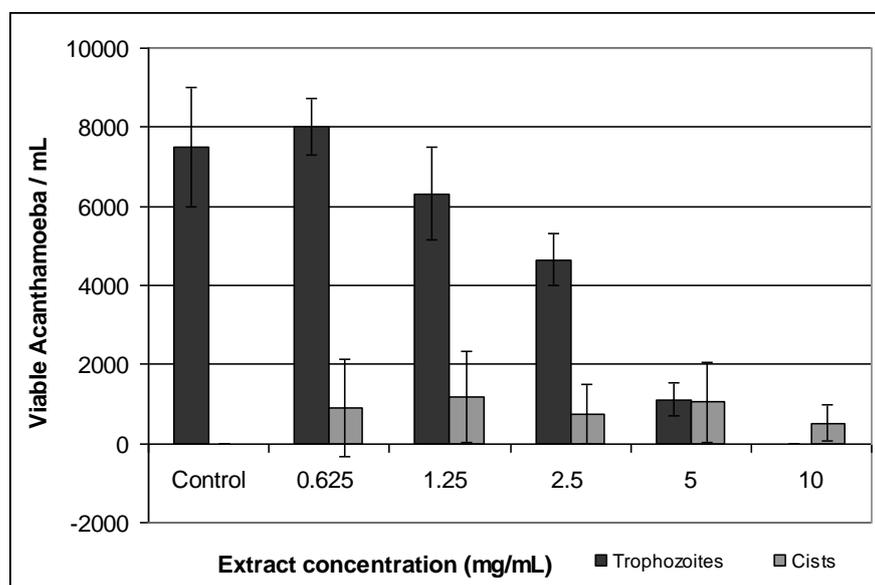


Fig. 4) Amoebicidal activity of ethanolic extract (EE) of *A. australe* presented as viable *Acanthamoeba* per milliliter ($p < 0.05$ vs control).

References

AURAN JD, STAR MB, JAKOBIEC FA. Acanthamoeba keratitis. A review of the literature. **Cornea**, v. 6, p. 2-26, 1987.

AVANCINI, CAM. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil**. 2002. 152p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BRANTNER A, GREIN E. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**. v. 44, p. 35-40, 1994.

CHOMICZ L, ZEBROWSKA J, PIEKARCZYK J, STAROOECIAK B, MYJAK P, WALSKI M, KAZIMIERCZUK Z. In vitro studies on susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to selected chemical agents. **Acta Parasitologica**, v.50, p. 25–31, 2005.

Di STASI LC. Amoebicidal compounds from medicinal plants. **Parassitologia**. v.37, p. 29-39, 1995.

KHAN NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p.564–595, 2006.

MIRANDOLA L, JUSTO GZ, QUEIROZ MLS. Modulation by *Acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 24, p. 275-288, 2002.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

OBEID WN; ARAÚJO R; VIEIRA LA; MACHADO MAC. Ceratite Bilateral Por Acanthamoeba - Relato De Caso. **Conselho Brasileiro de Oftalmologia**, v. 66, p. 876-880, 2003.

POLAT ZA, VURAL A, TEPE B, CETIN A. In Vitro Amoebicidal Activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. **Parasitology Research** 2007; 101:397-402.

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

ROCHA MARTINS LR, BRENZAN MA, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP, NAKAMURA TU, RANIERI CORTEZ LE, GARCIA CORTEZ DA. In vitro antiviral activity from *Acanthospermum australe* on herpesvirus and poliovirus. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 26-31, 2011.

RÓDIO C, VIANNA DR, KOWALSKI KP, PANATIERI LF, VON POSER G, ROTT MB. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, v. 104, p. 191–194, 2008.

SAUTER IP, DOS SANTOS JC, APEL MA, CIBULSKI SP, ROEHE PM, VON POSER GL, ROTT MB. Amoebicidal activity and chemical composition of

Pterocaulon polystachyum (Asteraceae) essential oil. **Parasitology Research**, v. 109, p. 575-580, 2011.

