

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade de *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) frente a
*Acanthamoeba castellanii***

Camila Ródio

Porto Alegre, novembro de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade de *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) frente a
*Acanthamoeba castellanii***

Dissertação apresentada por **Camila Ródio**
para a obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Dra. Gilsane Lino von Poser
Co-orientadora: Dra. Marilise Brittes Rott

Porto Alegre, novembro de 2008.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13.11.2008, pela Comissão Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz
(Universidade Luterana do Brasil)

Profa. Dra. Márcia Bohrer Mentz
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Profa. Dra. Tiana Tasca
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

R685a	Ródio, Camila Atividade de <i>Pterocaulon polystachyum</i> DC. (Asteraceae) frente a <i>Acanthamoeba castellanii</i> / Camila Ródio. – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xvii, 97 p. : il. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. <i>Pterocaulon</i> . 2. Asteraceae. 3. Atividade amebicida. 4. <i>Acanthamoeba</i> . I. Poser, Gilsane Lino von. II. Rott, Marilise Brittes. III. Título. CDU: 547.9:582.998
-------	---

Bibliotecárias responsáveis:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480
Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, e pelas oportunidades e pessoas especiais que Ele me presenteia constantemente.

Agradeço aos meus pais Joel e Aledis por estarem presentes de todas as formas na minha vida. A eles dedico todas as minhas vitórias. E lutarei sempre no anseio de um dia me igualar a eles como sábios, como exemplos, como pais, como amigos... como amor.

Agradeço aos meus irmãos Caroline e Felipe, pessoas muito especiais, e a toda minha família pela nossa amizade e por todos os momentos que passamos juntos.

Agradeço a minha irmã Mara pelo seu carinho e pelo melhor presente que ela poderia me dar – meu sobrinho Mateus.

Agradeço ao André pelo seu amor, pela sua força, seu sorriso e compreensão. Obrigada por me fazer tão feliz.

Agradeço ao mestre e amigo Dr. Flávio Henrique Reginatto por todas suas lições e por esta conquista.

Agradeço a Dra. Marilise Brites Rott pela oportunidade, por sua amizade, pela sua dedicação, por seus conselhos e por toda a atenção dispensada.

Agradeço a minha dedicada bolsista Kreesla e a todos os colegas dos laboratórios onde estive pela amizade e carinho.

Agradeço, especialmente, a uma pessoa que entrou na minha vida, tornou-se exemplo para mim e hoje possui um lugar muito especial dentro do meu coração, a

minha orientadora Dra. Gilsane Lino von Poser. Agradeço sua incansável dedicação, sua criatividade, seu carinho e amizade, sua compreensão, e por todas as vezes que me “carregou nos seus braços”.

“O Senhor respondeu: - Meu precioso filho, eu te amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e de teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí, que eu te carreguei nos braços.”

Pegadas na Areia

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1 Revisão sobre o gênero <i>Pterocaulon</i>	11
3.1.1 Taxonomia e morfologia.....	11
3.1.2 Distribuição geográfica.....	12
3.1.3 <i>Pterocaulon polystachyum</i>	14
3.1.4 Composição química das espécies de <i>Pterocaulon</i>	16
3.1.5 Aspectos quimiotaxonômicos.....	20
3.1.6 Aspectos biológicos e farmacológicos.....	20
3.1.6.1 Atividade inseticida e antiparasitária.....	21
3.1.6.2 Atividade antiviral.....	22
3.1.6.3 Atividade antifúngica.....	22
3.1.6.4 Atividade antibacteriana.....	23
3.1.6.5 Atividade citotóxica e antiproliferativa.....	23
3.2 Atividade antiprotozoária de cumarinas.....	24
3.3 Revisão sobre <i>Acanthamoeba</i>	25
3.3.1 Amebas de vida livre.....	25
3.3.2 Gênero <i>Acanthamoeba</i>	25
3.3.3 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	28
3.3.3.1 Terapêutica da ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	29

4. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1 Materiais.....	33
4.1.1 Material vegetal.....	33
4.1.2 Materiais laboratoriais.....	33
4.2 Preparações do extrato metanólico bruto, frações e exudato.....	34
4.2.1 Extrato metanólico bruto.....	34
4.2.2 Fração hexano, diclorometano e metanol.....	34
4.2.3 Exudato.....	34
4.3 Análises cromatográficas, isolamento e identificação dos composto.....	36
4.3.1 Análise cromatográfica.....	35
4.3.2 Isolamento das cumarinas.....	36
4.3.3 Elucidação estrutural.....	36
4.4 Quantificação de cumarinas.....	36
4.4.1. Espectrofotometria na região ultravioleta.....	36
4.4.2 Preparação da substância de referência.....	37
4.4.2.1 Obtenção da curva padrão da substância de referência.....	37
4.4.3 Preparação das amostras a serem quantificadas.....	38
4.5 Culturas axênicas de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	38
4.6 Avaliação da atividade amebicida frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	39
4.6.1 Preparação das soluções testes.....	39
4.6.2 Cultura experimental padrão de <i>A. castellanii</i>	39
4.6.3 Avaliação da atividade amebicida.....	40
4.6.3.1 Extrato bruto, exudato e frações.....	40
4.6.3.2 Fração hexano em diferentes concentrações.....	41
4.7 Avaliação da atividade amebicida frente aos cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	41
4.7.1 Fração hexano em diferentes concentrações.....	42
4.7.2 Exudato.....	42
4.8 Análise estatística	42
4.9 Plano de gerenciamento de resíduos.....	42

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Análise cromatográfica, isolamento e identificação dos compostos.....	47
5.1.1 Análise cromatográfica.....	47
5.1.2 Isolamento das cumarinas.....	48
5.1.3 Elucidação estrutural dos produtos CR1 e CR2.....	48
5.1.3.1 Composto CR1a.....	48
5.1.3.2 Composto CR1b.....	49
5.1.3.3 Composto CR2a.....	49
5.1.3.4 Composto CR2b.....	50
5.2 Quantificação de cumarinas.....	53
5.2.1 Obtenção da curva padrão da substância de referência.....	53
5.2.2 Determinação quantitativa de cumarinas nas frações e no exudato.....	54
5.3 Atividade amebicida frente aos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	55
5.3.1 Extrato bruto e das frações hexano, diclorometano e metanol.....	55
5.3.2 Exudato.....	56
5.3.3 Fração hexano em diferentes concentrações.....	57
5.4 Avaliação da atividade amebicida frente aos cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7. CONCLUSÕES.....	67
8. REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Pterocaulon polystachyum</i>	15
Figura 2: Estruturas das cumarinas citadas para <i>Pterocaulon polystachyum</i>	17
Figura 3: <i>Acanthamoeba castellanii</i>	26
Figura 4: Obtenção do extrato metanólico bruto, das frações e do exudato de <i>P. polystachyum</i>	35
Figura 5: Esquema do teste para avaliação da atividade amebicida.....	40
Figura 6: Curva padrão da substância de referência (esculina), em 327 nm, onde foi obtido $y = 32,75x - 0,029$, $R^2=0,999$	54
Figura 7: Atividade do extrato bruto e das frações de <i>P. polystachyum</i>	55
Figura 8: Atividade amebicida de diferentes concentrações da fração hexano de <i>P. polystachyum</i>	57
Figura 9: Gráfico da regressão linear obtida das concentrações da fração hexano de <i>P. polystachyum</i> frente ao percentual de mortalidade dos trofozoítos em 48 e 72 horas.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de <i>Pterocaulon</i> citadas para a região sul do Brasil, segundo os autores e anos de publicação.....	13
Tabela 2: Preparação das diluições da solução padrão (esculina).....	37
Tabela 3: Preparação das diluições das amostras.....	38
Tabela 4: RMN de ^1H dos compostos CR1a (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina), CR1b (aiapina), CR2a (preniletina) e CR2b (preniletina-metiléter) isolados de <i>P. polystachyum</i> (400 MHz; CDCl_3).....	52
Tabela 5: RMN de ^{13}C dos compostos CR1a (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina), CR1b (aiapina), CR2a (preniletina) e CR2b (preniletina-metil-éter) isolados de <i>P. polystachyum</i> (100 MHz; CDCl_3).....	53

Resumo

O gênero *Pterocaulon* agrupa cerca de 20 espécies sendo 10 delas encontradas no Rio Grande do Sul. Várias espécies de *Pterocaulon*, conhecidas como “Quitoco”, são utilizadas na medicina popular na forma de infusão ou decocto com diferentes fins terapêuticos. O extrato metanólico bruto e as frações de *Pterocaulon polystachyum* apresentam largo espectro de ação contra uma gama de fungos patogênicos, sendo esta atividade atribuída às cumarinas, compostos químicos majoritários nas espécies deste gênero. Considerando que os fármacos antifúngicos são também empregados no tratamento de doenças parasitárias causadas por protozoários, torna-se relevante avaliar se estas plantas apresentam esta atividade. Para tanto, utilizou-se uma cepa de *Acanthamoeba castellanii*, ameba de vida livre causadora de ceratite ocular a qual exige longo e complexo tratamento. Essa doença atinge especialmente usuários de lentes de contato, cujo crescente aumento, torna necessária a busca de novos fármacos no intuito de se obter terapias mais dinâmicas e que facilitem a adesão dos pacientes. Além disso, este protozoário possui a habilidade de encistar, tornando-se resistente aos fármacos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade amebicida do extrato metanólico bruto, das frações hexano, diclorometano e metanol, e do exudato de *P. polystachyum* frente aos trofozoítos e cistos de *A. castellanii*, assim como isolar e identificar cumarinas presentes na amostra mais ativa. A espécie *P. polystachyum* apresentou relevante propriedade amebicida frente aos trofozoítos de *A. castellanii*, principalmente as frações apolares ricas em cumarinas. Da planta foram isolados dois produtos os quais são formados por duas cumarinas cada, identificadas como 5-metóxi-6,7-metilenodioxycumarina e aiapina, e preniletina e preniletina-metil-éter, respectivamente. Estes resultados são promissores na busca de novo agente terapêutico para a ceratite amebiana, abrindo caminho a novos testes, tais como de toxicidade em células oculares, testes *in vivo* e o desenvolvimento de uma formulação oftálmica adequada.

Palavras-chave: *Pterocaulon*, Asteraceae, atividade amebicida, *Acanthamoeba*.

Abstract

The genus *Pterocaulon* includes about 20 species and 10 of them are found in Rio Grande do Sul. Several species of *Pterocaulon*, known as "Quitoco", are used in popular medicine as infusion or decocto with different therapeutic purposes. The crude methanol extract and fractions of *Pterocaulon polystachyum* presented a broad spectrum of action against a range of pathogenic fungi, and this activity was attributed to the coumarins, the main compounds found in the species of this genus. Whereas the antifungal drugs are also employed in the treatment of diseases caused by parasitic protozoa, it is important to assess whether these plants have this activity. Thus, in this work a strain of *Acanthamoeba castellanii* was used. This free-living amoeba causes acute amoebic keratitis, a disease that needs long and complex treatment. The increasing number of contact lens users enhances the frequency of the illness making necessary search for new drugs in order to obtain more dynamic therapies that make it easier for patients to maintain long-term treatment. Moreover, because of its capacity to form cysts, some strains of this protozoan are excellent opportunists and therapy-resistant. Thus, the aim of this work was to evaluate the amebicidal activity of crude extract, hexane, dichloromethane and methanol fractions, and exudate of *P. polystachyum* against cysts and trophozoites of *A. castellanii* and to quantify the coumarins and to isolate the main components of the most active extract. The plant presented relevant amebicidal property against trophozoites of *A. castellanii*, mainly in lipophilic fractions rich in coumarins. From the plant two compounds were isolated. They are formed by two coumarins each identified as 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin and ayapin, prenyletin and prenyletin-methyl-ether, respectively. These results are promising for the discovery of a new therapeutic agent for the amoebic keratitis and suggest the development of new tests, such as toxicity in eye cells, *in vivo* tests and the development of an ophthalmic formulation appropriate.

Keywords: *Pterocaulon*, Asteraceae, amebicidal activity, *Acanthamoeba*.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços observados na medicina, as plantas ainda são utilizadas como alternativa no tratamento de diversas doenças, apresentando fundamental importância na saúde da população. Estima-se que aproximadamente 25% do arsenal terapêutico atual é derivado diretamente ou indiretamente de vegetais. Em alguns casos particulares, tais como fármacos antitumorais e antimicrobianos, aproximadamente 60% das alternativas disponíveis no mercado e a maioria daquelas em estágio de experimentação clínica provêm de produtos naturais (CALIXTO, 2000).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de matérias primas vegetais têm início com a coleta de plantas relacionadas taxonomicamente às espécies com compostos ativos já conhecidos, ou que são utilizadas na medicina popular de uma região. Os extratos dessas plantas são submetidos à triagem biológica em ensaios farmacológicos. A presença de efeito farmacológico direciona o processo de isolamento de princípios ativos através do biomonitoramento pelos testes de atividade. Para a descoberta do mecanismo de ação desses compostos a biologia molecular disponibiliza ferramentas que permitem determinar os sítios celulares ou fisiológicos envolvidos nesse processo (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

A indústria farmacêutica tem demonstrado interesse renovado na investigação de matérias primas vegetais como fontes de novas estruturas químicas e também para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com eficácia, segurança e qualidade comprovados (CALIXTO, 2000).

As plantas podem servir como futuros protótipos farmacêuticos importantes oriundos da medicina popular (HOULT e PAYÁ, 1996). Neste contexto, as diferentes espécies de *Pterocaulon*, família Asteraceae, são difundidas popularmente em várias regiões do mundo devido a sua utilização em diversas enfermidades, tornando importante o estudo aprofundado destas.

O gênero *Pterocaulon* possui cerca de 18 espécies, 11 destas encontradas no Brasil, sendo que 10 espécies ocorrem no Rio Grande do Sul (CABRERA e RAGONESE, 1978; LIMA, 2006).

AVANCINI (2002), em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, indicou que espécies de *Pterocaulon* são utilizadas no tratamento de doenças de pele em animais, popularmente diagnosticadas como micoses. Posteriormente, STEIN e colaboradores (2005) comprovaram a atividade antifúngica de extratos de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum*. Esta atividade foi atribuída, pelos autores, as cumarinas presentes como compostos majoritários nestas espécies.

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* são amebas de vida livre com comportamento ambíguo. Podem apresentar-se sob as formas trofozoítica (metabolicamente ativa) e cística. No seu estado cístico são protegidas das condições desfavoráveis do meio ambiente, tais como temperaturas extremas e numerosos agentes antimicrobianos, possuindo a habilidade e resistência de sobreviver em diversos locais (KHAN, 2006).

Algumas espécies de *Acanthamoeba*, tais como *A. castellanii*, são responsáveis pela ceratite amebiana, patologia definida como inflamação crônica da córnea. Essa doença exige longo e complexo tratamento, atingindo especialmente usuários de lentes de contato, cujo crescente aumento, torna necessária a busca de novos fármacos no intuito de se obter terapias mais dinâmicas e que facilitem a adesão dos pacientes, uma vez que ainda resultam em casos de prolongada morbidade e significativa perda visual.

Baseando-se no fato de que alguns antifúngicos, tais como a anfotericina B, são usados como antiprotozoários, torna-se relevante a realização de ensaios bioguiados com o intuito de avaliar a atividade amebicida da espécie *Pterocaulon polystachyum* frente à cepa de *Acanthamoeba castellanii*.

2. OBJETIVOS

Considerando os dados existentes na literatura para as espécies de *Pterocaulon*, os objetivos desse trabalho são:

Isolar e identificar os componentes majoritários presentes na fração mais ativa da planta.

Quantificar o teor de cumarinas na fração lipofílica de *Pterocaulon polystachyum*.

Determinar a atividade amebicida de diferentes extratos de *Pterocaulon polystachyum* frente a *Acanthamoeba castellanii*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Revisão sobre o gênero *Pterocaulon*

3.1.1 Taxonomia e morfologia

A família Asteraceae compreende cerca de 1.500 gêneros, com aproximadamente 23.000 espécies separadas nas subfamílias Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae, com ampla distribuição em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991; JOLY, 1991). No Brasil esta família está representada por aproximadamente 196 gêneros e 1.900 espécies (BARROSO, 1991).

O nome da família Asteraceae deriva da estrutura em capítulos florais característica da sua inflorescência (CABRERA, 1974; CRONQUIST, 1981; JOLY, 1991). O capítulo floral é composto por um receptáculo no qual se inserem as flores, rodeadas por brácteas involucrais. Neste involúcro constam uma ou mais séries de brácteas herbáceas, coriáceas ou escariosas, livres ou soldadas nos seus bordos. O receptáculo pode ser delgado ou carnoso, maciço ou oco, côncavo, plano, convexo ou cônico. A superfície pode ser quase lisa, estando marcada pelas cicatrizes da inserção das flores, podendo estar desnudo ou coberto por tricomas. A flor hermafrodita com corola tubulosa, pentadentada ou pentalobada no limbo, é o tipo de flor que se encontra na parte interior dos capítulos da maioria das espécies de Asteraceae (CABRERA, 1963).

Os representantes desta família podem ser encontrados como ervas, arbustos, árvores baixas ou médias, com indumento variado não secretor ou glanduloso, com ou sem sistema de canais lactíferos e condutos ou depósitos, esquizolisígenos de resina, freqüentemente com floema ou canais vasculares em uma medula (SALINAS, 1992).

A subfamília mais numerosa é Asteroideae, na qual as espécies estão distribuídas em 10 tribos, 57 subtribos e 1.135 gêneros, e a esta pertence à tribo Plucheeae (BREMER, 1994). A mais recente reclassificação filogenética desta subfamília elevou para 20 o número de tribos (PANERO e FUNK, 2002).

A tribo Plucheeae inclui 28 gêneros e em torno de 220 espécies, freqüentemente encontradas nas Américas do Sul e Central, como também na África, Ásia e Austrália (BREMER, 1994). Os quatro grupos monofiléticos para esta tribo são *Coleocoma*, *Pterocaulon*, *Laggera* e *Pluchea*. O grupo *Pterocaulon* compreende os gêneros *Pterocaulon* Ell., *Neojeffreya* Cabr. e *Stenachaenium* Benth (ANDERBERG, 1991).

CABRERA e RAGONESE (1978) consideram que o gênero *Pterocaulon* pode ser dividido em quatro seções. A seção *Monenteles* (exclusivamente australiana) caracteriza-se pela disposição das brácteas involucrais diferenciada em duas regiões. As outras seções são americanas e possuem o involúcro de brácteas involucrais imbricadas, sendo as exteriores gradualmente menores. A seção *Pterocaulon* é caracterizada pela presença de folhas incano-tomentosas na face adaxial, e a seção *Lanatocaulon* possui folhas lanosas em ambas as faces. Já a seção *Pterocaulopsis*, caracteriza-se por não apresentar indumento lanoso ou tomentoso, sendo observado somente tricomas glandulares.

