



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais



**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDOS DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM LIGANTES
ORGÂNICOS E SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS
METÁLICOS**

Dourados – MS
Março – 2013



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Unidade Universitária de Dourados
Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais



**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA ESTUDOS DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM LIGANTES
ORGÂNICOS E SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS
METÁLICOS**

Acadêmico: Antonio Fernandes dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Ademir dos Anjos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

Dourados – MS
Março – 2013

S233a Santos, Antonio Fernandes dos

Avaliação de metodologias para estudos da atividade antimicrobiana com ligantes orgânicos e seus respectivos complexos metálicos / Antonio Fernandes dos Santos. Dourados, MS: UEMS, 2013.

80p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2013.

Orientador: Prof. Dr Ademir dos Anjos

1. Complexos metálicos 2. Atividade antimicrobiana
3. Avaliação de metodologias I. Título.

CDD 20.ed. 660.62

EPÍGRAFE

*Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento*

(Provérbios 3:13)

Dedico este trabalho a minha amada esposa Andréia Aparecida e minha querida filha Julia Gabrielly.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me dar saúde e confiança para a realização deste trabalho;

Aos meus pais, Severino Antonio dos Santos (In Memoriam) e Celina Machado Fernandes de Amorim, por todo amor, dedicação e paciência comigo por toda minha vida;

A minha esposa Andréia Aparecida, pelo apoio e paciência durante toda a pesquisa;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademir dos Anjos, pela dedicação, confiança e paciência, prestadas a mim durante toda a pesquisa;

Aos Professores Dr. Márcio Barreto Rodrigues e Dra. Margarath Batistote por terem aceitado o convite para fazer a avaliação desse trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais e a Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidades Universitárias de Dourados e Naviraí, pela oportunidade de estudo;

A todos os colegas, funcionários e professores do Programa de Mestrado em Recursos Naturais/UEMS e UEMS/Unidade Universitária de Naviraí, que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos compostos fenólicos.....	26
Tabela 2	Ilustra as cepas bacterianas utilizadas na avaliação de atividade antimicrobiana.....	43
Tabela 3	Ilustra os discos antimicrobianos utilizados na avaliação de atividade antimicrobiana.....	44
Tabela 4	Tabela de solubilidade dos compostos.....	56
Tabela 5	Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL dos compostos.....	61
Tabela 6	Diâmetro do halo de inibição, média e desvio padrão (mm), pela ação do flavonóide Quercetina diluído em diferentes solventes.....	63
Tabela 7	Diâmetro do halo de inibição, média e desvio padrão (mm), pela ação da quercetina diluída em metanol e complexo metálico 1.....	63
Tabela 8	Diâmetro do halo de inibição, média e desvio padrão (mm), pela ação antimicrobiana do Ligante Sintético e complexo metálico 2.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia de uma celular procariótica.....	05
Figura 2	Diferentes formatos das células bacterianas.....	06
Figura 3	Fases do crescimento bacteriano.....	08
Figura 4	Estrutura básica da parede celular de bactérias gram-positivas.....	09
Figura 5	Estrutura básica da parede celular de bactérias gram-negativas.....	09
Figura 6	Etapas do método de coloração gram.....	10
Figura 7	Ilustra fotomicrografias da cepa <i>E. faecalis</i> utilizada neste trabalho.....	11
Figura 8	Ilustra fotomicrografias da cepa <i>S. aureus</i> utilizada neste trabalho.....	12
Figura 9	Ilustra fotomicrografias da cepa <i>E. coli</i> utilizada neste trabalho.....	13
Figura 10	Ilustra fotomicrografias da cepa <i>P. fluorescens</i> utilizada neste trabalho.....	14
Figura 11	Mecanismos de resistência a antibióticos.....	25
Figura 12	Estrutura básica dos flavonóides, dois anéis fenil (A e B) ligados através de um anel pirano (C).....	29
Figura 13	Estruturas básicas de algumas classes de flavonóides.....	29
Figura 14	Estrutura química do flavonóide Quercetina.....	37
Figura 15	Estrutura tridimensional da cisplatina.....	39
Figura 16	Ilustra a metodologia utilizada para determinação da CIM.....	48
Figura 17	Ilustra a metodologia utilizada para determinação da CBM.....	49
Figura 18	Ilustra etapas do teste de sensibilidade a antimicrobiano.....	52
Figura 19	Ilustra a forma de medição dos halos de inibição.....	53
Figura 20	Ilustra a estrutura química proposta para o complexo 1.....	55
Figura 21	A estrutura química proposta para: a) o ligante sintético H2bbppd e b) o complexo metálico 2, respectivamente.....	57