SCHUSTER FL, VISVESVARA GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1001-1027, 2004.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

4.1. Análise Fitoquímica dos Extratos Aquoso e Etanólico de *A. australe*

Visando identificar os grupos de compostos ativos dos extratos, foi efetuada a análise fitoquímica dos mesmos, evidenciando a presença de compostos terpênicos e polifenólicos, como taninos e flavonóides.

A caracterização fitoquímica dos extratos indicou a presença de flavonóides. O que concorda com os dados obtidos por Sánchez *et al.* (2009), que indicam a presença de diversos flavonóides, incluindo os dois observados nas análises realizadas, rutina e quercetina.

Sob o ponto de vista prático, a única diferença entre a técnica cromatográfica utilizada por Sánchez *et al.* (2009) e aquela utilizada na realização deste trabalho reside no emprego dos reveladores. Enquanto os primeiros fizeram uso de vanilina sulfúrica 2%, neste estudo foi empregado o anisaldeído 5%. No entanto, é importante destacar que isso não implica em impossibilidade de comparar os resultados das cromatografias em camada delgada, uma vez que ambos os reveladores apresentam comportamentos e afinidades químicas similares.

Apesar de tanto as técnicas cromatográficas quanto os extratos utilizados serem similares, os resultados verificados não foram idênticos. Embora a análise cromatográfica deste estudo tenha apontado a presença de compostos terpênicos, caracterizados pelas manchas arroxeadas observadas na placa cromatográfica, os valores de Rf de: 0,11; 0,38; 0,56; 0,67; 0,71; 0,88; 0,93 e 0,97, não são totalmente consistentes com aqueles descritos por Sánchez *et al.*, (2009).

4.2. Atividade Antibacteriana dos Extratos Aquoso e Etanólico de *A. australe*

Os microrganismos vêm desenvolvendo resistência a muitos antibióticos devido à utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos, agravando os problemas clínicos no tratamento de doenças infectocontagiosas. Além disso, o uso de antibióticos está eventualmente associado a efeitos adversos que incluem hipersensibilidade, destruição da microbiota bacteriana intestinal e imunossupressão. É evidente a necessidade para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos àqueles disponíveis atualmente. Para efetuar esta busca, uma abordagem de interesse consiste em avaliar plantas medicinais dotadas de potenciais propriedades antimicrobianas. As plantas medicinais representam uma fonte importante de compostos farmacologicamente ativos, pois, novos agentes antifúngicos e antibacterianos podem ser eventualmente obtidos a partir das mesmas (COWAN, 1999; LEVY, 2000; WECKESSER *et al.*, 2007).

A utilização de plantas ou de seus extratos destas no tratamento das mais variadas doenças é prática frequente na história da humanidade (JONES, 1996).

Sabe-se que os polifenóis podem apresentar atividade antimicrobiana ao combinar-se com as adesinas bacterianas, de forma a comprometer a adesão de microrganismos sobre a superfície celular. Também taninos podem afetar a síntese da parede celular ao formarem complexos irreversíveis com proteínas (CHUSRI e VORAVUTHIKUNCHAI, 2009; COWAN, 1999). De Bruyne *et al.* (1999) demonstraram, em diversos ensaios *in vitro*, interações potencialmente significativas de polifenóis com microrganismos procariontes. Cushine e Lamb (2011) verificaram a atividade de flavonóides como inibidores da topoisomerase tipo-II bacteriana, constituindo-se como alternativa de substâncias potencialmente ativas.

Os compostos de natureza terpênica encontrados em diversas plantas têm sido descritos com atividade inibitória contra fungos e bactérias (ESPINA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2010). Além dos terpenos presentes nos óleos voláteis, outros terpenos fixos, como lactonas sesquiterpênicas e diterpenos, também tem sido relacionados a este tipo de atividade (RADULOVIC *et al.*, 2010; WEDGE *et al.*, 2000).

Embora os presentes resultados indicarem que *A. australe* seja uma espécie vegetal dotada de potencial atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, não apresenta importância clínica antibacteriana devido as inviáveis MIC dos extratos, bem como sem potencial antibacteriano frente a isolados clínicos multirresistentes testados (ambos dados não

apresentados neste trabalho). Entretanto, o isolamento e caracterização dos constituintes ativos devem ser desenvolvidos.