As espécies do gênero *Pterocaulon* possuem involúcro longo, formado por poucas séries de brácteas linear-lanceoladas, sendo as exteriores gradualmente menores, caducas com as flores. Receptáculo pequeno, hirsuto ou glabro. Suas flores são dimorfas: as marginais pluriseriadas, femininas, com corolas filiformes truncadas ou com 2-3 dentes no ápice e as centrais são hermafroditas ou masculinas por esterilidade do gineceu, com corola tubulosa estreita, pentadenteada no limbo. Folhas alternadas, inteiras ou dentadas. Capítulos pequenos, sésseis, dispostos em glomérulos terminais ou em espigas (CABRERA, 1974).

3.1.2 Distribuição geográfica

O gênero *Pterocaulon* agrupa cerca de 18 espécies, distribuídas por uma área geográfica bicêntrica, onde 12 espécies estão presentes desde o sul dos Estados

Unidos até o centro da Argentina, e 6 são australianas indo a Nova Caledônia, Indonésia e sudeste da Ásia (CABRERA e RAGONESE, 1978).

Estudo abrangente realizado por FREIRE (1995) da Flora Fanerogâmica da Argentina foi verificada a presença de 10 das 11 espécies sul-americanas.

Pterocaulon angustifolium, *P. cordobense* e *P. balansae* são relatados na região sul do Uruguai por ROSENGURTT (1946). Em 1983, LOMBARDO acrescentou *P. virgatum* a estas. No Paraguai ocorrem dez espécies deste gênero, na Venezuela três, em Cuba duas e no Peru foi encontrado somente *P. alopecuroides* (LIMA, 2006). Para o Brasil, são citados *P. rugosum*, *P. alopecuroides* e *P. balansae* no estado do Rio de Janeiro e no estado do Paraná, estas acrescidas de *P. angustifolium* (BARROSO, 1959; ANGELY, 1965). LIMA (2006) indica que no Rio Grande do Sul e demais estados do sul do Brasil ocorrem 10 espécies do gênero *Pterocaulon*, conforme demonstrado a seguir (tabela 1).

Tabela 1: Espécies de *Pterocaulon* citadas para a região sul do Brasil, segundo os autores e anos de publicação.

	Malme, 1931	Rambo, 1952	Cabrera, 1974	Cabrera e Ragonese, 1978	Seeliger, 1992	Cabrera e Freire, 1998
<i>P. alopecuroides</i> (Lam.) DC.	-	Sul	Sul	Sul	-	Sul
<i>P. angustifolium</i> DC.	RS	Sul	Sul	RS	-	Sul
<i>P. balansae</i> Chodat	RS	Sul	Sul	Sul	-	Sul
<i>P. cordobense</i> Kuntze	RS	Limite norte do RS	-	RS	-	Sul
<i>P. lorentzii</i> Malme	RS	Limite norte do RS	Sul	Sul	RS	Sul
<i>P. polypterum</i> (DC.) Cabrera	RS	Limite norte do RS	-I	RS, SC	-	-
<i>P. polystachyum</i> DC.	RS	Sul	Sul	RS, SC	-	Sul
<i>P. purpurascens</i> Malme	-	Limite norte do RS	-	-	RS	-
<i>P. rugosum</i> (Vahl) Malme	-	Sul	Sul	PR, SC	-	Sul
<i>P. virgatum</i> (L.) DC.	-	Sul	-	RS, SC	-	Sul

Estudos etnobotânicos relatam que as partes aéreas de *P. polystachyum* apresentam tradicional utilização na Argentina como repelente de pulgas e moscas e em casos de insolação (DEBENEDETTI *et al.*, 1994^A). As espécies *P. purpurascens* e *P. virgatum*, também são utilizadas por estes povos devido as suas propriedades

digestivas, emenagogas, inseticidas e como agente contra picada de serpentes (DEBENEDETTI *et al.*, 1992).

A espécie *P. sphacelatum* (Labill.) Benth. & Hook. F. ex F. Muell é utilizada por povos australianos, apresentando-se efetiva no tratamento de infecções respiratórias, irritações oculares e também como inibidora na replicação de poliovírus tipo 1 (SEMPLE *et al.*, 1998).

AVANCINI (2002) indicou que as plantas conhecidas como “Quitoco” (*Pterocaulon* spp.) eram utilizadas no tratamento de doenças de pele em animais, diagnosticadas popularmente como sendo micoses. Mais tarde, STEIN e colaboradores (2005) comprovaram a atividade antifúngica de extratos obtidos de algumas espécies deste gênero, entre estas *Pterocaulon polystachyum*. A correlação entre esta comprovada atividade e o fato de que fármacos antifúngicos são usados também como antiprotozoários, despertou o interesse na avaliação da atividade amebicida desta espécie.

3.1.3 *Pterocaulon polystachyum*

Erva perene lenhosa de 50 a 100 cm de altura, raiz pivotante, curta e grossa da qual partem delgadas raízes secundárias. Caule simples densamente ramificado no ápice, folhoso até a inflorescência, com tricomas glandulares curtos e densos, apresentando um aspecto pubescente-aveludado. Folhas muito próximo umas das outras, diminuindo de tamanho gradativamente em direção ao ápice. As basais oval-lanceoladas, concolores, face adaxial e abaxial glandulosas, serradas na margem, ápice agudo. Folhas apicais iguais as basais diferindo no tamanho. Capitulescência apical em panícula tirsóide de espigas. Capítulos heteromorfos, campanulados, brácteas involucrais paucisseriadas, com numerosas flores pistiladas, radiais, filiformes, esbranquiçadas, sem tricomas glandulosos, pápus cerdoso-barbelado, unisseriado. Flores estaminadas, no disco, tubulosas, esbranquiçadas, com tricomas glandulares

nos lacínios, pápus cerdoso-barbelado, uniseriado, ovário aparentemente estéril. Cipselas elipsóides, pentacostadas, pubescentes-glandulosas (LIMA, 2006).



Figura 1: *Pterocaulon polystachyum*

Esta espécie distribui-se no Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina, e no sul do Brasil, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CABRERA e RAGONESE, 1978). Neste último, é muito comum e pode ser observada na margem das estradas, em campos, borda de matas e no curso de águas (LIMA, 2006). Floresce do final de dezembro a março, e frutifica de fevereiro a abril.

Pterocaulon polystachyum possui odor forte e característico devido ao conteúdo de óleos voláteis encontrados nos tricomas glandulares presentes nas partes aéreas, fato que o leva a ser usado como repelente de pulgas e moscas (CABRERA e RAGONESE, 1978).

3.1.4 Composição química das espécies de *Pterocaulon*

Nas espécies do gênero *Pterocaulon*, encontram-se compostos como monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, poliacetilenos (MAGALHÃES *et al.*, 1989; VILEGAS *et al.*, 1995) e alguns ácidos fenólicos, tais como ácido caféico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeoilquínico (DEBENEDETTI *et al.*, 1998). Contudo, a maioria dos estudos se refere ao isolamento de cumarinas simples, todas 6,7 dioxigenadas e consideradas como produtos naturais característicos do gênero.

MAGALHÃES e colaboradores (1981) relataram o isolamento de oito cumarinas das partes aéreas das espécies *P. balansae* e *P. lanatum*, sendo quatro destas novas moléculas descritas como: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-5,6-metilenodioxicumarina; 7-(2,3-diidroxil-3-metilbutiloxi)-5,6-metilenodioxicumarina; 2',3'-epoxipuberulina e 2',3'-diidroxipuberulina.

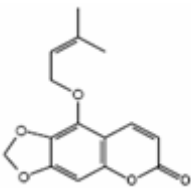
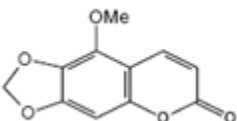
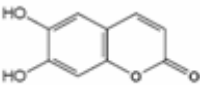
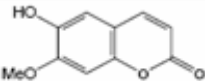
Estudos realizados por DEBENEDETTI *et al.* (1994^A), levaram ao isolamento de 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina e 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, de *Pterocaulon balansae*. Um trabalho mais recente realizado com esta espécie relata o isolamento da cumarina sabandinol e de dois esteróides (estigmasterol e 3-O-acetiltaraxasterol) e dois flavonóides (quercetina e taxifolina 7-O-prenilada) (HEEMANN *et al.*, 2006).

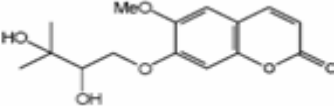
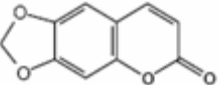
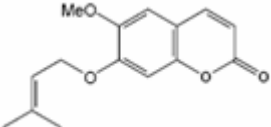
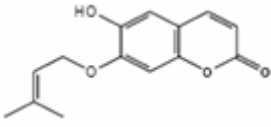
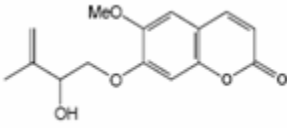
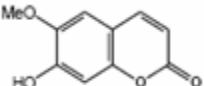
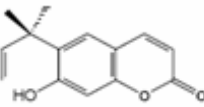
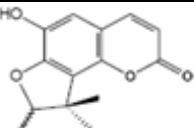
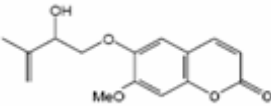
VILEGAS e colaboradores (1995) estudaram partes aéreas da espécie *P. alopecuroides* e obtiveram duas cumarinas oxipreniladas, 7-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxi cumarina e 7-(2,3-di-hidroxi-3 metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxi cumarina e um flavanonol, 3,5,3',4'-tetra-hidroxi-7-(2,3-eno-3-metilbutioxi)-2,3-dihidroflavonol.

Em 2001, VERA e colaboradores relataram o isolamento e identificação de 17 cumarinas das partes aéreas de *P. polystachyum*, sendo duas citadas como novos produtos (6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxicumarina e desmetilniesoutina) e outras quatro como novidades para a espécie (isovirgatenol, 3-desoxiobtusina, 6-metoxi-7-

(2-hidroxietoxi)-cumarina e 5-(2-hidroxietoxi)-6,7-metilenodioxicumarina). As demais cumarinas isoladas foram: aiapina, isoescopoletina, preniletina, preniletina metil éter, virgatenol, obtusinina, 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, 5-(3,3-dimetilaliloxi)-6,7-metilenodioxicumarina, 5-(2',3'-dihidroxi-3-metilbutanoxi)-6,7-metilenodioxicumarina, haplopinol metil éter e 5-hidroxi-6,7-metilenodioxo-8-(3,3-dimetilalil) cumarina. Desta mesma espécie, além das cumarinas, foram isolados quercetina e isoramnetina, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, ácido 4,5-dicafeolquínico, ácido 3,5-dicafeolquínico, ácido 3,4-dicafeolquínico (DEBENEDETTI *et al.*, 1994^A).

A figura a seguir (figura 2) apresenta as estruturas das cumarinas encontradas na espécie *Pterocaulon polystachyum*.

Substância	Estrutura	Referência
5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Riveiro <i>et al.</i> , 2004
5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina		Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001 Riveiro <i>et al.</i> , 2004
Esculetina		Palacios <i>et al.</i> , 1999
Isoescopoletina		Vera <i>et al.</i> , 2001

Obtusina		<i>Vera et al., 2001</i>
Aiapina		<i>Palacios et al., 1999</i> <i>Vera et al., 2001</i>
7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (preniletina-metil-éter)		<i>Palacios et al., 1999</i> <i>Vera et al., 2001</i>
Preniletina		<i>Palacios et al., 1999</i> <i>Vera et al., 2001</i>
Virgatenol		<i>Palacios et al., 1999</i> <i>Vera et al., 2001</i>
Escopoletina		<i>Palacios et al., 1999</i>
6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxicumarina		<i>Vera et al., 2001</i>
Desmetilniexoutina		<i>Vera et al., 2001</i>
Isovirgatenol		<i>Vera et al., 2001</i>

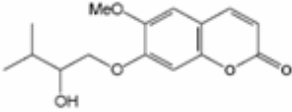
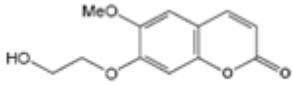
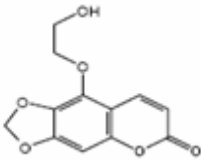
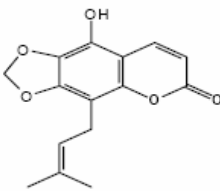
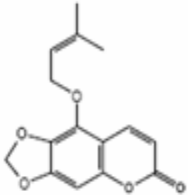
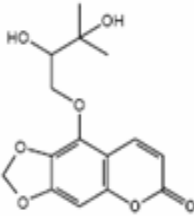
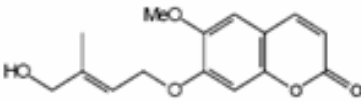
3'-desoxiobtusina		Vera et al., 2001
6-metoxi-7-(2'-hidroxietoxi)- cumarina		Vera et al., 2001
5-(2'-hidroxietoxi)-6,7- metilenodioxicumarina		Vera et al., 2001
5-hidroxi-6,7-metilenodioxo-8- (3,3-dimetilalil) cumarina		Vera et al., 2001
5-(3,3-dimetilaliloxi)-6,7- metilenodioxicumarina		Vera et al., 2001
5-(2',3'-diidroxi-3- metilbutanoxi)-6,7- metilenodioxicumarina		Vera et al., 2001
Metil éter haplopinol		Vera et al., 2001

Figura 2: Estruturas das cumarinas citadas para *Pterocaulon polystachyum*

3.1.5 Aspectos quimiotaxonômicos

FRITZ e colaboradores (2003) encontraram relatos da ocorrência de aproximadamente 150 cumarinas na família Asteraceae. As cumarinas classificadas como simples e 6,7 dioxigenadas encontradas em *Pterocaulon* constituem os principais metabólitos secundários deste gênero (LIMA, 2006). Algumas destas cumarinas são consideradas fitoalexinas, com papel semelhante ao dos anticorpos em animais e que são biossintetizadas quando as plantas são infectadas por microrganismos fitopatogênicos como vírus, bactérias e fungos, ou quando estão sob condições de estresse, como seca, frio e ação de luz intensa (PINTO *et al.*, 2002).

STEIN *et al.* (2005) verificaram que extratos obtidos de algumas espécies de *Pterocaulon* apresentam potencial antifúngico frente a diversos fungos patogênicos, sendo esta ação atribuída às cumarinas presentes nestas espécies. Por conseguinte, os autores descrevem, ainda, esta classe de compostos como sendo fitoalexinas tanto por estarem, na sua grande maioria, localizadas na superfície das partes aéreas do vegetal, junto às ceras epicuticulares, quanto pela comprovação da atividade antifúngica das plantas.

3.1.6 Aspectos biológicos e farmacológicos

Atualmente, mais de 1.300 cumarinas já foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas. As propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas de cumarinas simples dependem de seus padrões de substituição (HOULT e PAYÁ, 1996).

Várias espécies do gênero *Pterocaulon* são utilizadas na medicina popular na forma de infusão ou decocto para diferentes fins terapêuticos. Estas plantas são relatadas como sendo digestivas, anti-sépticas e inseticidas, entre muitas outras propaladas propriedades, sendo que algumas já foram estudadas e comprovadas.

3.1.6.1 Atividade inseticida e antiparasitária

A utilização de certos pesticidas no controle de insetos pode acarretar efeitos nocivos e irreversíveis ao meio ambiente e a outras espécies de insetos, contudo, o uso de extratos de plantas como inseticidas faz-se de grande interesse, por representar uma alternativa menos tóxica ao ecossistema (FATOPE *et al.*, 1993).

Nesta visão, estudos realizados na Argentina por CICCIA e colaboradores (2000) relatam a ação de *P. polystachyum* como inseticida, apresentando atividade contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de arbovírus, responsável pela febre amarela e pela dengue hemorrágica.

Spodoptera frugiperda Smith (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho, é a principal praga da cultura do milho no Brasil, acarretando severos prejuízos a estas. Atualmente, o grande problema é o desenvolvimento de populações resistentes aos produtos químicos utilizados no controle destas (SILVA *et al.*, 1997).

Em trabalho desenvolvido por VERA e colaboradores (2006), foram testadas cinco cumarinas quanto à atividade fagoinibidora, entre elas: 6-hidroxi-7-isopreniloxicumarina, 6-metoxi-7-isopreniloxicumarina, 6,7-metilenodioxycumarina, 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina, e 6-metoxi-7-(2-hidroxi-2-oxi) cumarina, de *P. polystachyum*, frente às larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Avaliou-se, também, a atividade de dois análogos sintetizados em laboratório, escopoletina e 2-metoxi-2-metil-3,4,5,6,7,8-hexaidro-3H-croman-5-ona, para comparação dos resultados. As cumarinas naturais induziram 100% de fagodepressão. A mistura equimolar binária das cumarinas naturais foram fagodepressoras, indicando que estes compostos podem agir sinergicamente contra as larvas de *S. frugiperda*.

FURTADO (2006) testando diversas plantas com atividade antiparasitária para ovinos, observou que os extratos de *P. balsanae* apresentaram ação inibitória sobre o desenvolvimento larval dos ovos de tricostrongilídeos. Em 48 horas o extrato de *P.*

balansae apresentou índices de 100% na inibição do desenvolvimento embrionário, ou seja, interrompeu totalmente a evolução natural dos ovos. Dada à potencialidade anti-helmíntica do vegetal, foram realizados testes de eficácia antiparasitária *in vivo*, obtendo-se redução no número de ovos de tricostrongilídeos eliminados nas fezes dos ovinos, na ordem de 47%. Esta diferença entre o percentual dos testes *in vitro* e dos testes pode estar associada ao fato de que o extrato de *P. balansae* foi usado em concentração baixa e apenas por três dias, além dos animais portarem infecções parasitárias mistas e naturais, diminuindo a demonstração do potencial vermífico do extrato testado.

3.1.6.2 Atividade antiviral

A espécie *P. sphacelatum* é utilizada na medicina tradicional dos povos aborígenes australianos para o tratamento de queimaduras, assim como em resfriados, infecções respiratórias, feridas de pele e doenças oculares. O extrato etanólico das partes aéreas desta planta apresentou grau de inibição de 75% de polivírus tipo 1, representante da família de RNA vírus Picornaviridae, na qual se inclui o rinovírus, o mais freqüente agente causador do resfriado comum. O fracionamento bioquímico do extrato de *P. sphacelatum* levou ao isolamento do flavonóide responsável pela atividade antiviral, crisosplenol C (3,7,3'-trimet-5,6,4'-triidroxiflavona). Este composto pertence ao grupo 4'-hidroxi-3-metoxiflavona, os quais são inibidores potentes e específicos na replicação picornaviral (SEMPLE *et al.*, 1999).