Figura 22	Ilustra diagramas em caixa dos resultados do teste de sensibilidade a antimicrobiano utilizando diferentes compostos.....	62
Figura 23	Ilustra resultados do teste de sensibilidade a antimicrobiano.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BaSO₄	Sulfato de Bário
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CHN	Análise elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cu(CH₃COO)₂.H₂O	Acetato Cúprico ou de Cobre II (aquoso)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
H2bbppd	Ligante sintético N,N',N,N'-bis[2-hidroxi-3,5-di-terc-butilbenzil) (2-piridilmetil)]-1-3-diaminopropano
KClO₄	Perclorato de Potássio
LB	Caldo Luria-Bertrani
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio (Sal de Cozinha)
P.A.	ParA análise
QEtOH	Quercetina diluída em Etanol

QMeOH	Quercetina diluída em Metanol
ROS	Espéces reativas de oxigênio
TSA	Teste de sensibilidade a antimicrobiano (TSA)
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UV-Vis	Ultravioleta-visível (comprimento de onda)
µg	Micrograma

RESUMO

O surgimento de bactérias resistentes reduz a eficácia de terapias antimicrobianas com antibióticos de amplo espectro de ação, o que implica no uso de antibióticos altamente seletivos, de custo mais elevado e em alguns casos podem ser mais tóxicos ao paciente. O presente trabalho buscou avaliar metodologias e realizar bioensaios de atividade antimicrobiana com complexos metálicos e seus ligantes livres (não coordenados) frente a bactérias padronizadas Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando normas para teste de suscetibilidade e estudos de avaliação de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Foram avaliadas metodologias para determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima pelo método de macrodiluição em tubo e plaqueamento, respectivamente, e Teste de Sensibilidade a Antimicrobiano pelo método de disco-difusão, utilizando o complexo metálico 1 - sintetizado a partir de quercetina com íons Ga(III), e o complexo metálico 2 - produzido a partir do ligante sintético H2bbppd com íons Cu(II) e respectivos ligantes orgânicos. São metodologias de baixo custo capazes de determinar a CIM e CBM, e realizar o TSA de complexos metálicos, com boa eficiência e reprodutividade de execução. Os dados produzidos nos bioensaios foram quantitativos e/ou qualitativos, relacionados à suscetibilidade das cepas bacterianas aos compostos testados. Os resultados dos bioensaios revelaram atividade antimicrobiana nos complexos metálicos 1 e 2 superior a de seus ligantes. Os valores de CIM obtidos para estes complexos demonstram potencial para o uso farmacológico, e que os qualificam para estudos posteriores sobre o mecanismo de inibição do crescimento e toxicidade visando avaliar o potencial de aplicação terapêutica destes compostos como futuros fármacos.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, Complexo metálico, Avaliação de metodologias.