4.3. Atividade Amebicida dos Extratos Aquoso e Etanólico de *A. australe*

A atividade amebicida dos extratos de *A. australe* foi testada contra trofozoítos de *A. polyphaga*, isolada de lesão de ceratite amebiana – AP2. O isolado proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC 36461) foi cedido pelo Dr. Naveed Khan, da *School of Biological and Chemical Sciences*, Birkbeck College, Universidade de Londres.

Mediante os ensaios realizados, determinou-se a atividade amebicida dos extratos aquoso e etanólico de *A. australe*, e acompanhou-se os ensaios por meio de microscópio óptico invertido. O período de observação compreendeu o início do experimento e a realização das contagens celulares em câmara de Fuchs-Rosenthal. A viabilidade celular dos trofozoítos foi verificada pelo emprego de azul de metileno, o qual colore os trofozoítos inviáveis.

Fundamentado nos tempos utilizados para os ensaios de atividade amebicida do estudo desenvolvido por Ródio *et al.* (2008), investigou-se a atividade amebicida dos extratos aquoso e etanólico de *A. australe*, durante 24 horas para as concentrações finais de 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL.

Os ensaios realizados com o isolado de *A. polyphaga* mostraram que o extrato aquoso de *A. australe* não apresentou atividade nas concentrações testadas, quando comparadas ao controle, composto por água adicionada de

1% do agente tensoativo (Tween 20), sendo os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Nos ensaios de 24 horas, o extrato etanólico inviabilizou todos os trofozoítos, provocando a lise total na concentração de 10 mg/mL. As concentrações de 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL mostraram diferentes atividades, permitindo a viabilidade de 15, 65, 89 e 100% dos trofozoítos, respectivamente, quando comparados ao controle.

A concentração inibitória mínima do extrato etanólico encontrado contra *A. polyphaga* é 8,77 mg/mL.

O extrato etanólico de *A. australe* mostrou significativa atividade contra trofozoítos de *A. polyphaga*. No entanto, em todas as concentrações utilizadas, não foi possível impedir o encistamento dos trofozoítos, uma vez que houve formação de cistos, diferentemente do controle, permitindo inferir que a atividade amebicida foi diretamente proporcional ao aumento da dose. A relevância do achado é traduzida pela capacidade dos trofozoítos assumirem a forma de cistos durante as terapias medicamentosas convencionais, o que é entendido como importante problemática para a reinfecção (SCHUSTER e VISVESNARA, 2004).

O isolado de *A. polyphaga* a partir de uma lesão de ceratite, possivelmente apresenta mecanismos de defesa, ainda não definidos, que garantam sua resistência absoluta ao extrato aquoso, e relativa ao extrato etanólico de *A. australe*. Sua patogenicidade está relacionada, entre outros aspectos, com os mecanismos que garantem sua resistência, intrínseca ou não, em diferentes condições adversas do ambiente.

A atividade amebicida encontrada no extrato etanólico de *A. australe* pode estar ocorrendo pela ação de componentes específicos do extrato ou mesmo pela ação sinérgica ou consorciada de diversas moléculas. Para estabelecer a comparação entre a atividade do extrato e a ação de fármacos que são geralmente utilizados no tratamento de ceratite amebiana, foi realizado o mesmo ensaio de atividade amebicida utilizando-se metronidazol, sendo este o controle positivo. Metronidazol é um antibiótico utilizado contra protozoários e bactérias, capaz de inibir a síntese de DNA (ONDARZA *et al.*, 2006). Segundo Ondarza *et al.* (2006), a concentração de metronidazol de 32 µg/mL é capaz de inviabilizar 85% de amebas em ensaios *in vitro*.