3.1.6.3 Atividade antifúngica

Os extratos metanólicos brutos e frações hexano, diclorometano e metanol de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* apresentam largo espectro de ação contra uma gama de fungos patogênicos, como *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas e dermatológicas em humanos, e altamente resistentes aos tratamentos convencionais, e dermatófitos causadores de micoses cutâneas como de “pé de atleta” e de onicomicoses. Os microrganismos mais

susceptíveis foram os fungos *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. A atividade antifúngica destas espécies é atribuída às cumarinas, compostos químicos majoritários e responsáveis por outras atividades reconhecidas (STEIN *et al.*, 2005).

3.1.6.4 Atividade antibacteriana

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem levado ao surgimento de cepas de microrganismos cada vez mais resistentes as terapias convencionais, aumentando-se consideravelmente a procura por novas substâncias eficazes. As plantas, que há muitas gerações são utilizadas por diversos povos devido as suas propriedades antiinflamatórias e anti-infecciosas, entre outras, possuem um papel fundamental nesta descoberta.

KANLAYAVATTANAKUL e colaboradores (2003) avaliaram compostos isolados de *P. redolens* quanto à atividade antituberculose, onde seis cumarinas e um flavonóide demonstraram serem ativos frente ao microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.6.5 Atividade citotóxica e antiproliferativa

MONGELLI e colaboradores (2000) pesquisaram sete plantas da Argentina com uso etnobotânico relacionado ao câncer. Os extratos destas foram submetidos a um estudo biológico para detectar a atividade citotóxica. *Pterocaulon polystachyum* inibiu o crescimento de tumor de bÍlis, mostrando a correlação entre os dados experimentais e o uso relatado para esta planta. Além disso, os resultados obtidos indicam a presença de compostos que interagem com DNA.

Testes realizados por RIVEIRO e colaboradores (2004) mostraram o efeito de diferentes extratos e de duas cumarinas 5,6,7-trioxigenadas isoladas de *P. polystachyum*, quanto à proliferação e diferenciação de células leucêmicas humanas U-937. A atividade mais significativa foi apresentada pelo extrato éter de petróleo. Entretanto, o tratamento com os compostos isolados 5-metoxi-6,7-

metilenodioxycumarina e 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina mostrou inibição na proliferação celular pronunciada, dependente de tempo e concentração, além de alterar a funcionalidade CD 88 e a redução de NBT, marcadores de diferenciação monocítica celular. Estes resultados sugerem que as cumarinas isoladas possam ter um potencial terapêutico importante no tratamento da leucemia.

3.2 Atividade antiprotozoária de cumarinas

As cumarinas possuem um espectro amplo de atividade biológica. Entre os promissores estudos, podem ser citados aqueles relacionados com a atividade antiprotozoária *in vitro*.

SCIO e colaboradores (2003) isolaram da planta *Kielmeyera albopunctata* a cumarina 4-(1-metilpropil)-5,7-didroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil) cromen-2-ona e observaram que esta apresenta atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com alta taxa de mortalidade dos parasitos após 24h de contato dessa substância com sangue infectado.

As cumarinas isoméricas 5-metilcumarina, 2'-epicicloisobraquicumarinona epóxido e cicloisobraquicumarinona epóxido isoladas de *Vernonia brachycalyx* a partir de um ensaio bioguiado, apresentaram atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania major* e frente a esquizontes de *Plasmodium falciparum*. Além disso, essas cumarinas demonstraram inibição da proliferação de linfócitos humanos, a qual foi significativamente mais fraca do que a atividade antiparasitária (OKETCH-RABAH *et al.*, 1997). A atividade antimalárica também foi demonstrada para a cumarina 5,7-dimetoxi-8-(3'-hidroxi-3'-metil-1'-buteno), encontrada em extrato metanólico das raízes da planta *Toddalia asiatica* (OKETCH-RABAH *et al.*, 2000).

3.3 Revisão sobre *Acanthamoeba*

3.3.1 Amebas de vida livre

As amebas de vida livre constituem um grupo de protozoários amplamente disperso na natureza, ocorrendo no solo, ar, água doce e do mar, poeira e também na orofaringe de indivíduos saudáveis, entre outros locais. Algumas espécies podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e de animais domésticos (LARKIN *et al.*, 1990; WALOCHNIK *et al.*, 2002; KHAN, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004a).

Os cistos deste grupo de amebas resistem a extremas condições de pH e temperatura, assim como ao cloro e a certos sistemas de desinfecção. Além disso, podem estar internalizadas nestas, bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella spp.*, além de fungos, vírus, outros protozoários e até mesmo algas que são utilizados como substrato alimentar (AKSOZEK *et al.*, 2002; ALVES, 2001; KHAN, 2006).

Atualmente, as espécies de interesse clínico são *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e espécies do gênero *Acanthamoeba*.

3.3.2 Gênero *Acanthamoeba*

Acanthamoeba é um gênero que inclui as amebas de vida livre, as quais apresentam comportamento anfizóico. Podem ocorrer sob as formas trofozoítica e cística durante seu ciclo de vida, multiplicando-se, na forma assexuada, por divisão binária. Os trofozoítos apresentam-se como a forma vegetativa celular, ou seja, estado no qual as amebas se locomovem, se alimentam e se reproduzem. Estes se apresentam como células de formato variável e que possuem um núcleo bem definido e nucléolo grande, além de diversos vacúolos citoplasmáticos que fagocitam bactérias, algas, leveduras e pequenas partículas orgânicas para manutenção da vida celular, dentre os quais o vacúolo contrátil envolvido no controle osmótico celular. Os

pseudópodes se formam constantemente e são responsáveis pela locomoção. Os acantopódios, projeções aciculiformes da membrana típicas de *Acanthamoeba*, permitem a adesão do protozoário em superfícies, os movimentos celulares e a captura de presas (ALVES, 2001; KHAN, 2006).

Figura 3: *Acanthamoeba castellanii*

Para a *Acanthamoeba* permanecer em sua forma trofozoítica, condições como abundante suplemento alimentar, pH neutro, temperatura e osmolaridade apropriados devem ser mantidos; ao contrário, condições extremas podem induzir a transformação dos trofozoítos em cistos (encistamento). Na forma cística, a ameba se condensa formando uma estrutura redonda com dupla parede celular que a protege para sobreviver em condições hostis, mantendo-se metabolicamente inativa ou com atividade metabólica mínima (KHAN, 2006).

No estado cístico, a ameba é protegida das condições desfavoráveis do meio ambiente, tais como temperaturas extremas e certos agentes antimicrobianos, possuindo a habilidade de sobreviver em locais como piscinas, garrafas de água, ductos de ventilação, instrumentos cirúrgicos, estojos de lentes de contato, por longos períodos de tempo. Além disso, pode ser encontrada em hospitais, em unidades de diálise, em cavidades nasais humanas, em lesões de pele e em fluido cérebro-espinhal (KHAN, 2006). Os cistos são compostos por celulose e diversas proteínas, e possuem

duas paredes: o endocisto e o ectocisto. Também apresentam um opérculo, ponto determinado por onde ocorre o desencistamento. De forma geral, o ectocisto é mais esférico, enquanto o endocisto apresenta diversas formas poligonais (ALVES, 2001).

Estudos mostram que os cistos podem apresentar-se viáveis durante muitos anos conservando sua patogenicidade. Em condições favoráveis pode ocorrer o excistamento e a ameba volta a sua forma trofozoítica. Tanto o encistamento, quanto o excistamento requerem ativa síntese de macromoléculas (KHAN, 2006).

Nos últimos anos a classificação morfológica deu lugar ao uso de técnicas moleculares, muitas vezes com o abandono de hipóteses sobre as relações filogenéticas e o reconhecimento de novas espécies. Esta metodologia, baseia-se principalmente na comparação da seqüência conservada dos genes das subunidades 16S e 18S do rDNA. Por este método o gênero *Acanthamoeba* está dividido em 16 diferentes genótipos, que estão relacionados com a virulência da ameba, sendo classificados em T1, T2a e T2b, T3 à T15 (GAST, 2001; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004).

Em relação à patologia, o resultado dessa abordagem encontra forte correlação entre o grupo T4 e a ocorrência de úlcera de córnea. Desta forma, este foi o grupo escolhido para a avaliação da atividade amebicida no presente estudo.

Algumas espécies de *Acanthamoeba* são patógenos oportunistas que podem causar encefalite amebiana granulomatosa e ceratite crônica amebiana, mas também podem estar associadas com lesões cutâneas e sinusite em pacientes imunocomprometidos (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004a, b).

3.3.3 Ceratite por *Acanthamoeba*

A ceratite por *Acanthamoeba* pode ser definida como inflamação crônica da córnea, e tem como principais fatores de risco associados o uso de lentes de contato, de água ou solução das lentes de contato contaminadas e o trauma corneano (ALVES, 2001; OBEID *et al.*, 2003).

Os primeiros relatos de ceratite por *Acanthamoeba* surgiram em 1973 e, a partir da década de 80, a infecção tornou-se cada vez mais difundida. Mesmo após o diagnóstico correto, a grande problemática desta patologia clínica envolve a determinação do tratamento eficaz, uma vez que as amebas, especialmente na forma de cistos, mostram-se bastante resistentes a uma série de quimioterápicos (ALVES, 2001).

Em contato com a córnea, os trofozoítos aderem e penetram no epitélio. Esta aderência é mediada por uma proteína da membrana do trofozoíto, que se liga à manose de glicoproteínas do epitélio da córnea. Estudos sugerem que enzimas como neuraminidase, elastase e várias proteases podem ser fatores que determinam a infecção por *Acanthamoeba*. Após a penetração, seguem-se ulcerações, infiltrado em forma de anel e inflamações (ALVES, 2001).

Os sintomas da doença consistem em visão borrada, dor intensa, fotofobia, blefaroespasmos e sensação de corpo estranho. Os sinais incluem diminuição da sensibilidade corneana, irite, uveíte, esclerite, hifema, hipópio e aumento da pressão intra-ocular (AURAN *et al.*, 1987).

O diagnóstico laboratorial da ceratite amebiana é realizado pela identificação do isolado a partir de cultura de material proveniente de raspados de córnea.

3.3.3.1 Terapêutica da ceratite por *Acanthamoeba*

Devido à habilidade de encistar-se, a *Acanthamoeba* apresenta-se como um excelente agente oportunista resistente à terapêutica (COHEN *et al.*, 1987). Caso a doença não tenha um tratamento adequado no estágio inicial, o parasito pode invadir profundamente a córnea e outros segmentos oculares (MCCLELLAN e COSTER, 1987).

Diversos antimicrobianos podem ser usados contra a *Acanthamoeba* (AURAN *et al.*, 1987). Entretanto, devido à formação de cistos, podem se tornar resistentes ao tratamento, sendo a combinação de agentes antimicrobianos, geralmente recomendada. O uso de anti-sépticos catiônicos como digluconato de clorexidina e biguanida políexametileno (PHMB), inibidores das funções de membrana, são efetivos contra trofozoítos e parcialmente frente aos cistos (AURAN *et al.*, 1987; OBEID *et al.*, 2003). Estes, em conjunto com os aromáticos como a hexamidina, pentamidina ou o isotionato de propamidina (Brolene[®]), agem inibindo a síntese de DNA. Aminoglicosídeos como neomicina e paramomicina, inibem a síntese protéica. Os antifúngicos imidazois como fluconazol, cetoconazol, itraconazol e miconazol, e os poliênicos como a anfotericina B possuem a função de desestabilizar a parede celular e são utilizados em conjunto com os aminoglicosídeos. A terapêutica é mantida entre 6 a 12 meses ou até mesmo acima deste período (AURAN *et al.*, 1987; CHOMICZ *et al.*, 2005).

Quando o tratamento farmacológico não responde adequadamente, recorre-se a ceratoplastia, debridamento e transplante corneal. Contudo, é importante a erradicação da doença antes do transplante, pois há casos da recorrência da mesma, provavelmente devido à persistência dos cistos de ameba no estroma corneal (FICKER *et al.*, 1993).

4. PARTE EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.1 Materiais

4.1.1 Material vegetal

As partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum* foram coletadas no município de Guaíba nos meses de novembro e dezembro de 2006 e 2007 com o auxílio do botânico Prof. Dr. Nelson Matzembacker (Programa de Pós-graduação em Botânica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul). O material testemunho está depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN): *P. polystachyum* D.C. (136584).

O material vegetal foi selecionado, parte deste foi acondicionada em ambiente seco e arejado e ao abrigo da luz direta, e parte foi triturada em moinho de facas.

4.1.2 Materiais laboratoriais

Neste trabalho foram utilizados solventes e reagentes de procedência Merck®, Reagen®, Grupo Química®, Biogen®, Sinth® entre outros.

As soluções testes foram filtradas em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm e 25 mm de diâmetro da marca Sartorius em equipamento apropriado.

Na avaliação da atividade amebicida foram utilizadas microplacas de 96 well Cellstar®.

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) preparativas utilizaram-se placas de vidro (20 x 20 cm), preparadas no laboratório com o auxílio de conjunto Desaga®, tendo como adsorvente gel de sílica GF₂₅₄ Merck®.

As cromatografias em camada delgada analíticas foram realizadas em cromatofolhas de alumínio em gel de sílica 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm) Merck®.

4.2 Preparação do extrato metanólico bruto, frações e exudato

4.2.1 Extrato metanólico bruto

O extrato bruto de *P. polystachyum* foi obtido por maceração estática da planta rasurada com três renovações do líquido extrator (metanol) a cada 24 horas. A relação droga/solvente foi de 1:10. Evaporou-se o extrato até *secura* sob pressão reduzida em evaporador rotatório.

4.2.2 Frações hexano, diclorometano e metanol

As frações de *P. polystachyum* foram obtidas por maceração estática da planta rasurada com três renovações do líquido extrator a cada 24 horas. Os solventes em polaridade crescente utilizados para a extração foram hexano, diclorometano e metanol para a obtenção das respectivas frações. A relação droga/solvente foi de 1:10. Evaporaram-se as frações até *secura*, sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Parte do conteúdo da fração hexano foi solubilizado em acetona e filtrado para retirada das ceras epiculares e outros compostos insolúveis.

4.2.3 Exudato

O exudato de *P. polystachyum* foi obtido imergindo-se a planta intacta em hexano (2 x 1 min) seguido de evaporação do solvente, sob pressão reduzida em

evaporador rotatório. Parte do conteúdo do exudato foi solubilizado em acetona e filtrado para eliminação de ceras epiculares e outros compostos insolúveis.

A figura 2 esquematiza a obtenção do extrato metanólico bruto, das frações e do exudato de *P. polystachyum*.

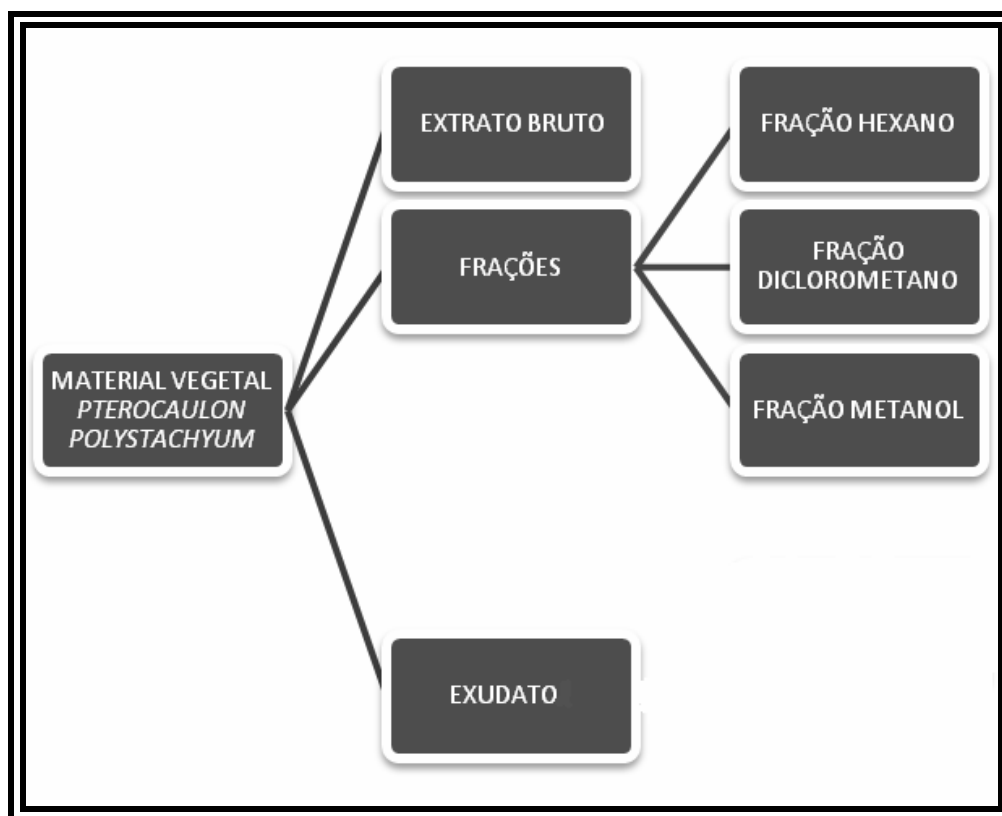


Figura 4: Obtenção do extrato metanólico bruto, frações e exudato de *P. polystachyum*.

4.3 Análise cromatográfica, isolamento e identificação dos compostos

4.3.1 Análise cromatográfica

Os perfis cromatográficos do exudato e das frações hexano e diclorometano foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica, utilizando-se como eluente diclorometano:metanol (99:1 v/v) ou diclorometano:hexano (11:3 v/v). O extrato metanólico bruto e a fração metanol foram analisados utilizando-se como eluente

acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10). Os cromatogramas foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) (254 e 365 nm) e após nebulização com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

4.3.2 Isolamento das cumarinas

No intuito de facilitar o isolamento de compostos e baseando-se no fato de que algumas cumarinas são insolúveis em metanol, ao exudato foi adicionado este solvente, resultando em uma fração com substâncias solúveis e um precipitado insolúvel formado por quatro compostos, quando analisados por cromatografia em camada delgada analítica. Este precipitado foi, então, submetido a sucessivas cromatografias em camada delgada preparativas, utilizando-se como sistema eluente diclorometano:hexano (11:3 v/v), resultando em dois produtos codificados como CR1 e CR2.

4.3.3 Elucidação estrutural

As estruturas dos produtos CR1 e CR2 foram determinadas através de métodos espectroscópicos (ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13).

4.4 Quantificação de cumarinas

4.4.1. Espectrofotometria na região ultravioleta

O teor de cumarinas nas diferentes amostras foi determinado através de método com detecção no ultravioleta, baseado na A_{320} desses compostos, pressupondo que todas as substâncias que absorvem no ultravioleta nesse comprimento de onda pertencem a esta classe química. O método utilizado foi proposto e validado por VIANNA e colaboradores (Dados não publicados).