ABSTRACT

The emergence of resistant bacteria reduces the effectiveness of antimicrobial therapy with broad-spectrum antibiotic action, which involves the use of antibiotics highly selective, higher cost and in some cases may be more toxic to the patient. This study aimed to evaluate methodologies and perform bioassays with antimicrobial metal complexes and their free ligands (uncoordinated) standardized against bacteria Gram-positive and Gram-negative bacteria, using standards for susceptibility testing and evaluation studies of antimicrobial activity of plant extracts. Methodologies were evaluated to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration by the method of macrodilution tube and plating, respectively, and Antimicrobial Susceptibility Testing by the disk diffusion method, using the metal complex 1 - synthesized from quercetin ions Ga (III) metal complex and 2 - produced from synthetic binder H2bbppd with Cu (II) and their organic ligands. Methodologies are inexpensive able to determine the MIC and MBC, and realize the TSA metal complex, with good reproducibility and efficiency of execution. The data generated in Bioassays were quantitative and / or qualitative, related to susceptibility of the bacterial strains to the compounds tested. The results of bioassays showed antimicrobial activity in the metal complexes 1 and 2 above their ligands. The MIC values obtained for these complexes show potential for pharmacological use, and that qualify for further studies on the mechanism of growth inhibition and toxicity to evaluate the potential therapeutic applications of these compounds as future drugs.

Keywords: Antibacterial activity, complex metallic, Evaluation methodologies.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 MICRO-ORGANISMOS	4
a) Conceito.....	4
b) Bactérias	4
c) Crescimento bacteriano	7
3.2 BACTÉRIAS SELECIONADAS	8
a) Método de coloração Gram.....	8
b) BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.....	10
b.1) <i>Enterococcus faecalis</i>	10
b.2) <i>Staphylococcus aureus</i>	11
c) BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	13
c.1) <i>Escherichia coli</i>	13
c.2) <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14
3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	16
a) Bioensaios de difusão.....	17
b) Bioensaios de diluição.....	17
b) Bioensaios em meio de cultura	18
3.5 ANTIBIÓTICOS.....	18
3.5.1 Mecanismos de ação dos antibióticos	20
3.5.2 Antibióticos de uso clínico.....	21
3.5.3 Resistência a antibióticos	24
3.6 POLIFENÓIS.....	26
3.6.1 Flavonóides	27
3.6.2 Efeitos Biológicos dos Flavonóides.....	29
a) Atividade antioxidante.....	30
b) Ação antitumoral.....	31
c) Atividade antiinflamatória	32

d) Atividade hormonal.....	33
e) Atividade antiviral.....	34
f) Atividade antimicrobiana.....	34
g) Toxicidade dos flavonóides.....	36
3.6.3 Quercetina.....	37
3.7 COMPLEXOS METÁLICOS DE INTERESSE BIOLÓGICO.....	38
3.7.1 Gálio.....	40
3.7.2 Cobre.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 MATERIAIS.....	43
4.1.1 Reagentes e solventes.....	43
4.1.2 Materiais utilizados.....	43
4.1.3 Equipamentos utilizados.....	44
4.2 MÉTODOS.....	45
4.2.1 Metodologias utilizadas nos bioensaios.....	45
4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45
4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	48
4.2.4 Teste de sensibilidade a antimicrobiano (TSA).....	49
4.2.5 Análise Estatística.....	52
4.2.6 Padrão de turbidez do inóculo.....	53
4.3 SÍNTESES DOS COMPOSTOS QUÍMICOS.....	54
4.3.1 Complexo Metálico 1: Quercetina e íons de Ga(III).....	54
4.3.2 Ligante Sintético H2bbppd.....	55
4.3.3 Complexo Metálico 2: H2bbppd e íons Cu(II).....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5.1 CARACTERIZAÇÃO.....	57
a) Complexo 1: Quercetina e íons Ga(III).....	57
b) Ligante H2bbppd e Complexo 2 [H2bbppd e íons Cu(II)].....	57
5.2 BIOENSAIOS.....	57
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima.....	57
5.2.2 Teste de Sensibilidade a Antimicrobiano.....	60
6 CONCLUSÃO.....	66
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
8 REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são substâncias que possuem a capacidade de inibir o crescimento microbiano, pois interferem na biologia dos micro-organismos, causando a destruição do seu corpo celular, alterando seu metabolismo ou inibindo a reprodução, o que auxilia o sistema imunológico a combater as infecções.

Anualmente, milhões de pessoas morrem em decorrência de infecções causadas por micro-organismos patogênicos resistentes aos antibióticos atuais. Ao mesmo tempo, grupos de pesquisas buscam produzir novos compostos capazes de combater estes micro-organismos.