4.4. Atividade Citotóxica dos Extratos Aquoso e Etanólico de *A. australe* sobre células de mamíferos

A utilização de compostos naturais na terapêutica de doenças necessita de um estudo prévio completo de sua ação, incluindo a avaliação dos possíveis danos que estes compostos possam causar ao ser humano. Para isto, foi verificada a citotoxicidade dos extratos aquoso e etanólico de *A. australe* mediante o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) segundo Mosmann (1983), que possibilitou verificar se os extratos aquoso e etanólico provocam dano às células de mamíferos, e assim, avaliar a possibilidade do seu emprego, por exemplo, em humanos.

Clinicamente importante, o número de casos diagnosticados de ceratite amebiana provocada por *Acanthamoeba* representa uma estimativa de mais de 3.000 casos, apenas nos Estados Unidos (QVARNSTROM *et al.*, 2006). O

importante aumento do número de casos de ceratite por *Acanthamoeba*, evidenciado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention), entre 2004 e 2006, estabelece relação direta ao emprego de solução para lentes de contato contaminadas (VISVESVARA e SCHUSTER, 2008).

É íntima a relação entre a ceratite causada pelo uso de lentes de contato e a ineficiente higienização das mesmas, causada por *Acanthamoeba* (KHAN, 2006).

A alta citotoxicidade *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico empregados sugere a impossibilidade de emprego direto na córnea de mamíferos, revelando que sua utilização sobre a córnea é inviável. Em contraposição, sugere-se efetuar a avaliação da citotoxicidade *in vivo*, objetivando resultados mais conclusivos quanto ao seu emprego direto em células de mamíferos.

5. CONCLUSÕES

A análise fitoquímica dos Extratos Aquoso e Etanólico das partes aéreas de *A. Australe* permitiu identificar grupos de compostos ativos dos mesmos, evidenciando a presença de compostos terpênicos e polifenólicos, como taninos e flavonóides.

A. australe representa uma espécie vegetal dotada de potencial atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *E. coli*, entretanto, insuficiente para emprego como antibacteriano, devido as inviáveis MIC de seus extratos.

O extrato etanólico de *A. australe* mostrou importante atividade amebicida contra os trofozoítos de *A. polyphaga*, mediante a inviabilização destes, em 24 horas, através da lise total dos mesmos.

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico de *A. australe* não permite a sua utilização em células de mamíferos, inviabilizando seu emprego no tratamento de patologias como ceratite amebiana. O que sugere efetuar a avaliação da citotoxicidade *in vivo*, objetivando resultados mais conclusivos quanto ao seu emprego direto em células de mamíferos. Contudo, a incorporação dos mesmos em soluções de desinfecção de superfícies e nas soluções de limpeza de lentes de contato é passível de ser investigada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doenças infecciosas encontram-se, de modo importante, como causas de mortes prematuras. O uso indiscriminado de antimicrobianos, desvinculado ao conceito de racionalidade no uso de medicamentos, seleciona e induz mecanismos de resistência em microrganismos.

Neste sentido, é emergente a necessidade do desenvolvimento de alternativas aos recursos terapêuticos atuais. Aspectos culturais apresentam relevância no sentido da busca por novos agentes antimicrobianos, especialmente produtos de origem vegetal. A diversidade química e estrutural dos compostos naturais, quando comparadas aos antimicrobianos de origem sintética ou derivados, ou de processos fermentativos, podem implicar em mecanismos de ação alternativos à resistência microbiana.

A investigação do uso tradicional de plantas medicinais, fundamentado em conceitos etnofarmacológicos e quimiotaconômicos, corresponde estratégia relevante no sentido da identificação de compostos com atividade antimicrobiana, isolados ou consorciados.

Os escassos estudos que remetam à compreensão de efeitos farmacológicos decorrentes do uso tradicional de *A. australe* sugerem a investigação dos mesmos, mediante as associações culturais e não culturais de uso da planta.

Mediante os resultados da investigação fitoquímica é possível propor o isolamento e identificação mais precisos dos constituintes ativos da planta, objetivando a exploração terapêutica dos mesmos.