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Diode Array spectrophotometer HP:8452A), utilizando cubetas de vidro de 1 cm e em comprimento de onda de 327 nm.

4.4.2 Preparação da substância de referência

A solução de referência com concentração final de 2 mg/mL foi obtida a partir da pesagem de 200 mg de esculina, que posteriormente foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL com solução de metanol e acetona (1:1). A solução foi submetida a banho de ultra-som por 2 minutos para completa dissolução da amostra e o volume completado com o mesmo solvente.

4.4.2.1 Obtenção da curva padrão da substância de referência

Foram retiradas alíquotas, conforme descrito na tabela 2, da solução de referência, estas transferidas para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com solução de metanol e acetona (1:1). Estas diluições foram utilizadas na obtenção da curva padrão de esculina.

Tabela 2: Preparação das diluições da solução padrão (esculina).

Volume da solução de esculina com concentração de 2 mg/mL (mL)	Concentração final (mg/mL)
0,25	0,005
0,50	0,010
0,75	0,015
1,00	0,020
1,25	0,025

As médias das absorbâncias das diluições da solução padrão (esculina) foram utilizadas para determinação da curva padrão através da construção do gráfico absorbância *versus* concentração.

O estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, foi empregado para determinação da equação da reta e o coeficiente de regressão linear (r^2) também foi calculado.

4.4.3 Preparação das amostras a serem quantificadas

A fração hexano e o exudato foram pesados em balança analítica (10 mg), solubilizados com solvente metanol: acetona (1:1), completados os volumes em balão volumétrico de 25 mL com a mesma solução, e submetidos a banho de ultra-som por 2 minutos. A concentração final obtida foi de 0,4 mg/mL.

A partir da solução com concentração de 0,4 mg/mL foram preparadas diluições, em balão volumétrico de 10 mL. As alíquotas retiradas desta solução estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Preparação das diluições das amostras

Volume da solução de <i>Pterocaulon</i> com	
concentração de 0,4 mg/mL	Concentração final
(mL)	(mg/mL)
0,250	0,010
0,375	0,015
0,500	0,020
0,625	0,025

4.5 Culturas axênicas de *Acanthamoeba castellanii*

A atividade amebicida dos extratos e frações foi avaliada frente a cepa de *Acanthamoeba castellanii* (50492) proveniente da American Type Culture Collection, que foi gentilmente cedida pelo Dr. Naveed Khan, School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London. Esta cepa pertence ao grupo T4, relacionado à patologia corneana.

As culturas axênicas de *Acanthamoeba castellanii* foram mantidas em meio líquido PYG (proteose peptona, extrato de levedo e glicose) contendo os antibióticos penicilina e estreptomicina na concentração de 40 µL/mL e mantidas em estufa a temperatura constante de 30 °C. Subcultivos foram realizados a cada sete dias para a manutenção do número e da qualidade celular das mesmas.

4.6 Avaliação da atividade amebicida frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*

4.6.1 Preparação das soluções testes

O extrato bruto, as frações hexano, diclorometano e metanol e o exudato de *P. polystachyum* foram investigados quanto à atividade amebicida. Para tal, foram preparadas suspensões com 1% de Tween 20 e água até obtenção das concentrações teste. Posteriormente, estas soluções foram filtradas em membranas de acetato de celulose estéreis com poros de 0,22 µm, acondicionadas em microtubos estéreis e mantidas a -18°C.

4.6.2 Cultura experimental padrão de *A. castellanii*

Na avaliação da atividade amebicida das diferentes amostras obtidas a partir de *P. polystachyum* foram utilizadas culturas experimentais padrão de *A. castellanii*.

Estas culturas foram preparadas sob as mesmas condições nos dias de cada teste. Para tal, 1 mL da cultura axênica de *A. castellanii* em meio PYG foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado de amebas lavado duas vezes com tampão PBS para retirada de possíveis resíduos indesejáveis. O precipitado de amebas foi, então, ressuspenso em meio PYG resultando na concentração de 8×10^3 trofozoítos/mL.

4.6.3 Avaliação da atividade amebicida

Para a avaliação da atividade amebicida, inoculou-se, em cada orifício de uma placa de 96 poços, 100 µL da cultura experimental padrão e 100 µL da solução a ser testada. As placas foram, então, seladas e incubadas a 30 °C, observadas em microscópio invertido para acompanhamento e os trofozoítos contados em câmara de Fuchs-Rosenthal em 48 e 72 horas, conforme esquematizado na figura 3.

Em todos os experimentos o controle positivo utilizado foi anfotericina B com concentração final de 0,0625 mg/mL, e os controles negativos foram água estéril e água estéril contendo 1% de Tween 20. Os testes foram realizados em triplicata e em três dias diferentes.

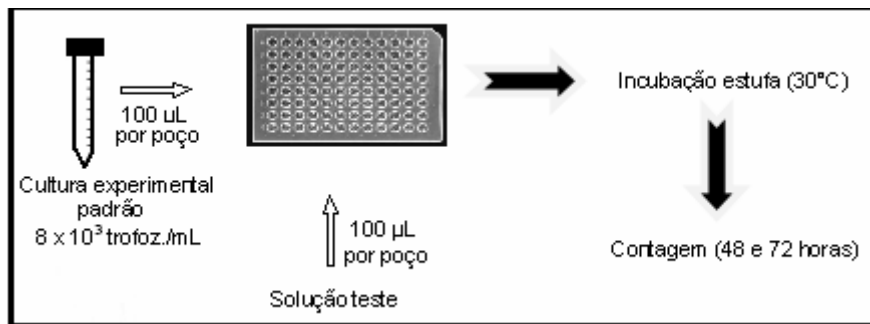


Figura 5: Esquema do teste para avaliação da atividade amebicida.

4.6.3.1 Extrato bruto, exudato e frações

Na avaliação da atividade amebicida do extrato metanólico bruto, exudato e frações hexano, diclorometano e metanol, em cada orifício da placa foram inoculados 100 µL da cultura experimental padrão e 100 µL das soluções teste com concentração final de 5 mg/mL.

4.6.3.2 Fração hexano em diferentes concentrações

Para a avaliação da atividade amebicida em diferentes concentrações da fração hexano, inoculou-se em cada orifício da placa 100 µL da cultura experimental padrão e 100 µL das soluções teste desta fração nas concentrações finais de 7,5; 6,25; 5; 3,75 e 2,5 mg/mL.

4.7 Avaliação da atividade amebicida frente aos cistos de *Acanthamoeba castellanii*

Para obtenção de cistos, culturas axênicas de *A. castellanii* em meio PPYG foram cultivadas em placas de Petri contendo Agar manitol 0,5 M recoberto com *Escherichia coli* inativadas a 56°C/2h. As placas foram seladas e incubadas a 30 °C por 7 dias. Após este período, os cistos foram cuidadosamente retirados do agar com auxílio de solução PBS e alça de platina e ressuspensos nesta solução até obtenção da concentração experimental de 8×10^3 cistos/mL.

Inoculou-se, em cada orifício da placa de 96 poços, 100 µL desta suspensão de cistos e 100 µL das soluções teste obtidas de *P. polystachyum*.

As placas foram incubadas a 30 °C por três dias e observadas em microscópio invertido. No terceiro dia, o conteúdo dos poços foi cultivado em placas de Petri contendo ágar não nutritivo recoberto com *Escherichia coli* inativadas a 56°C/2h. As placas foram incubadas a 30 °C e observadas durante 10 dias para determinação da inibição do excistamento.

O controle positivo utilizado foi anfotericina B com concentração final de 0,0625 mg/mL, e os controles negativos foram água estéril com e sem 1% de Tween 20. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7.1 Fração hexano em diferentes concentrações

Na avaliação da atividade de diferentes concentrações da fração hexano frente aos cistos, inoculou-se em cada orifício da placa 100 µL da suspensão de cistos e 100 µL das soluções testes nas concentrações finais de 7,5; 6,25; 5; 3,75 e 2,5 mg/mL.

4.7.2 Exudato

Na avaliação da atividade dos exudato frente aos cistos, inoculou-se, em cada orifício da placa, 100 µL da suspensão de cistos e 100 µL das soluções testes com concentração de 5 mg/mL.

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade amebicida de *P. polystachyum* foram analisados com o auxílio do Núcleo de Assessoria Estatística (NAE) do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) comparando extratos, frações e exudatos dentro de cada tempo e tempos dentro de cada extrato. O software utilizado foi o Sisvar (FERREIRA, 2000).

4.9 Plano de gerenciamento de resíduos

“O Plano de Gerenciamento de Resíduos (PGR) da Faculdade de Farmácia é um conjunto de procedimentos de planejamento e gestão que tem o intuito de minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados um encaminhamento seguro e de forma eficiente”

Os resíduos líquidos (solventes) – GRUPO A – foram descartados conforme as normas contidas no Plano de Gerenciamento de Resíduos da faculdade de Farmácia

através da Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT), da mesma forma, os resíduos biológicos previamente inativados em autoclave.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise cromatográfica, isolamento e identificação dos compostos

5.1.1 Análise cromatográfica

Pela análise do extrato metanólico bruto e das frações de *P. polystachyum* através de cromatografia em camada delgada analítica, verificou-se a presença de ampla gama de substâncias, predominantemente compostos com perfil cromatográfico de cumarinas que se apresentam como manchas características, intensamente fluorescentes e facilmente visualizadas sob luz de ultravioleta (UV) (HARBORNE, 1996). Os dados obtidos estão de acordo com relatos da literatura que indicam as cumarinas como os compostos abundantes na espécie em estudo (DEBENEDETTI *et al.*, 1991; DEBENEDETTI *et al.*, 1992; DEBENEDETTI *et al.*, 1994^B; DEBENEDETTI *et al.*, 1998).

A análise cromatográfica do exudato mostrou que este também era constituído de cumarinas. Esse fato indica que a planta acumula as substâncias na superfície, provavelmente nos pêlos secretores, e reforça a hipótese de que certas cumarinas são biossintetizadas pelos vegetais como fitoalexinas, com o objetivo de proteger a planta de agressores externos, especialmente fungos (CARDOSO, 2003). De fato, há trabalho mostrando que cumarinas do mesmo grupo daquelas encontradas em *Pterocaulon* são fitoalexinas (TAL e ROBESON, 1986).

A comparação dos perfis cromatográficos de extratos obtidos da planta rasurada e do exudato mostra que existe diferença entre ambos. O exudato apresentou menor número de substâncias e uma melhor resolução na separação dos componentes. O extrato da planta rasurada apresentava os mesmos componentes do exudato e diversas outras cumarinas, sugerindo, desta forma, que este vegetal acumula estas substâncias também em tecidos internos e que provavelmente teriam outras funções no vegetal.

5.1.2 Isolamento das cumarinas

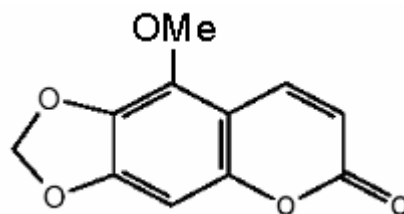
O exudato foi escolhido para o isolamento das cumarinas por apresentar menor número de substâncias, o que facilitaria o isolamento dos compostos majoritários. Visando uma pré-purificação da amostra e considerando a insolubilidade de algumas cumarinas em metanol, o exudato foi ressuspenso nesse solvente, resultando em uma fração solúvel e um precipitado insolúvel. Este último apresentou, na cromatografia em camada delgada analítica, duas manchas distintas e quando submetido a sucessivas cromatografias em camada delgada preparativas forneceu dois produtos codificados como CR1 e CR2 que foram submetidos a análise espectroscópica. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no anexo 1.

5.1.3 Elucidação estrutural dos produtos CR1 e CR2

Através da análise dos espectros de RMN, verificou-se que os compostos CR1 e CR2 eram formados por duas cumarinas cada de Rfs muito próximos, o que dificultou o isolamento destas. O composto CR1 caracterizava-se como uma mistura de duas substâncias atribuindo-se os sinais para CR1a e CR1b. O mesmo ocorreu com o composto CR2, que se tratava de mistura de CR2a e de CR2b.

5.1.3.1 Composto CR1a

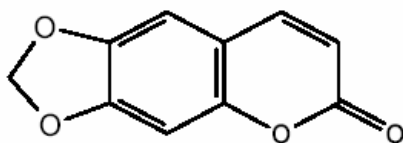
O espectro de RMN de ^1H do composto CR1a revela a presença de uma metoxila ligada ao carbono 5 deste composto. Os sinais em δ 6,20; 6,52 e 7,94 ppm (1H, s) correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos 3; 8 e 4, respectivamente, e o sinal em δ 6,00 ppm (2H) é atribuído aos hidrogênios do grupo metileno-dioxi. A análise dos sinais permite caracterizar este produto como sendo 5-metoxi-6,7-metileno-dioxicumarina (I). O isolamento desta cumarina a partir das partes aéreas de *P. polystachyum* foi descrito por PALACIOS e colaboradores em 1999.



(I)

5.1.3.2 Composto CR1b

Os sinais referentes ao composto CR1b são similares aqueles obtidos para o composto CR1a, diferindo apenas no singlete em δ 6,82 ppm (1H) referente ao hidrogênio ligado ao carbono 5. No o composto CR1a há uma metoxila ligada a este carbono. Os sinais em δ 6,27; 6,83 e 7,58 (1H, s) correspondem aos hidrogênios ligados aos carbono 3; 8 e 4, respectivamente, e o sinal em δ 6,07 ppm (2H) foi atribuído aos hidrogênios do grupamento metilenodioxí. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C deste composto (Tabelas 4 e 5) estão em concordância com os dados previamente relatados e sugerem a estrutura da cumarina denominada aiapina (II). Essa substância foi relatada para *P. virgatum* (DEBENEDETTI *et al.*, 1998), *P. serrulatum* (MACLEOD e RASSMUSSEN *et al.*, 1999), *P. polystachyum* (PALACIOS *et al.* 1999; STEIN *et al.*, 2007) e *P. redolens* (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003).



(II)

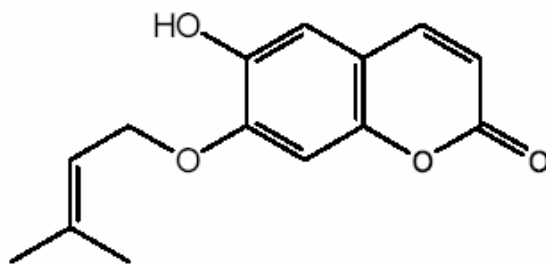
5.1.3.3 Composto CR2a

O espectro de RMN de ^1H do composto CR2a apresentou um par de dubletos ($J= 9,4$ Hz) para H-3 (δ 6,20 ppm) e H-4 (δ 7,83 ppm), e dois hidrogênios aromáticos em δ 7,07 ppm (H-5) e 6,89 ppm (H-8), característicos de cumarinas 6,7-dissubstituídas.

Dois singletos em δ 1,76 e 1,78 ppm correspondem aos grupamentos metila unidos à cadeia lateral isopentenil. O dubleto em δ 4,62 ppm ($J= 6,7$ Hz) dos hidrogênios metilênicos indica que houve substituição em 3,3-dimetilaliloxi, e singlete em δ 5,50 ppm indica a presença de grupamento hidroxila (OH).

O espectro de RMN de ^{13}C permitiu observar a presença de 14 sinais, referentes aos carbonos da molécula de CR2a. Em δ 67,20 ppm o sinal intenso refere-se ao grupamento CH_2 da cadeia lateral prenilada. Os demais sinais em δ 163,82, δ 139,97, δ 150,15, δ 148,36, δ 112,98 e δ 139,76 ppm pertencem aos carbonos quaternários da molécula. Os sinais em δ 112,89 e δ 145,87 ppm correspondem aos carbonos C-3 e C-4 respectivamente, característicos de cumarinas. As metilas em δ 25,84 e δ 18,28 ppm são referentes à cadeia lateral.

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabelas 4 e 5) sugerem para o composto a estrutura da cumarina prenilletina (III). Para a espécie *P. polystachyum* o primeiro relato é descrito por PALACIOS e colaboradores (1999).



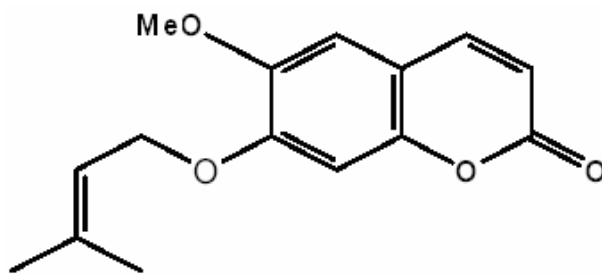
(III)

5.1.3.4 Composto CR2b

Os dados de RMN de ^1H referentes ao composto CR2b são semelhantes àqueles obtidos para o composto CR2a. A diferença significativa corresponde ao singlete em δ 3,82 ppm atribuído ao grupamento metoxila na posição C-6. Os sinais de RMN de ^{13}C para os compostos CR2a e CR2b foram atribuídos através dos espectros de ATP

(Tabela 4 e 5). Os valores encontrados para os espectros propõem a estrutura IV para o composto que é denominada preniletina-metil-éter e são idênticos aos publicados anteriormente para este composto (CARDONA *et al.*, 1992; STEIN *et al.*, 2007).

O primeiro relato desta cumarina para *P. polystachyum* foi em 1999 por PALACIOS e colaboradores.