O aparecimento de bactérias resistentes reduz a eficácia de terapias antimicrobianas e causam o aumento de custos de tratamento de infecções, com o uso de antibióticos com alta seletividade, que ainda podem ser mais tóxicos ao paciente. As bactérias que causam mortes por infecção hospitalar são exemplos de micro-organismos que se tornaram resistentes a antibióticos.

Estudos científicos têm revelado melhoria nas atividades biológicas de ligantes orgânicos após a coordenação com íons metálicos, inclusive aumento da ação antimicrobiana frente a diversos microrganismos.

Na busca de novos antimicrobianos que sejam eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, deve-se considerar basicamente a descoberta de novos alvos e a potencialização da atividade de compostos com atividade antimicrobiana conhecida.

Desse modo, a coordenação de íons metálicos a ligantes orgânicos, que já apresentam atividade antimicrobiana quando puros, pode favorecer a produção de novos fármacos com mecanismo de ação desconhecidos por bactérias patogênicas e apresentando potencial para infecções causadas por estes micro-organismos.

A atividade antimicrobiana pode ser avaliada por bioensaios utilizando micro-organismos de interesse clínico, são estudos iniciais para a investigação de novos agentes antimicrobianos.

Este trabalho de pesquisa buscou avaliar metodologias e realizar bioensaios de atividade antimicrobiana com complexos metálicos e seus ligantes livres (não

coordenados) frente a bactérias padronizadas Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando normas para teste de suscetibilidade e estudos de avaliação de atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

Os resultados dos bioensaios demonstraram eficiência das metodologias desenvolvidas para avaliação antimicrobiana, com reprodutibilidade do método. Sendo produzidos dados quantitativos e/ou qualitativos relacionados à suscetibilidade das cepas bacterianas padronizadas aos compostos avaliados.

Após a avaliação das metodologias foram realizados bioensaios com os complexos metálicos e seus ligantes livres (não coordenados). Os resultados dos bioensaios demonstraram aumento significativo da atividade antimicrobiana dos ligantes orgânicos após a coordenação com íons metálicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar metodologias e realizar bioensaios de avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos contendo íons Ga(III) e Cu(II) e seus ligantes, frente à cepas bacterianas padronizadas.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar metodologia para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em tubos de complexos metálicos contendo íons Ga(III) e Cu(II) e seus ligantes, frente a cepas de bactérias padronizadas.

Estudar a aplicação da metodologia para estimar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de complexos metálicos contendo íons Ga(III) e Cu(II) e seus ligantes, frente a cepas de bactérias padronizadas.

Adaptar metodologia para a realização de Teste de Sensibilidade a Antimicrobiano (TSA) com complexos metálicos contendo íons Ga(III) e Cu(II) e seus ligantes, frente a cepas de bactérias padronizadas.

Realizar bioensaios para avaliar a suscetibilidade de cepas bacterianas padronizadas a complexos metálicos contendo íons Ga(III) e Cu(II) e seus ligantes, utilizando as metodologias citadas anteriormente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICRO-ORGANISMOS

a) Conceito

O termo “micro-organismos” engloba seres vivos filogeneticamente distintos, incluindo organismos procariontes, arqueobactérias (*Archaea*) e as bactérias, bem como eucariontes, as algas microscópicas (cianofíceas), fungos filamentosos, leveduras e os protozoários (TORTORA *et al.*, 2010).

Os micro-organismos são encontrados em abundância na natureza, formando grandes populações compostas de diversas espécies, apresentam tamanho microscópico e podem ser encontrado isoladamente ou formando agrupamentos conhecidos como colônias (KAR, 2008).

A microbiologia é uma área especializada da biologia que lida com as formas de vida pequenas que não podem ser observados sem ferramentas de ampliação (TALARO & CHESS, 2012).

b) Bactérias

As bactérias (do grego *bakterion*, "bastão") são organismos unicelulares procariontes. Os procariontes (do Grego *pro*, "antes", e *karyon*, "amêndoa" ou "núcleo") são micro-organismos que apresentam um núcleo primitivo com morfologia muito mais simples do que as células eucarióticas, e que não possuem uma verdadeira membrana separando as organelas celulares do núcleo, o envoltório nuclear (TRIVEDI *et al.*, 2010).