Independente dos diminutos estudos quanto a atividades farmacológicas de *A. australe*, o resultado do *screening* fitoquímico, especialmente pela detecção de Polifenóis, Flavonóides, compostos terpênicos e taninos, propõem potenciais atividades antimicrobianas relacionadas a mecanismos conhecidos e, conseqüentemente, passíveis de emprego em mamíferos.

Apesar dos resultados decorrentes da inibição dos microrganismos bacterianos testados, bem como de trofozoítos de *A. polyphaga*, através dos testes estabelecidos com Extratos Aquoso e Etanólico, é relevante a avaliação da segurança no uso destes, já que os testes de citotoxicidade *in vitro* correspondem a dificuldade de manutenção de células de mamíferos. Outrossim, propõem a avaliação da citotoxicidade *in vivo* dos referidos extratos, comprovando sua insegurança total ou relativa no emprego direto em células de mamíferos.

O estabelecimento de doses seguras que correspondam aos conceitos de toxicidade seletiva podem sugerir o emprego correto de *A. australe* no sentido do emprego como antimicrobiano, antiparasitário ou antisséptico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acanthospermum australe (Loefl.) O. Kuntze. Disponível em <http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/carrapicho-rasteiro_54.html> Acesso em 30 de janeiro de 2012.

ADATI, R. T. Estudo biofarmacognóstico de *Acanthospermum australe* (Loefl.)O. Kuntze Asteraceae. 2006, 124 f. Dissertação (Doutorado em Farmácia) – Universidade de São Paulo – SP, 2006.

ADATI, R. T.; TEMPONE, A. G.; JUNIOR, H. A.; FERRO, V. O. Estudo botânico, avaliação da atividade *in vitro* do extrato hidroetanólico e clorofórmico de partes aéreas de *Acanthospermum australe* (Loefl.)O. Kuntze sobre o clone AJ de *Plasmodium chabaudi* e formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, supl. 1, p. 94, 2006.

AKSOZEK, A.; MCCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. Journal of Parasitology, v. 88, p. 621–623, 2002.

ALVES, J. M. P. Caracterização e Filogenia Moleculares de Acanthamoeba. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BOOTON, G. C.; VISVESVARA, G. S.; BYRES, T. J.; KELLY, D. J.; FUERST, P. A.; Identification and Distribution of Acanthamoeba Species Genotypes Associated with Nonkeratitis Infections. Journal of Clinical Microbiology, v. 43, p. 1689–1693, 2005.

BRAGANHOL, E. Quercetina: efeitos sobre parâmetros proliferativos e sobre a ecto-5'-nucleotidase em linhagem de glioma humano U138MG. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS, 2006.

CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutmalls) as an Alternative Treatment for Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Journal of Applied Microbiology. 106 (1), 89-96, 2009.

CORSARO, D.; VENDITTI, D.; Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). Parasitology Research, v. 107, p.233-238, 2010.

COWAN, M. M., Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4), 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University, New York, 1981.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38 (2), 99-107, 2011.

DEBENEDETTI, S.; MARTINO, V.; PALACIOS, P.; COUSSIO, J. D. 6-Methoxy flavonoids from *Acanthospermum australe*. *Journal of Natural Products*, v. 50, n. 2, p. 325, 1987.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIENTINCK, A. Condensed Vegetable Tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 1999, 445-459, 1999.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCIA, D.; PAGÁN, R. Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes. *Food Control*. 22 (6), 896-902, 2011.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 3.ed. London: Churchill Livingstone, 2004.

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L.; WHANG, J.; GONG, Y.; CHEN, X.; GUO, Z.; WANG, Q.; JIANG, W. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and its Main Component Trans-Anethole. *Molecules*. 15 (11), 7558-7569, 2010.

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 12.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. (Biblioteca Universitária. Série 3 – Ciências Puras, v. 4).

JONES, B. R.; VISVESVARA, G. S.; ROBINSON, N. M.; *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom*, v. 95, p. 221–232, 1975.

JONES, F.A.; Herbs – useful plants. Their role in history and today. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, v. 8, p.1227–1231, 1996

KHAN, N. A.; *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Review*, v. 30, p. 564-595, 2006.