(IV)

Tabela 4 : RMN de ^1H dos compostos CR1a (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina), CR1b (alapina), CR2a (preniletina) e CR2b (preniletina-metil-eter) isolados de *P. polystachyum* (400 MHz; CDCl_3)

	CR1a	CR1b	CR2a	CR2b
H-3	6,20 (d, J=9,7)	6,27 (d, J= 9,5)	6,20 (d, J=9,4)	6,22 (d, J=9,4)
H-4	7,94 (d, J=9,7)	7,58 (d, J= 9,5)	7,83 (d, J=9,4)	7,77 (d, J=9,4)
H-5	-	6,82 (s)	7,07 (s)	6,93 (s)
H-8	6,52 (s)	6,83 (s)	6,89 (s)	6,88 (s)
5-OMe	4,13 (s)	-	-	-
6-7-OCH ₂ O-	6,00 (s)	6,07 (s)	-	-
6-OH	-	-	5,50 (t)	-
6-OMe	-	-	-	3,82 (s)
H-1'a	-	-	4,62 (d, J=6,7)	4,67 (d, J=6,4)
H-1'b	-	-	4,62 (d, J=6,7)	4,67 (d, J=6,4)
H-2'	-	-	5,46 (t)	5,51 (t)
H-4'	-	-	1,76 (s)*	1,78 (s)*
H-5'	-	-	1,78 (s)*	1,78 (s)*

* Sinais intercambiáveis

Tabela 5: RMN de ^{13}C dos compostos CR1a (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina), CR1b (aiapina), CR2a (preniletina) e CR2b (preniletina-metil eter) isolados de *P. polystachyum* (100 MHz; CDCl_3)

	CR1a	CR1b	CR2a	CR2b
C-2	161,27	161,13	163,82	164,00
C-3	111,72	113,36	112,89	113,40
C-4	138,76	143,40	145,87	145,80
C-5	138,04	105,05	110,05	108,15
C-6	131,74	144,89	139,97	145,50
C-7	152,65	151,25	150,15	152,47
C-8	92,36	98,35	102,11	101,75
C-9	151,51	151,25	148,36	148,36
C-10	106,60	112,67	112,98	112,98
5-O <u>C</u> H ₃	59,91	-	-	-
6-7- O <u>C</u> H ₂ O-	101,80	102,32	-	-
6-O <u>C</u> H ₃	-	-	-	56,83
C-1'	-	-	67,20	67,20
C-2'	-	-	120,11	120,27
C-3'	-	-	139,76	139,76
C-4'	-	-	25,84	25,84
C-5'	-	-	18,28	18,28

5.2 Quantificação de cumarinas

5.2.1. Obtenção da curva padrão da substância de referência

Os dados referentes à curva padrão da substância de referência (esculina) encontram-se na figura 4. O coeficiente de linearidade da curva de calibração foi de 0,999 indicando que o método é linear quando aplicado à substância pura (BRITAIN, 1998).

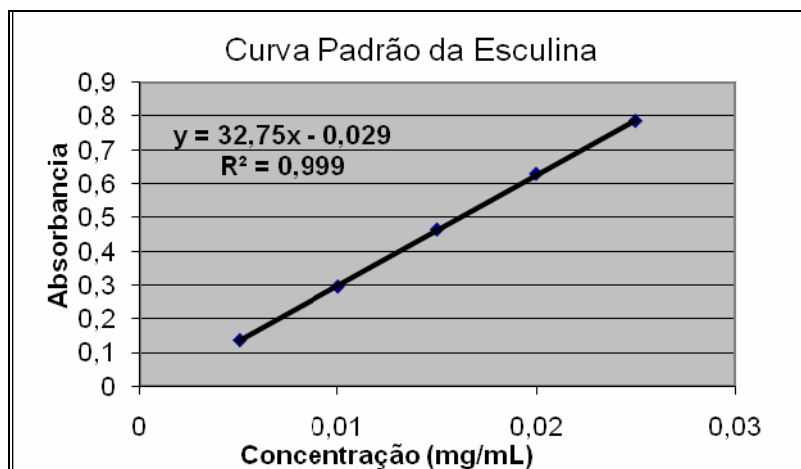


Figura 6: Curva padrão da substância de referência (esculina), em 327 nm, onde foi obtido $y = 32,75x - 0,029$, $R^2=0,999$

5.2.2 Determinação quantitativa de cumarinas na fração hexano e no exudato

A espectrofotometria por ultravioleta mostrou-se útil para a aplicação em extratos vegetais, sendo o método utilizado neste estudo específico para cumarinas 6,7 oxigenadas e validado recentemente por VIANNA e colaboradores (Dados não publicados).

A determinação quantitativa da fração hexano indicou a presença de 688 mg de cumarina por grama de extrato. Se tratando de uma fração apolar, as ceras epicuticulares podem estar presentes e, como não eram de interesse no presente estudo, foram eliminadas por precipitação com acetona, obtendo-se com isso o aumento para 803 mg de cumarina por grama de extrato. O mesmo procedimento foi realizado com o exudato, resultando em 544 mg de cumarina por grama de exudato com cera e 703 mg de cumarina por grama de exudato sem cera. Esses dados reforçam a análise cromatográfica descrita anteriormente, mostrando que a fração hexano possui maior diversidade e quantidade de cumarinas do que o exudato.

5.3 Atividade amebicida frente aos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*

O percentual de mortalidade de cada composto testado foi obtido comparando-se o número de células encontradas no teste ao número de células encontradas no controle negativo em tempo determinado (48 ou 72 horas).

5.3.1 Extrato bruto e frações hexano, diclorometano e metanol

A atividade amebicida do extrato bruto e das frações na concentração testada de 5 mg/mL frente aos trofozoítos de *A. castellanii* (figura 5) diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

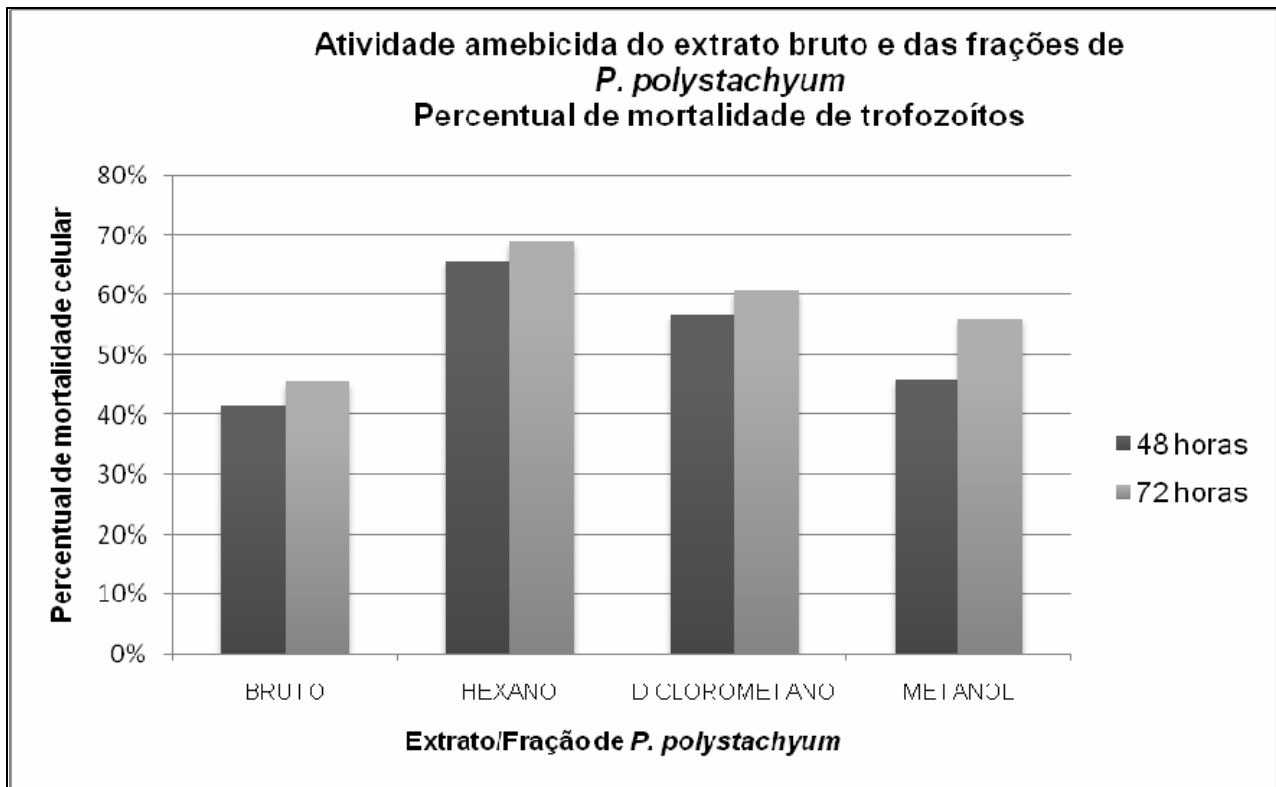


Figura 7: Atividade do extrato bruto e das frações de *P. polystachyum*.

O percentual de mortalidade de trofozoítos de *A. castellanii* tratados com o extrato metanólico bruto foi de 41,4% e 45,7% em 48 horas e 72 horas, respectivamente. Esta foi a menor atividade amebicida determinada entre as soluções

testadas. Isto pode ser explicado pelo fato deste extrato ser composto por diversas substâncias, sendo que os compostos ativos podem estar diluídos devido à presença dos demais.

Visando confirmar as substâncias ativas, a planta foi submetida à extração com solventes em polaridade crescente e as frações obtidas testadas frente os trofozoítos. A fração metanol, a mais polar, apresentou 45,8% de mortalidade dos trofozoítos em 48 horas e de 56,1% em 72 horas. Contudo, a atividade mais pronunciada foi observada nas frações hexano e diclorometano, onde aproximadamente 70% e 61% dos trofozoítos foram eliminados em 72 horas, respectivamente.

5.3.2 Exudato

O exudato apresentou atividade amebicida semelhante à atividade encontrada na fração hexano na mesma concentração (5 mg/mL), sendo verificada mortalidade de 63,6% e 74% dos trofozoítos em 48 e 72 horas, respectivamente.

A atividade amebicida, assim como a atividade antifúngica (STEIN *et al.*, 2005) comprovadas nas espécies de *Pterocaulon*, foram determinadas nas frações hexano e diclorometano, sugerindo que estas atividades podem estar relacionadas às cumarinas, constituintes característicos das partes aéreas destas plantas, as quais estão presentes no extrato lipofílico e constituem um grupo de produtos naturais com atividade antimicrobiana reconhecida (VERA *et al.*, 2001). A presença destas pode justificar o uso popular de algumas espécies de *Pterocaulon* como agente no tratamento de algumas doenças infecciosas (AVANCINI, 2002).

As cumarinas possuem um espectro amplo de atividade biológica, sendo que dentre os estudos mais promissores, estão aqueles relacionados com a atividade antiprotozoária. Da planta *Kielmeyera albopunctata* foi isolada a cumarina 4-(1-metilpropil)-5,7-didroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil) cromen-2-ona que apresentou alta taxa de mortalidade *in vitro* contra as formas tripomastigotas de

Trypanosoma cruzi, após 24h de contato dessa substância com sangue infectado (SCIO *et al.*, 2003).

As cumarinas 5-metilcumarina, 2'-epicicloisobraquicumarinona epóxido e cicloisobraquicumarinona epóxido isoladas de *Vernonia brachycalyx* apresentaram atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania major* e frente a esquizontes de *Plasmodium falciparum* (OKETCH-RABAH *et al.*, 1997). A atividade antimalárica também foi demonstrada para a cumarina 5,7-dimetoxi-8-(3'-hidroxi-3'metil-1'-buteno), encontrada no extrato metanólico das raízes da planta *Toddalia asiatica* (OKETCH-RABAH *et al.*, 2000).

5.3.3 Fração hexano em diferentes concentrações

A atividade amebicida das diferentes concentrações da fração hexano frente aos trofozoítos de *A. castellanii* está representada na figura 6.

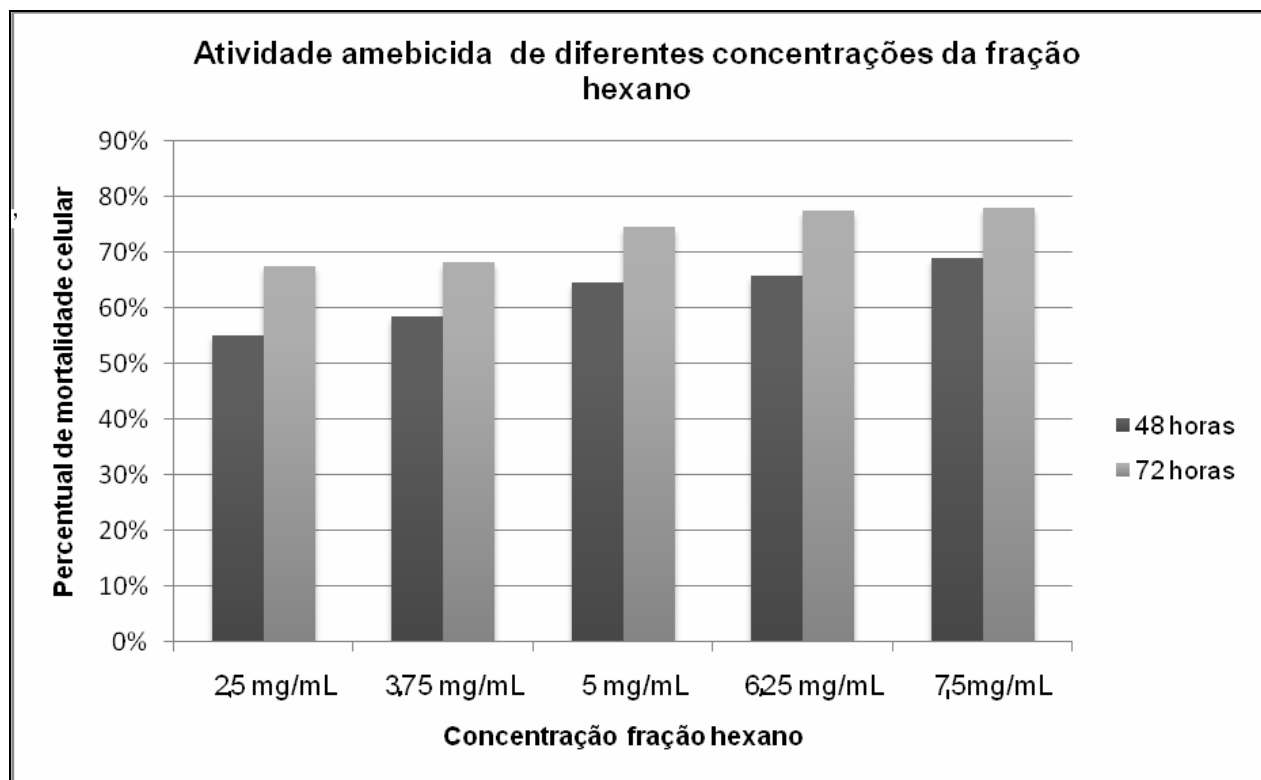


Figura 8: Atividade amebicida de diferentes concentrações da fração hexano de *P. polystachyum*.

A atividade amebicida da fração hexano é dose dependente uma vez que quanto maior a concentração da solução testada sobre o protozoário, maior o percentual de mortalidade de trofozoítos. A significância dos dados foi comprovada estatisticamente tanto pelo teste de Tukey, quanto pela obtenção do gráfico de regressão linear obtido a partir do gradiente de concentração testado desta fração (figura 7). A maior taxa de mortalidade foi observada na concentração de 7,5 mg/mL onde 68% (48 horas) e 77,86% (72 horas) dos trofozoítos foram eliminados.

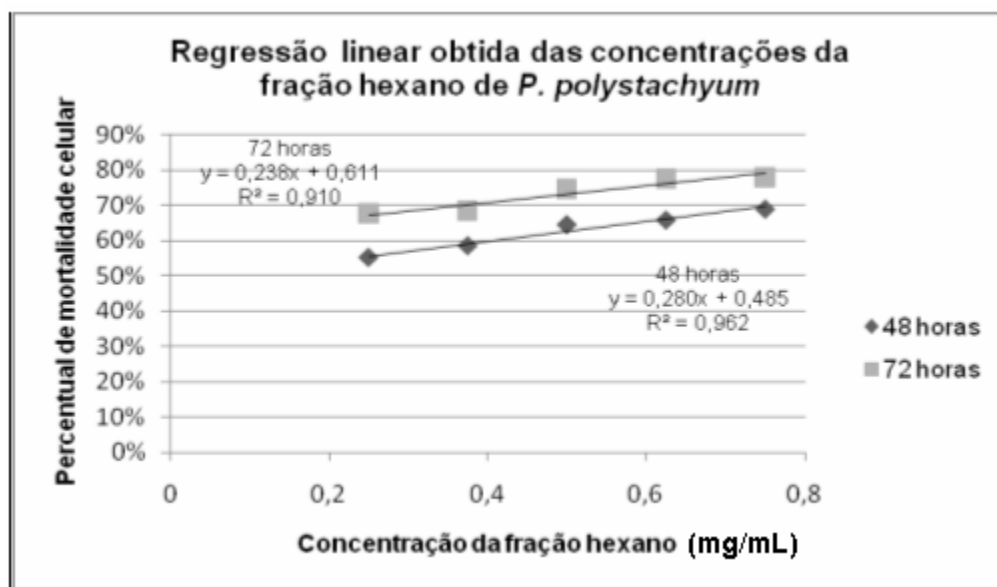


Figura 9: Gráfico da regressão linear obtida das concentrações da fração hexano de *P. polystachyum* frente ao percentual de mortalidade dos trofozoítos em 48 e 72 horas.

Os resultados obtidos neste estudo estão descritos em artigo aceito para publicação no periódico *Parasitology Research* e intitulado: “In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*” (anexo 2).

5.4 Avaliação da atividade amebicida frente aos cistos de *Acanthamoeba castellanii*

Os cistos de *Acanthamoeba* possuem alta resistência aos fármacos antimicrobianos e antiparasitários, bem como aos fatores ambientais, podendo manter a sua viabilidade e virulência durante longo tempo, devido à presença de um revestimento externo formado por celulose (KILVINGTON *et al.*, 1990; MAZUR *et al.*, 1995; AKSOZEK *et al.*, 2002; KHAN, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004b).

A atividade amebicida frente aos cistos de *A. castellanii* foi testada a partir dos extratos mais ativos obtidos nos testes com os trofozoítos.

Tanto a fração hexano, quanto o exudato de *P. polystachyum* não se mostraram ativos sobre a forma cística de *A. castellanii*. Os cistos tratados apresentaram alteração visual ao serem observados no microscópio invertido, mas quando subcultivados nas placas de Petri com ágar não nutriente recobertas com *E. coli* inativadas a 56°C/2h ocorreu o desencistamento e posterior proliferação dos trofozoítos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação de plantas utilizadas na medicina popular é uma estratégia para encontrar novos fármacos. Muitas das propaladas atividades de plantas medicinais têm sido comprovadas em estudos científicos (BRANTNER e GREIN, 1994; DI STASI, 1995; RIVERO *et al.*, 2004; RODRÍGUEZ-ZARAGOZA *et al.*, 1999).

Com relação à atividade antiprotozoária, alguns exemplos podem ser citados. Constituintes naturais obtidos a partir de plantas foram estudados quanto à atividade amebicida frente ao parasito intestinal *Entamoeba histolytica*, e muitos destes compostos foram mais efetivos contra o parasito do que os fármacos correntemente utilizados (DI STASI, 1995; RODRÍGUEZ-ZARAGOZA *et al.*, 1999).

As plantas *Solidago virgaurea*, *Solidago graminifolia*, *Rubus chamaemorus*, *Pueraria lobata*, de uso na medicina popular, foram testadas *in vitro* para a atividade amebicida ou amebostática frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. Os resultados mostraram que os extratos metanólicos obtidos das plantas foram ativos em concentrações inferiores a 0,1 mg/mL (DERDA *et al.*, 2004).