LEVY, S. B. Antibiotic and Antiseptic Resistance: Impact on Public Health. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 19 (10), S120-S122, 2000.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000a.

_____. Manual de identificação e de controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. 5.ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2000b.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACÊDO, M. E.; CONSOLI, R. A. G. B.; GRANDI, T. S. M.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B.; MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; ZANI, C. Z. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 92, n. 4, p. 565-570, 1997.

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N.A.; *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. Journal of Medical Microbiology, v. 54, p. 755-759, 2005.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G.; *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology. v. 16, p. 273–307, 2003.

MARTINS, L. A.; SANTOS, L. Acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes com fibrose cística na internação pediátrica do hospital de clínicas de Porto Alegre. Infarma, v. 18, n. 7-8, p. 13-18, 2006.

MATSUNAGA, K.; SAITOH, M.; OHIZUMI, Y. Acanthostral, a Novel Antineoplastic cis, cis, cis-Germacranolide from *Acanthospermum australe*. Pergamon, v. 37, n. 9, p. 1455-1456, 1996.

MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; GRANDI, T. S. M.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B.; ZANI, C. L. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, n. 3, p. 411-412, 1999.

MIRANDOLA, L.; JUSTO, G. Z.; QUEIROZ, M. L. S. Modulation by *Acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice. Immunopharmacology and Immunotoxicology, v. 24, n. 2, p. 275-288, 2002.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v.1665, p. 55-63, 1983.

ONDARZA RN, ITURBE A, HERNÁNDEZ E.; In vitro antiproliferative effects of neuroleptics, antimycotics and antibiotics on the human pathogens

Acanthamoeba polyphaga and *Naegleria fowleri*. Archives of Medical Research, v.37, p. 723-729, 2006.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, v. 76, n. 1, p. 93-98, 2001.

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM, R.; DA SILVA, A.J.; Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. Journal of clinical microbiology, v. 44, p. 3589-3595, 2006.

RADULOVIĆ, N., DENIĆ, M., STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. Antimicrobial Phenolic Abietane Diterpene From *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 20 (17), 4988-4991, 2010.

RÓDIO, C.; VIANNA, D. R.; KOWALSKI, K. P.; PANATIERI, L. F.; VON POSER, G.; ROTT, M. B.; In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. Parasitological Research, v.104, p. 191–194, 2008.

SÁNCHEZ, M.; KRAMER, F.; BARGARDI, S.; PALERMO, J. A. Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe*. Phytochemistry Letters. 2 (3), 93-95, 2009.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S.; Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. International Journal for Parasitology, Oxford, v. 34, p. 1001–1027, 2004.

SHIMIZU, M.; HORIE, S.; ARISAWA, M.; HAYASHI, T.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; KAWASAKI, M.; TERASHIMA, S.; TSUJI, H.; WADA, S.; UENO, H.; MORITA, N.; BERGANZA, L. H.; FERRO, E.; BASUALDO, I. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldolase reductase inhibitor from “Tapecué”, *Acanthospermum australe* O. K. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 35, p. 1234-1237, 1987.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

STOTHARD, D. R.; SCHROEDRE-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J.; The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 45, p. 45–54, 1998.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L.; Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 30, p. 151-158, 2008.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Revista Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; PELZ, K.; SCHEMPP, C. M. Screening of Plant Extracts for Antimicrobial Activity Against Bacteria and Yeasts With Dermatological Relevance. *Phytomedicine*. 14 (7-8), 508-516, 2007.

WEDGE, D. E.; GALINDO, J. C. G.; MACÍAS, F. A. Fungicidal Activity of Natural and Synthetic Sesquiterpene Lactone Analogs. *Phytochemistry*. 53 (7), 747-757, 2000.

ANEXOS

ANEXO A. Meio Proteose Peptona - Extrato de Levedo - Glicose (PYG)

7,5g de Proteose Peptona

0,75g de Extrato de levedo

0,98g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0,059g de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1g de Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,02g de Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]

0,034g de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

0,355g de Hidrogenofosfato dissódico anidro

15g de Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado após o resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$, mediante o emprego de potenciômetro, e a solução esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min.