Da mesma forma, ARRIETA e colaboradores (2001), mostraram que o extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Zanthoxylum liebmannianum* exibiu efeito inibitório na reprodução dos trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (IC₅₀ = 3,48 µg/mL) e de *Giardia lamblia* (IC₅₀ = 58,00 µg/mL). Deste extrato, asarinina, hiperina, beta-sitosterol, e beta-sitosterol glicosídeo foram isolados. Entre eles, a cumarina asarinina foi a mais ativa com IC₅₀ no valor de 19,86 µg/mL para *E. histolytica* e de 35,45 µg/mL para *G. lamblia*. Os compostos remanescentes demonstraram atividade moderada contra ambos os parasitos.

CALZADA e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antiprotozoária do extrato diclorometano-metanol, de frações e de compostos isolados de folhas de *Geranium mexicanum* em *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. O resultado indicou que o extrato, a fração orgânica e um flavonóide foram ativos contra ambos os protozoários com valores de IC₅₀ entre 1,9 a 79,2 µg/mL para *E. histolytica* e entre 1,6 a

100,4 µg/mL no caso da *G. lamblia*. O composto mais ativo foi o flavan-3-ol, (-)-epicatequina.

Estudos *in vitro* sobre a susceptibilidade das amebas de vida livre frente a compostos são realizados para distinguir o efeito destes em amebostático ou amebicida. Foi relatado que alguns agentes usados podem induzir o encistamento que, posteriormente, por excistamento, pode levar ao desenvolvimento das amebas (KILVINGTON *et al.*, 1990; AKSOZEK *et al.*, 2002; KHAN, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004b).

A fração hexano de *P. polystachyum* resultou em vacuolização, arredondamento e completa lise das células, da mesma forma como relatou WALOCHNIK e colaboradores em trabalho publicado em 2002. Dessa forma, esta fração apresenta atividade amebicida efetiva frente aos trofozoítos de *A. castellanii*, lisando-os diretamente e impedindo seu encistamento. Este resultado é bastante relevante, pois a formação de cistos dificulta o tratamento da infecção devido a sua resistência. Além disso, os cistos podem se transformar novamente na forma ativa celular após suspensão da terapêutica (MATOBA *et al.*, 1989; OSATO *et al.*, 1991).

O tratamento efetivo satisfatório da ceratite amebiana é inexistente. Uma variedade de fármacos tem sido usada clinicamente, mas nenhum agente tem mostrado ser efetivo contra todos os isolados de *Acanthamoeba* (CHU *et al.*, 1998; CHOMICZ *et al.*, 2005). O tratamento com isotionato de propamidina e dibromopropamidina tem sido eficiente na cura de alguns pacientes. Contudo, também há relatos de progressão da doença em doentes submetidos ao tratamento com estes compostos (AURAN *et al.*, 1987; BINDER, 1989).

Os três principais grupos de antifúngicos de uso clínico são os antibióticos polienos, os derivados azólicos e as alilaminas/tiocarbamatos. O mecanismo de ação destes agentes é baseado na interação ou inibição de ergosterol, principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos (ODDS *et al.*, 2003).

A presença do ergosterol na membrana dos fungos torna estes organismos sensíveis aos fármacos antifúngicos. Derivados poliênicos, como a anfotericina B, e derivados imidazólicos como o fluconazol, são fármacos usados como antiprotozoários por afetarem a membrana celular, uma vez que o ergosterol e o 7-deidrostigmasterol foram também detectados na membrana plasmática de *Acanthamoeba* (MEHDI *et al.*, 1988; SMITH e KORN, 1968), assim como o cicloartenol, um precursor do ergosterol (RAEDERSTORFF e ROHMER, 1985). Assim, a presença do ergosterol na membrana explicaria a sensibilidade de *Acanthamoeba* para este grupo de fármacos (SHUSTER *et al.*, 2006). Estas substâncias combinam-se com os esteróis da membrana, rompendo a mesma ou tornando-a incapaz de efetuar suas funções normalmente, tais como transporte e permeabilidade. O fármaco forma um poro na membrana criando um canal iônico transmembrana (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004b).

STEIN *et al.* (2005) demonstraram a atividade antifúngica de extratos obtidos de espécies de *Pterocaulon*. Desta forma, a atividade relatada pelos autores pode ser relacionada à atividade amebicida demonstrada nesse estudo, corroborando o uso terapêutico de fármacos antifúngicos em amebíases.

Para obtenção de melhores resultados, poderia se recorrer aos recursos pertinentes aos adjuvantes de formulação, assim como ao desenvolvimento de nanopartículas a partir do extrato, permitindo maior poder de penetração na célula e com isso facilitando sua ação.

Cabe ressaltar que outras cepas de *Acanthamoeba* deverão ser avaliadas, uma vez que cada uma delas pode exibir um perfil comportamental diferenciado.

7. CONCLUSÕES

A análise do perfil cromatográfico de *P. polystachyum* permite concluir que o extrato metanólico bruto obtido da planta é composto por uma variedade de substâncias, ao contrário das frações hexano e diclorometano que são ricas em cumarinas.

A análise cromatográfica do exudato mostrou que este também era constituído de cumarinas. Esse fato indica que a planta acumula as substâncias na superfície, provavelmente nos pêlos secretores, e reforça a hipótese de que certas cumarinas são biossintetizadas pelo vegetal com a função de fitoalexina, protegendo a planta de fitopatógenos.

A comparação dos perfis cromatográficos de extratos obtidos da planta rasurada e do exudato mostra que existe diferença entre ambos. O método de extração dos produtos de superfície utilizando a planta íntegra mostrou ser eficaz para a obtenção dos produtos majoritários das partes aéreas, com interferência mínima de outros compostos indesejáveis, facilitando o isolamento das cumarinas. O extrato da planta rasurada apresentava os mesmos componentes do exudato e diversas outras cumarinas, sugerindo, desta forma, que este vegetal acumula estas substâncias também em tecidos internos.

O exudato forneceu quatro substâncias identificadas como sendo as cumarinas conhecidas como 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, aiapina, prenilina e prenilina-metil-éter.

A determinação quantitativa da fração hexano mostrou haver 688 mg de cumarina por grama de extrato e 803 mg de cumarina por grama de extrato sem ceras epicuticulares. O exudato apresentou 544 mg de cumarina por grama de amostra contendo ceras e 703 mg de cumarina por grama de exudato sem ceras epicuticulares.

O extrato metanólico bruto, as frações e o exudato de *P. polystachyum* apresentaram atividade amebicida. O percentual de mortalidade de trofozoítos de *A.*

castellanii tratados com o extrato metanólico bruto foi de 41,4% e 45,7% em 48 horas e 72 horas, respectivamente.

A fração metanol apresentou 45,8% de mortalidade dos trofozoítos em 48 horas e de 56,1% em 72 horas. Contudo, a atividade mais pronunciada foi observada nas frações hexano e diclorometano, onde aproximadamente 70% e 61% dos trofozoítos foram eliminados em 72 horas, respectivamente.

O exudato na concentração de 5 mg/mL apresentou mortalidade de 63,6% e de 74% dos trofozoítos em 48 e 72 horas respectivamente.

A atividade amebicida da fração hexano é dose dependente. A maior taxa de mortalidade foi observada na concentração de 7,5 mg/mL onde 68% (48 horas) e 77,86% (72 horas) dos trofozoítos foram eliminados.

A fração hexano e o exudato de *P. polystachyum* não foram ativos sobre a forma cística de *A. castellanii*.

8. REFERÊNCIAS

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, n. 3, 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.

ANDERBERG, A. A. Taxonomy and phylogeny of the tribe Plucheeae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 176, p. 75-123, 1991.

ANGELY, J. Flora Analítica do Paraná. *Universidade de São Paulo*. São Paulo, 1965.

ARRIETA, J.; REYES, B.; CALZADA, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; NAVARRETE, A. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianun*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 295-297, 2001.

AURAN, J. D.; STAR, M. B.; JAKOBIEC, F. A. *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. *Cornea*, v. 6, p. 2-26, 1987.

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

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARROSO, G. M. Flora da cidade do Rio de Janeiro – Compositae. *Rodriguesia*, v. 21-22, n. 33-34, p. 69-147, 1959.

BARROSO, G. M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, v. 3, Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.

BINDER, P. S. Cryotherapy for medically unresponsive *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, v. 8, p. 106-114, 1989.

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

BREMER, K. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland: Timber Press Inc., 1994.

BRITTAİN, H. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, p. 4-9, 1998.

CABRERA, A. L. Flora de la provincia de Buenos Aires. *Buenos Aires: I.N.T.A.*, v. 6, 1963.

CABRERA, A. L. *In*: BURKART, A. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). *Buenos Aires: I.N.T.A.*, v. 6, n. 6, p. 106-554, 1974.

CABRERA, A. L.; RAGONESE, A. M. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). *Darwiniana*, t. 21, n. 2-4, p. 185-257, 1978.

CABRERA, A. L.; FREIRE S. Flora Del Paraguay – Compositae. V. *Genebra*, n. 27, p. 58-84, 1998.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARDONA, L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R.; PÉREZ, J. 6-prenyloxy-7-methoxycoumarin, a coumarin-hemiterpene ether from *Carduus tenuiflorus*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 11, p. 3989-3991, 1992.

CARDOSO, J. A. F. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistencia ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (TELEOMORFO: *Guignardia citricarpa*). *Tese de Doutorado*, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2003.

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, n. 1, p. 25–31, 2005.

CHU, D.; MILES H.; TONEY, D.; NGYUEN, C.; MARCIANO-CABRAL, F. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research*, v. 84, p. 746-752, 1998.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 185-189, 2000.

COHEN, E. J.; PARLATO, C. J.; ARENTSEN, J. J.; GENVERT, G. I.; EAGLE, R. C.; WIELAND, M. R.; LAIBSON, P. R. Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba keratitis*. *American Journal of Ophthalmology*, v. 103, n. 5, p. 615-625, 1987.

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

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; KIMPE, N.; DUPON, J. F.; DECLERC, J. P. Purpureanol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 8, p. 2757-2758, 1991.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; GOMEZ, M. A.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; BOYKENS, M. Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 9, p. 3284-3285, 1992.

DEBENEDETTI, S. L.; PALACIOS P. S.; WILSON, E. G.; COUSSIO, J. D. Polyphenols of *Pterocaulon polystachyum*. *Fitoterapia*, v. 65, n. 2, p. 188-189, 1994^A.

DEBENEDETTI, S. L.; PALACIOS P. S.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D. 5-(3-methylenedioxy)coumarin, a 5,6,7-trioxygenated coumarin from *Pterocaulon virgatum*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 11, p. 1539-1542, 1994^B.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; KIMPE, N.; BOEYKENS, M. Two 6,7-dioxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v. 48, p. 707-710, 1998.

DERDA, M.; HADAŚ, E.; THIEM, B.; SUŁEK, A. Amebicidal plants extracts. *Wiad Parazytology*, v. 50, p. 715-721, 2004.

DI STASI, L. C. Amoebicidal compounds from medicinal plants. *Parasitologia*, v. 37, p. 29-39, 1995.

FATOPE, M. O.; IBRAHIM, H.; TAKEDA, Y. Screening of higher plants reputed as pesticides using the brine shrimp lethality assay. *International Journal of Pharmacognosy*, v. 31, p. 250-254, 1993.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In. 45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, UFSCar, São Carlos, p. 255-258, 2000.

FICKER L. A.; KIRKNESS, C.; WRIGHT, P. Prognosis for keratoplasty in *Acanthamoeba keratitis*. *Ophthalmology*, v. 100, p. 105-110, 1993.

FREIRE, S. Flora Fanerogamica Argentina. *Asteraceae, Inuleae: Pterocaulon*. Fasc. 14, p. 47-52, 1995.

FRITZ, D.; STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Distribuição de cumarinas nas tribos de Asteraceae. 12^o Edição do Farmapolis, 2003.

FURTADO, S. K. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no Estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo*. Tese de doutorado. Curso de pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GAST, R. J. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 48, p. 609–615, 2001.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1996.

HEEMANN, A. C. W.; MIGUEL, O. G.; DALLARMI, M. Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 585-588, 2006.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology*, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*, v. 10, Editora São Paulo: Nacional, 1991.

KHAN, N. A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis*, v. 34, p. 277-285, 2003.

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

KANLAYAVATTANAKUL, M.; RUANGRUNGSI, N.; WATANABE, T.; ISHIKAWA, T. Chemical constituents of *Pterocaulon redolens*. *Heterocycles*, v. 61, p. 183-187, 2003.

KILVINGTON, S.; LARKIN, D. F. P.; WHITE, D. G.; BEECHING, J. R. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 12, p. 2722-2725, 1990.

LARKIN, D. F. P.; KILVINGTON, S.; EASTY, L. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *British Journal of Ophthalmology*, v. 74, p. 133-135, 1990.

LIMA, L. F. P. Gênero *Pterocaulon* Eil. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul: Aspectos taxonômicos, palinológicos e fitoquímicos. *Dissertação de Mestrado*. Programa de pós-graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LOBARDO, A. Flora Montevicensis. *Intendência Municipal de Montevideo*. T. 2, p. 217-221, 1983.

MACLEOD, J. K.; RASMUSSEN, H. B. A hydroxyl- β -caryophyllene from *Pterocaulon serrulatum*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 105-108, 1999.

MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; LEITÃO FILHO, H. F.; FRIGUETTO, R. T. S.; BARROS, S. M. G. Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 6, p. 1369-1371, 1981.

MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; VILARDES, N. J.; LEITÃO FILHO, H. F. Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. *Phytochemistry*, v. 28, n. 9, p. 2497-2499, 1989.

MALME, G. O. Am. Die Compositae der zweitem Regnellschen Reise. *Arkiv for Botanik*. Bd: 24 A, n. 6, p. 1-61, 1931.

MATOBA, A. Y.; PARE, P. D.; LE, T. D.; OSATO, M. S. The effects of freezing and antibiotics on the viability of *Acanthamoeba* cysts. *Archives of Ophthalmology*, v. 107, p. 439-440, 1989.

MAZUR, T.; HADAŚ, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical Medicine and Parasitology*, v. 46, p. 106-108, 1995.

McCLELLAN, K.; COSTER, D. J. Acanthamoebic keratitis diagnosed by paracentesis and biopsy and treated with propamidine. *The British Journal of Ophthalmology*, v. 71, p. 734-736, 1987.

MEHDI, H.; GARG, H. S.; GARG, N. K.; BHAKUNI, D. S. Sterols of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Steroids*, v. 51, p. 551-558, 1988.

MONGELLI, E.; PAMPURO, S.; COUSSIO, J.; SALOMON, H.; CICCIA, G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 145-151, 2000.

OBEID, W. N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L. A.; MACHADO, M. A. C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* - Relato de caso. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 66, p. 876-880, 2003.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; N. A. GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiology*, v. 11, p. 272-279, 2003.

OKETCH-RABAH H. A.; LEMMICH E.; DOSSAJI S. F.; THEANDER T. G.; OLSEN C. E.; CORNETT C.; KHARAZMI A.; CHRISTENSEN S. B. Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 5, p. 458-461, 1997.

OKETCH-RABAH H. A.; MWANGI, J. W.; LISGARTEN, J.; MBERU, E. K. A new antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiatica* roots. *Fitoterapia*, v. 71, n. 6, p. 636-640, 2000.

OSATO, M. S.; ROBINSON, N. M.; WILHELMUS, K. R.; JONES, D. B. In vitro evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 13, p. 431-435, 1991.

PALACIOS, P. S.; ROJO, A. A.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; DEBENEDETTI, S. L. 6,7-dioxygenated and 5,6,7-trioxygenated coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Medica*, v. 65, p. 294-295, 1999.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. v. 115, n. 4, p. 909-922, 2002.

PINTO, A. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAEDERSTORFF, D.; ROHMER, M. Sterol biosynthesis de novo via cycloartenol by the soil amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Journal of Biochemistry*, v. 231, p. 609-615, 1985.

RAMBO, B. A. Análise Geográfica das Compostas Sul-Brasileiras. *Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues*, v. 4, n. 4, p. 87-160, 1952.

RIVEIRO, M. E.; SHAYO, C.; MONEZOR, F.; FERNÁNDEZ, N.; BALDI, A.; DE KIMPE, N.; ROSSI, J.; DEBENEDETTI, S.; DAVIO, C. Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxycoumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Cancer Letters*, v. 210, p. 179-188, 2004.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S.; ORDAZ, C.; AVILA, G.; MUNÓZ, J. L.; ARCINIEGAS, A.; VIVAR, A. R. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Buddleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 327-334, 1999.

ROSENGURTT, B. Flora de Juan Jackson. In: *Rosengurt, B. Estudios sobre praderas naturales del Uruguay*. Montevideo: Rosgal, p. 420-422, 1946.

SALINAS, M. H. R. Famílias de Dicotiledoneas Venezolanas II. Subclases Rosidae y Asteridae – Evolucion, Filogenia, Generos. *Centro Jardín Botánico, Venezuela*, p. 108-109 e 173-180, 1992.

SCHUSTER, F. L.; JACOB, L. S. Effects of magainins on ameba and cyst stages of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, v. 36, p. 1263-1271, 1992.

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

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 41-51, 2004b.

SCHUSTER, F. L.; GUGLIELMO, B. J.; VISVESVARA, G. S. In-Vitro Activity of Miltefosine and Voriconazole on Clinical Isolates of Free-Living Amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 121–126, 2006.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T. M. A.; ROMANHA, A. J.; SHIN, Y. G.; CORDELL, G. A.; ZANI, C. L. New bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 634-637, 2003b.

SEELIGER, U. Coastal foredunes of southern Brazil: physiography, habitats, and vegetation. In: *Seelinger, U. Coastal plant communities of Latin America*. San Diego: Academic Press, p. 367-381, 1992.

SEMPLE, S. J.; REYNOLDS, G. D.; O'LEARY, M. C.; FLOWER, R. L. P. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 60, p.163-172, 1998.

SEMPLE, S. J.; NOBBS, S. F.; PIKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. P. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 68, p.283-288, 1999.

SILVA, F. M. A.; FOWLER, H. G.; LEMOS, R. N. S. Parasitismo em lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith), na região do Triângulo Mineiro, MG. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 26, p. 235-241, 1997.

SMITH, F. R.; KORN, E. D. 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: the major sterols of an amoeba. *Journal of Lipid Research*, v. 9, p. 405–408, 1968.

STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 211-214, 2005.

STEIN, A. C.; ÁLVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 95-98, 2006.

STEIN, A. C.; FRITZ D.; PAIVA LIMA, L.F., MATZENBACHER, N. I.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES V.; SONNET, P.; VON POSER, G. Distribution of coumarins in the tribe Plucheae, genus *Pterocaulon*. *Chemistry of Natural Compounds*, v.43, p.691-693, 2007.

STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZZARAGOZA, 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, n. 1, p. 45-54, 1998.

TAL, B.; ROBESON, D. J. The Metabolism of Sunflower Phytoalexins Ayapin and Scopoletin. *Plant Physiology*, v. 82, p. 167-172, 1986.

VERA, N.; BARDÓN, A.; CATALAN, C. A. N.; GENDRIS, T. E.; HERZ, W. New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Medica*, v. 67, p. 674-677, 2001.

VERA, N.; POPICH, S.; LUNA, L.; CRAVERO, R.; GONZÁLEZ, S. M.; BARDÓN, A. Toxicity and synergism in the feeding deterrence of some coumarins on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemistry & Biodiversity*, v. 3, p. 21- 26, 2006.

VIANNA, D.; VELHO, A.; RÓDIO, C.; CARVALHO, E. S.; ZACCHINO, S.; TEIXEIRA, H. F.; VON POSER, G. Development and validation of an UV-method for determination of coumarins in extract from aerial parts of *Pterocaulon balansae*. Artigo submetido a publicação no periódico *Phytochemical Analysis*, 2008.

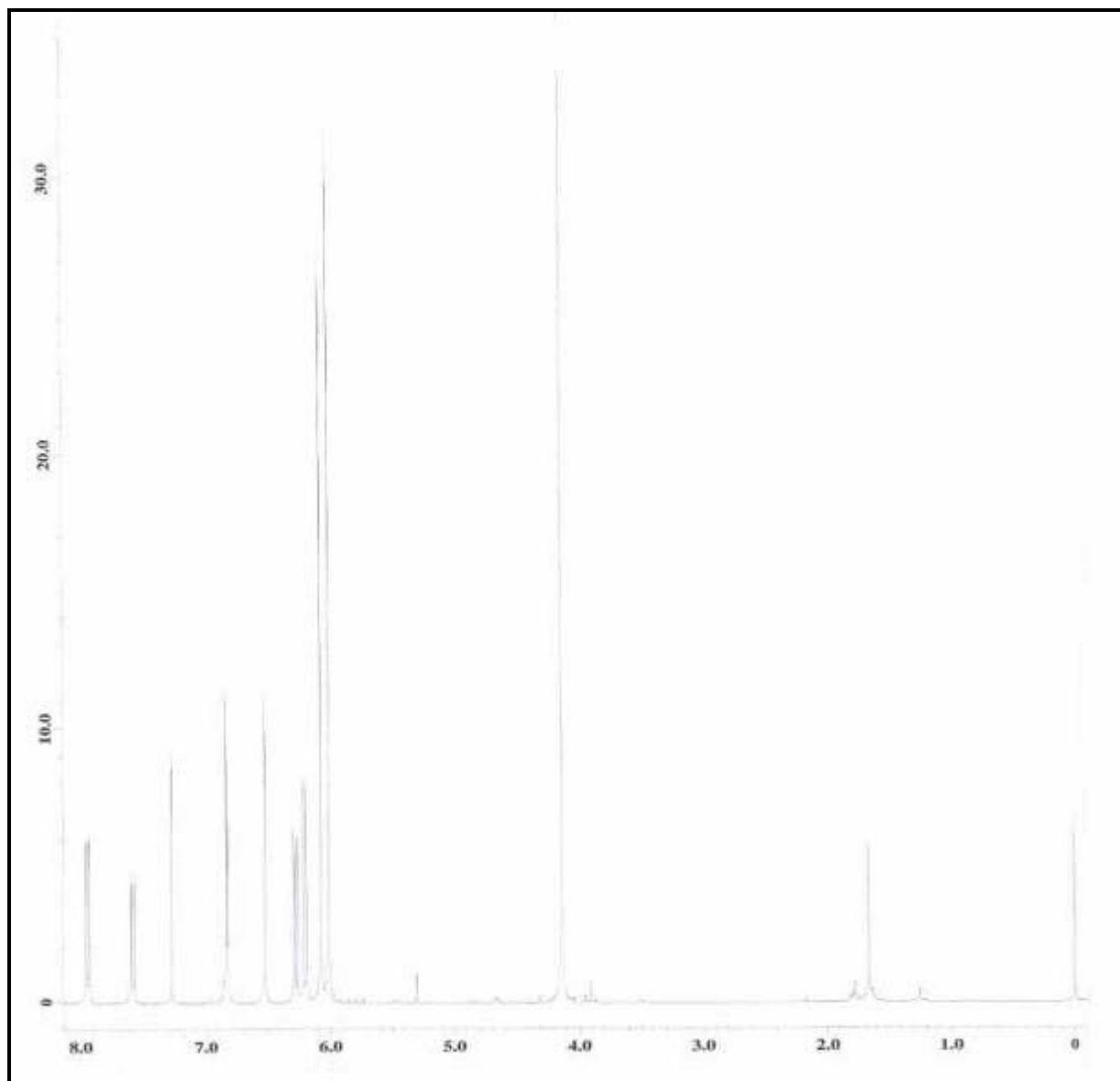
VILEGAS, W.; BORALLE, N.; CABRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; ARANTES S. F. Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 1017-1019, 1995.

WALOCHNIK, J.; DUCHENE, M.; SEIFERT, K.; OBWALLER, A.; HOTTKOWITZ, T.; WIEDERMANN, G.; EIBL, H.; ASPOCK, H. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 3, p. 695–701, 2002.

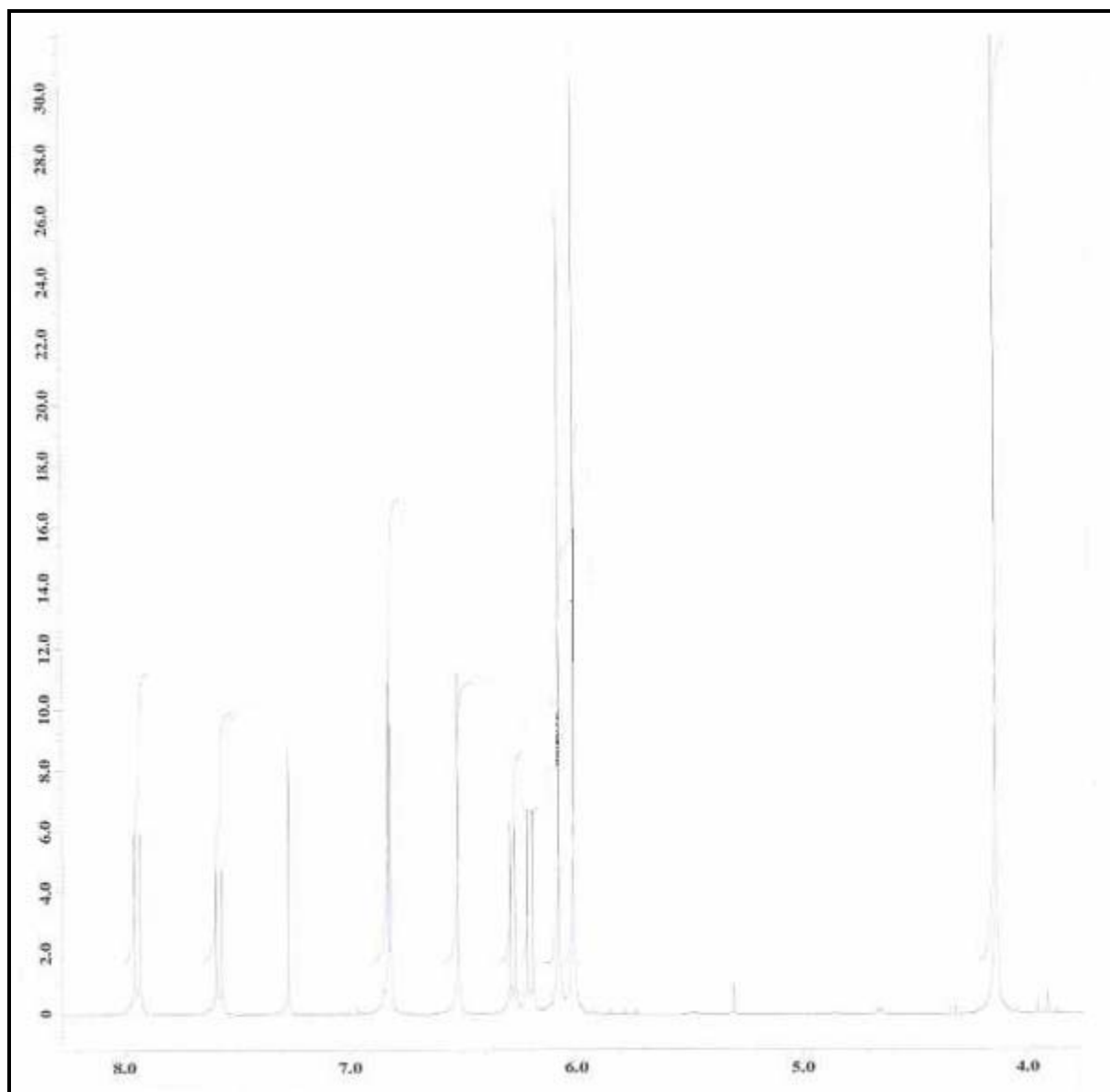
ANEXOS

ANEXO 1

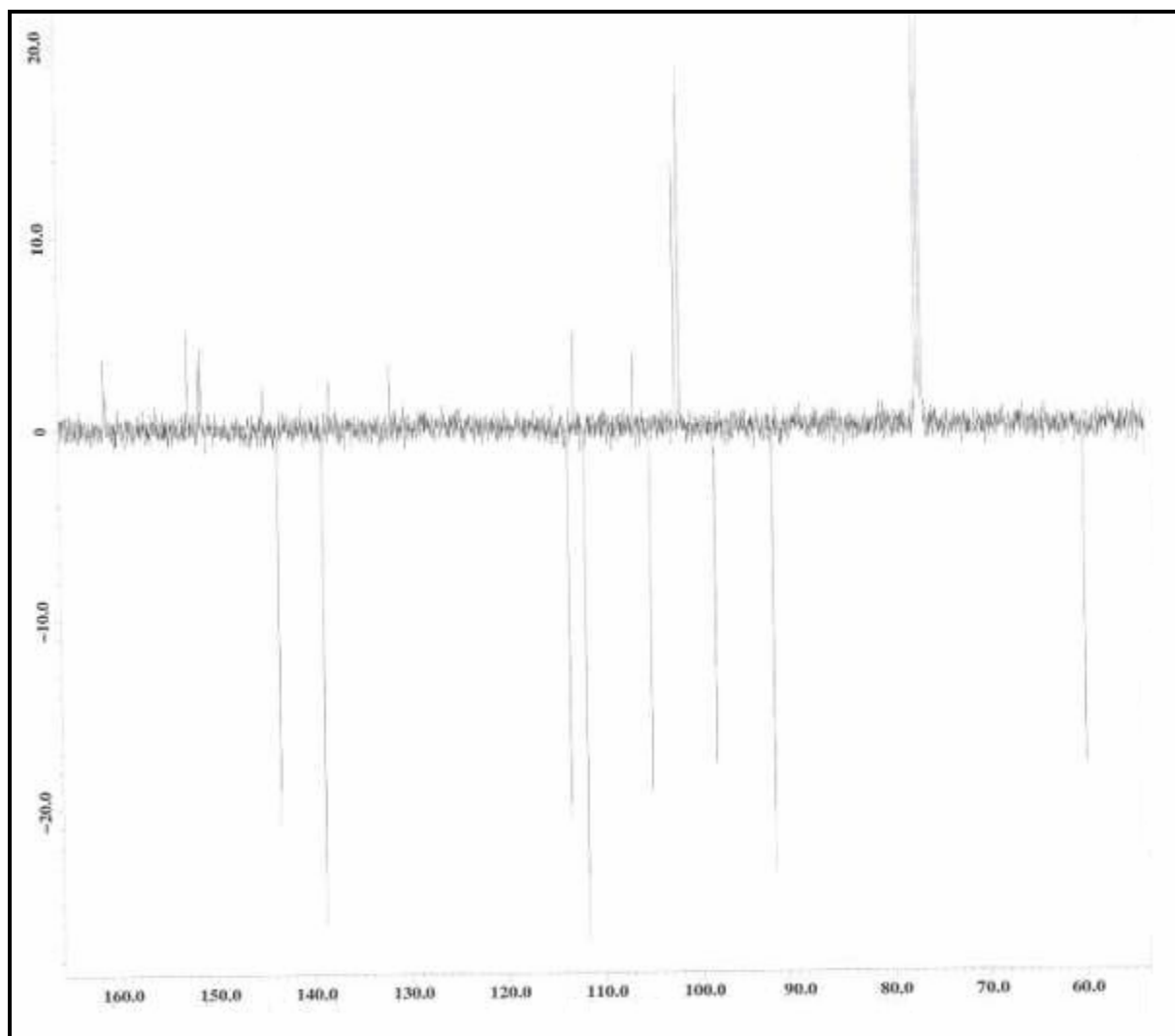
Espectros de RMN.



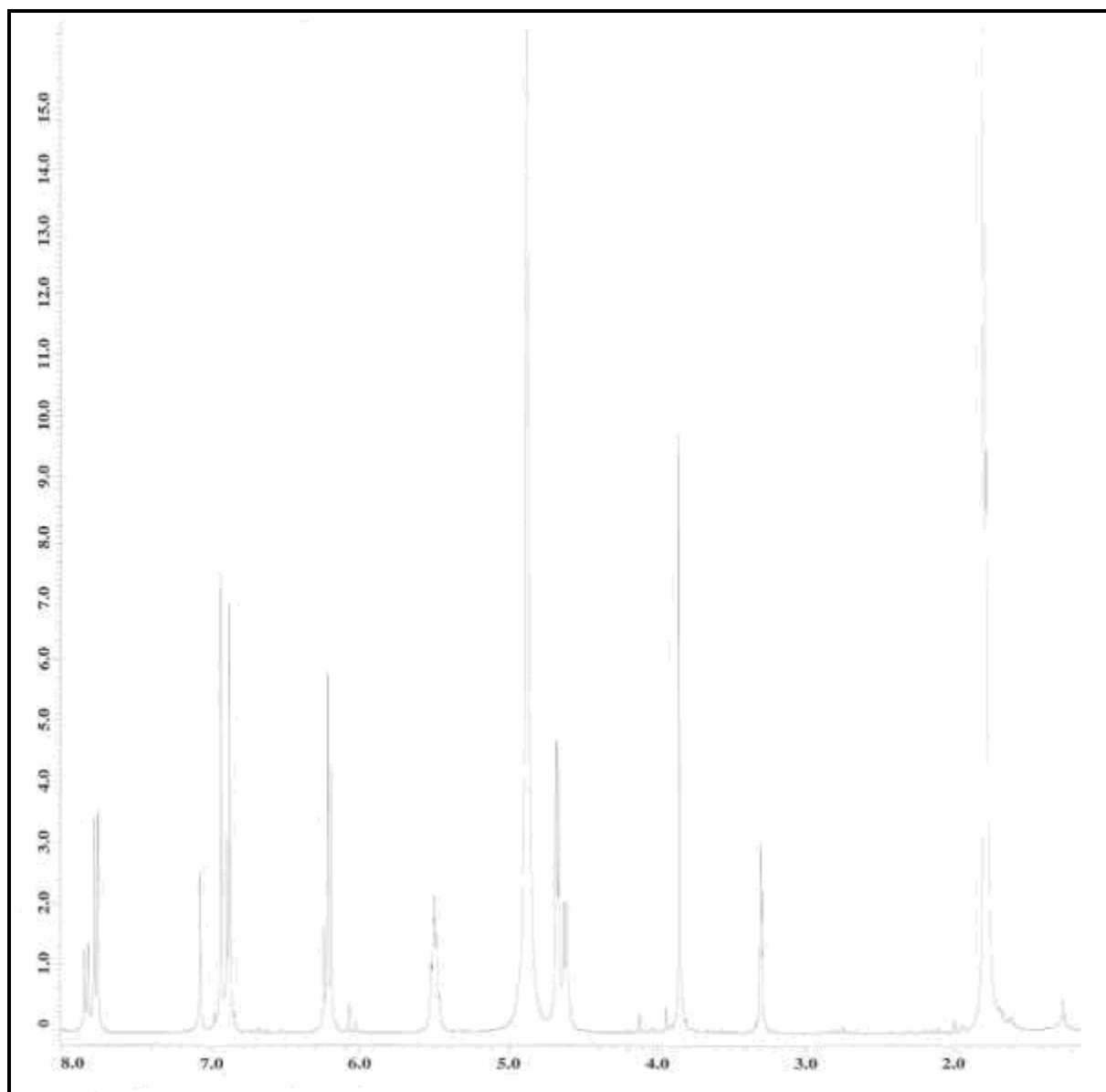
Espectro de RMN de ^1H do composto CR1 a 400 MHz.



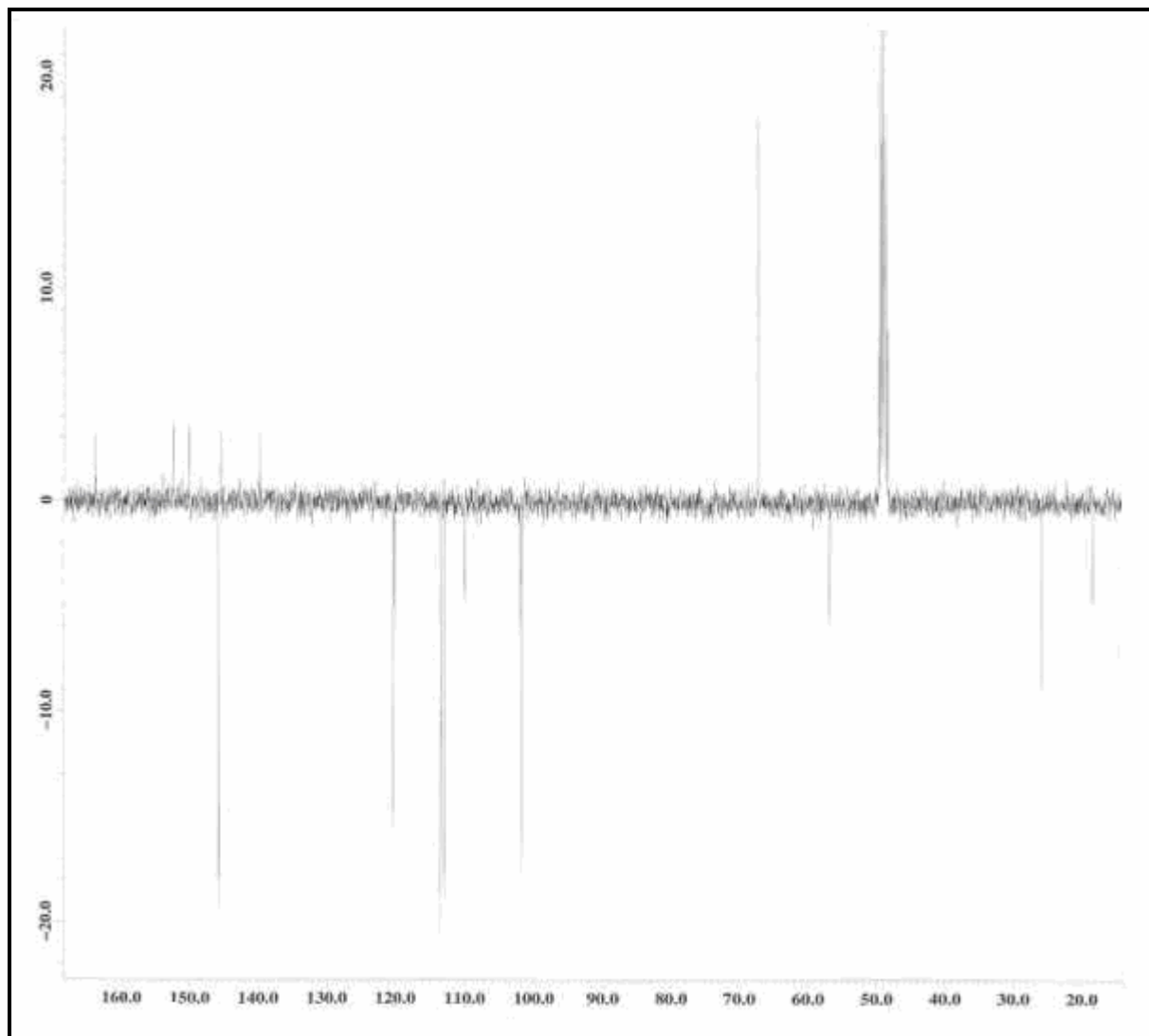
Espectro de RMN de ^1H do composto CR1 a 400 MHz.



Espectro de RMN de ^{13}C do composto CR1 a 100 MHz.



Espectro de RMN de ^1H do composto CR2 a 400 MHz.



Espectro de RMN de ^{13}C do composto CR2 a 100 MHz.

ANEXO 2

Artigo aceito para publicação no periódico *Parasitology Research*, agosto 2008.

Short Communication

In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*

Camila Ródio¹, Damiana da Rocha Vianna¹, Kresla Passos Kowalski¹, Lua Ferreira Panatieri², Gilsane von Poser¹✉ and Marilise Brittes Rott²

(1) PPG-Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

(2) Departamento de Microbiologia, Setor de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

✉ Gilsane von Poser

Email: gilsane.von@ufrgs.br

Received: 5 July 2008 **Accepted:** 28 August 2008 **Published online:** 16 September 2008

Abstract The crude extract and hexane, dichloromethane, and methanol fractions obtained from the aerial parts of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) were assayed against *Acanthamoeba castellanii*, a free-living amoeba that causes acute amoebic keratitis. Because of its capacity to form cysts, some strains of this protozoan are excellent opportunists and therapy resistant, necessitating a search for new drugs in order to develop more dynamic therapies that make it easier for patients to maintain long-term treatment. In this context, plants with medicinal properties have been analyzed. The broad-spectrum activity against a range of pathogenic fungi shown by extracts of *P. polystachyum*, together with the use of antifungal drugs as antiprotozoals, made it important to evaluate the amebicidal activity of these plant extracts against *A. castellanii*. The greatest activity was observed in the treatment with the hexane fraction, which lysed approximately 66% and 70% of the trophozoites in 48 and 72 h, respectively, preventing encystment.

Introduction

Acanthamoeba is a free-living, ubiquitous amoeba that occurs in trophozoite and cyst stages during its life cycle. The cyst form is inactive or shows minimal metabolic activity. In order to form the cysts, the amoeba condenses, forming a double-walled, spherical cellulose structure that protects against hostile conditions such as extreme temperature or antimicrobial agents (Aksozek et al. 2002; Khan 2006).

Strains of some species of *Acanthamoeba* are opportunistic pathogens that may cause granulomatous amoebic encephalitis or amoebic keratitis, an acute inflammation of the cornea that may cause significant loss of vision if it is not properly treated in the initial stage because the parasite may deeply invade parts of the eye. The increasing number of contact-lens users enhances the frequency of the illness because the trauma and hypoxia of the corneal epithelium facilitate the invasion of the parasite into the stroma. Furthermore, inadequate asepsis leads to

contamination by bacteria and fungi, producing a favorable culture medium for the growth of the protozoan (Obeid et al. 2003).

A number of antimicrobial agents can be used against *Acanthamoeba*. The treatment is maintained during a long period, and the drugs normally administered are cationic antiseptics, aromatic diamidines, such as hexamidine, pentamidine, or propamidine isothionate (Brolene®), aminoglycosides, imidazoles, and polyenes, such as amphotericin B. However, eradication of *Acanthamoeba* from the infection site is difficult because, under adverse conditions, the amebas encyst, and medical therapy is often less effective against cysts than against trophozoites. Therefore, it is important to develop more active drugs and dynamic therapies that facilitate the continuance of the treatment by the patients. In this context, the investigation of medicinal plants is a good approach in the search for new drugs (Auran et al. 1987; Cohen et al. 1987; McClellan and Coster 1987; Brantner and Grein 1994; Polat et al. 2008).

Species of *Pterocaulon* are used in traditional medicine for different purposes and are regarded as digestive, antiseptic, antifungal, antiparasitic, and insecticidal (Avancini 2002). The broad spectrum of action against a range of pathogenic fungi shown by extracts of *Pterocaulon alopecuroides*, *Pterocaulon balansae*, and *Pterocaulon polystachyum* (Stein et al. 2005), together with the usefulness of antifungal drugs as antiprotozoals, makes it important to perform bioguided assays aiming to evaluate the amebicidal activity of an extract and fractions of *P. polystachyum* against *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492), a strain of the T4 group. The use of this strain was appropriate because of its pathogenic nature: it causes amebic keratitis, an illness that is difficult to treat.

Material and methods

Plant material

The aerial parts of *P. polystachyum* were collected in the city of Guaíba, Brazil, in December, 2007. A voucher specimen has been deposited at the Herbarium of the Department of Botany of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN): *P. polystachyum* D.C. (136584).

Preparation of crude extract and fractions

The dry plant material was extracted by maceration with methanol (3×24 h) to obtain the crude extract. The fractions were obtained by successive macerations (3×24 h) of the plant material with hexane, dichloromethane, and methanol. The extract and fractions were subsequently evaporated to dryness under reduced pressure at 45°C.

Ameba cultures

The pathogenic strain of *A. castellanii* (50492) was obtained from the American Type Culture Collection. The axenic cultures were kept in proteose peptone, yeast extract, and glucose liquid medium at a constant temperature of 30°C. For the experiment, 2 mL 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. The precipitate of amebae was diluted in proteose peptone, yeast extract, and glucose (2% proteose peptone, 0.2% yeast extract, and 1.8% glucose) to obtain a concentration of 8×10^3 trophozoites per milliliter.

Assessment of amebicidal activity

The crude extract and fractions were solubilized with 1% Tween 20 and water in the final concentration of 5 mg/mL. The hexane fraction was tested at concentrations of 7.5, 6.25, 5.0, 3.75, and 2.5 mg/mL. The solutions were filtered through sterile membranes of cellulose acetate (0.22 μm).

For the assessment of amebicidal activity, 100 μL of culture of *A. castellanii* and 100 μL of each test solution were inoculated into each well of a 96-well plate. The plate was sealed and incubated at 30°C, monitored by means of an inverted microscope, and counted in a Fuchs-Rosenthal counting chamber after 48 and 72 h. The controls used were sterile water and sterile water containing 1% Tween 20. The experiments were performed in triplicate on three different days.

Statistical analysis

The results were analyzed by analysis of variance and comparison of averages (Tukey's test).

Results and discussion

There is no satisfactory treatment for amebic keratitis. A variety of drugs has been clinically tested, but none of these agents has proven to be effective against all the isolates of *Acanthamoeba* (Chu et al. [1998](#)). Some successful treatment regimens have included propamidine isothionate and dibromopropamidine, although the disease may sometimes still progress in patients treated with these compounds (Auran et al. [1987](#); Binder [1989](#); Aksozek et al. [2002](#)).

The results obtained in this study are presented as the percentage mortality of *A. castellanii* trophozoites, comparing the number of trophozoites found in the tests to the number of trophozoites in the negative control at two time periods (48 and 72 h). The amebicidal activity in the crude extract and in hexane, dichloromethane, and methanol fractions at the concentration of 5 mg/mL differed from each other, as assessed by Tukey's test, at 5% probability. At this concentration (Fig. [1](#)), all the fractions were more active than the crude methanolic extract. Among the fractions, the increase in the activity was directly proportional to the lipophilic character of the sample. Thus, the hexane fraction was the most active, killing approximately 66% and 69% of the trophozoites after 48 and 72 h, respectively.

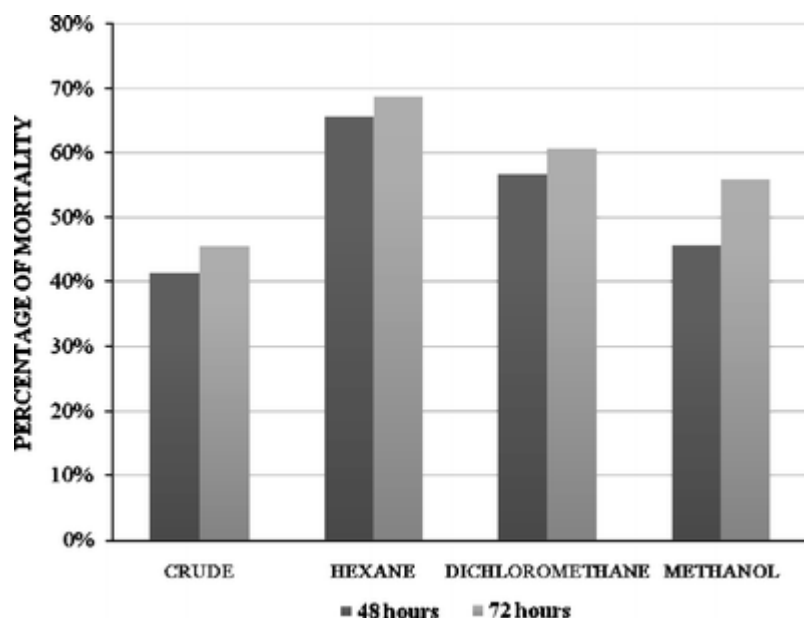


Fig. 1 Amebicidal activity of crude extract and fractions of *P. polystachyum* presented as the percentage mortality of *A. castellanii* trophozoites

The percentage mortality of *A. castellanii* trophozoites treated with different concentrations of the hexane fraction is shown in Fig. 2. This fraction was active in a dose-dependent manner, and the activity was statistically significant as assessed by Tukey's test and linear regression (Fig. 3). Besides the lysing effect, the hexane extract, at all concentrations used, was able to prevent the encystment of the trophozoites. Considering the resistance of the cysts and their ability to turn into the trophozoite form if therapy is suspended, compounds that prevent this survival strategy of *A. castellanii* are promising as new drugs against this agent (Matoba et al. 1989; Osato et al. 1991; Aksozek et al. 2002).

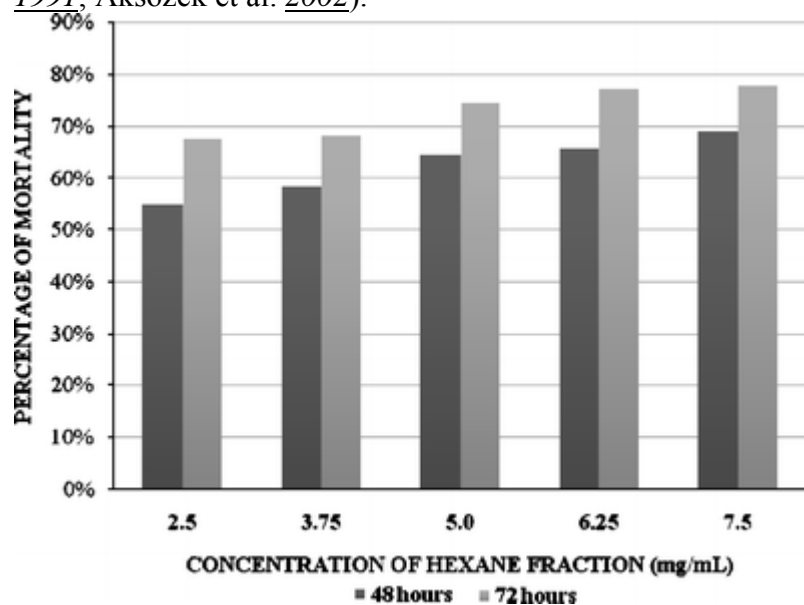


Fig. 2 Amebicidal activity of different concentrations of hexane fraction of *P. polystachyum* presented as the percentage mortality of *A. castellanii* trophozoites

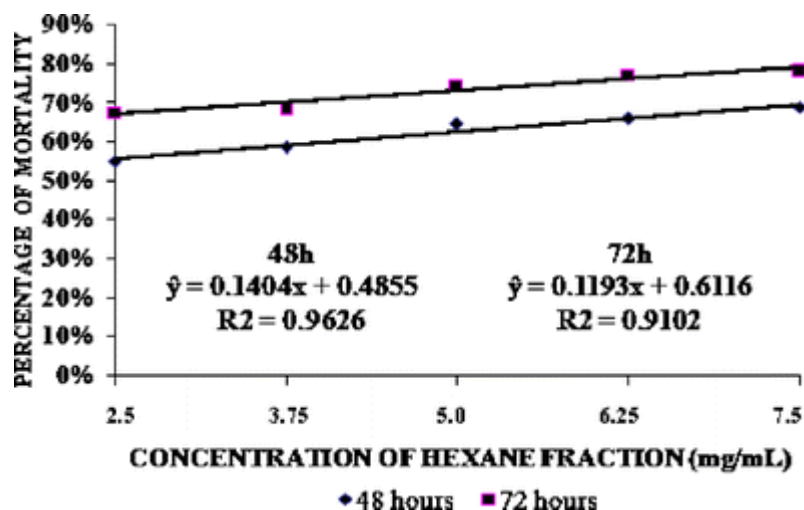


Fig. 3 Linear regression from the concentrations of *P. polystachyum* hexane fraction front of the percentage mortality of *A. castellanii* trophozoites

The investigation of plants used by traditional medicine is a strategy for finding alternative antibiotics (Brantner and Grein [1994](#)). Recently, several substances obtained from plant have been studied for amebicidal 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 major amebicidal activity, as well as the antifungal activity reported by Stein et al. ([2005](#)), was observed in the hexane and dichloromethane fractions of *P. polystachyum*, suggesting that the activity could be due to the coumarins, a group of natural products with recognized antimicrobial action. They are characteristic constituents of the aerial parts of species of *Pterocaulon* and are abundant in the lipophilic extracts of these plants (Vera et al. [2001](#)).

The mechanism of action of the antifungal agents is based on the interaction or on the inhibition of ergosterol, the main component of the walls of most fungi (Odds et al. [2003](#)). Polyenic derivatives such as amphotericin B and some azoles such as fluconazole are drugs that are also used as antiprotozoals for their effect on the cell membrane. The presence of ergosterol and other sterols in the membrane of *Acanthamoeba* may explain the sensitivity of these protozoans to these drugs (Raederstorff and Rohmer [1985](#); Mehdi et al. [1988](#); Schuster et al. [2006](#)). The coumarins present in the hexane fraction may interact with the ergosterol of the *Acanthamoeba* membrane because compounds of this group have been shown to inhibit some enzymes involved in sterol synthesis (Cravotto et al. [2004](#)).

In conclusion, *P. polystachyum* shows important amebicidal activity against trophozoites of *A. castellanii*. These results are promising, and further studies will be conducted with other strains and on ocular cells and in animal models to assess the toxicity and efficacy of the hexane fraction in vivo.

Acknowledgements The authors would like to thank CAPES and CNPq for financial support and Dr. Naveed Khan, School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London, for providing the *A. castellanii* strain. Dr. Janet W. Reid revised the English text.

References

- Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H (2002) Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* 88:621-623
- Auran JD, Star MB, Jakobiec FA (1987) *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. *Cornea* 6:2-26
- Avancini CAM (2002) Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Binder PS (1989) Cryotherapy for medically unresponsive *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 8:106-114
- Brantner A, Grein E (1994) Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 44:35-40
- Chu D, Miles H, Toney D, Nguyen C, Marciano-Cabral F (1998) Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitol Res* 84:746-752
- Cohen EJ, Parlato CJ, Arentsen JJ, Genvert GI, Eagle RC, Wieland MR, Laibson PR (1987) Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *American J Ophthalmol* 103:615-625
- Cravotto G, Balliano G, Robaldo B, Oliaro-Bosso S, Chimichi S, Boccalini M (2004) Farnesyloxycoumarins, a new class of squalene-hopene cyclase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1931-1934
- Di Stasi LC (1995) Amoebicidal compounds from medicinal plants. *Parasitologia* 37:29-39
- Khan NA (2006) *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30:564-
- Matoba AY, Pare PD, Le TD, Osato MS (1989) The effects of freezing and antibiotics on the viability of *Acanthamoeba* cysts. *Arch Ophthalmol* 107:439-440 595
- McClellan K, Coster DJ (1987) *Acanthamoebic* keratitis diagnosed by paracentesis and biopsy and treated with propamidine. *British J Ophthalmol* 71:734-736
- Mehdi H, Garg HS, Garg NK, Bhakuni DS (1988) Sterols of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Steroids* 51:551-558
- Obeid WN, Araújo R, Vieira LA, Machado MAC (2003) Ceratite bilateral por *Acanthamoeba*-Relato de caso. *Arq Bras Oftalmol* 66:876-880

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol 11:272-279

Osato MS, Robinson NM, Wilhelmus KR, Jones DB (1991) In vitro evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*. J Infect Dis 13:431-435

Polat ZA, Vural A, Ozan F, Tepe B, Özcelik S, Cetin A (2008) *In vitro* evaluation of the amoebicidal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. J Ocular Pharmacol Therapeutics 24:8-14

Raederstorff D, Rohmer M (1985) Sterol biosynthesis de novo via cycloartenol by the soil amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. J Biochem 231:609-615

Schuster FL, Guglielmo BJ, Visvesvara GS (2006) In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba spp.*, and *Naegleria fowleri*. J Euk Microbiol 53:121-126

Stein AC, Sortino A, Avancini C, Zacchino S, Poser GL (2005) Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). J Ethnopharmacol 99:211-214

Vera N, Bardón A, Catalan CAN, Gedris TE, Herz W (2001) New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. Planta Medica 67:674-677