As bactérias em forma de bastonete (bacilo) possuem dimensões aproximadas de 1 µm de largura por 3 µm de comprimento, embora existam bacilos mais curtos e bactérias em forma de filamentos (espirilos) mais longas. Esses micro-organismos se reproduzem de forma assexuada por fissão binária (cissiparidade). Muitos organismos procariontes são similares na morfologia, porém, apresentam uma grande quantidade de variações fisiológicas relacionadas a diferenças genéticas e ecológicas (ENGELKIRK & DUBEN-ENGELKIRK, 2011).

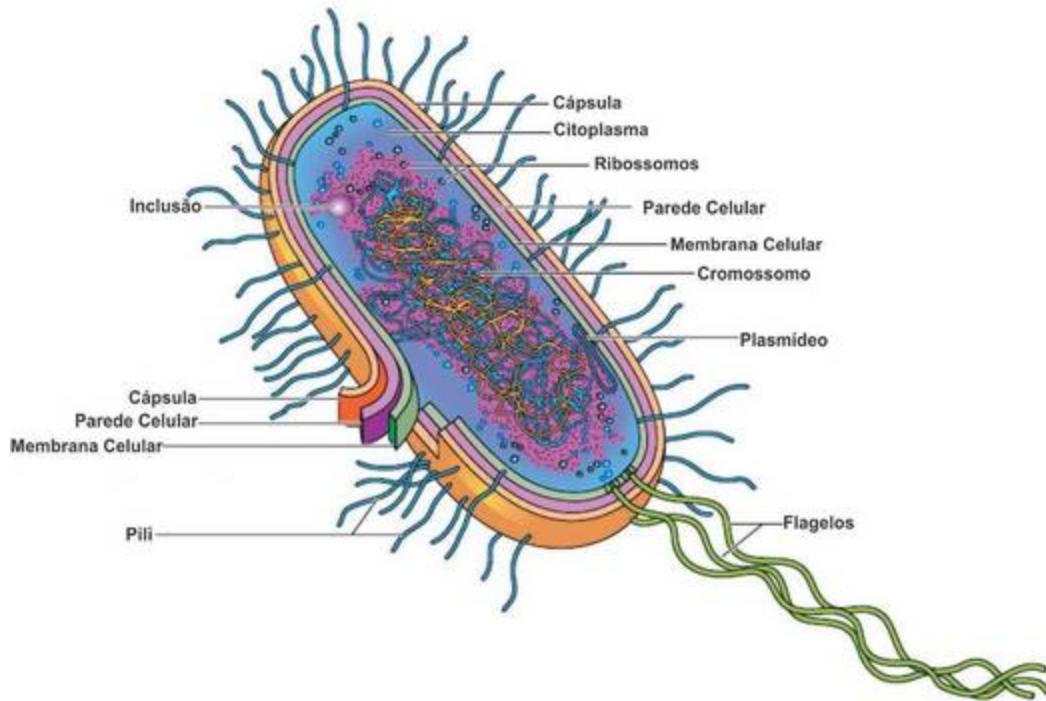


Figura 1. Morfologia de uma celular procariótica. Fonte: adaptado de Engelkirk & Duben-Engelkirk (2011) p. 29.

As bactérias são comumente encontradas em duas formas básicas: a) Cocos (*coccus*) são células de aproximadamente esféricas, como células individuais, ou associadas a arranjos característicos frequentemente úteis para a identificação de bactérias; b) Diplococos (*diplococcus*) surgem da divisão dos cocos e união aos pares até formar longas cadeias de cocos, este padrão é visto no gênero *Streptococcus*, *Enterococcus*, e *Lactococcus*. Nos indivíduos do gênero *Micrococcus* ocorre divisão em dois planos simétricos se formam grupos quadrados de quatro células chamados tétrades. A divisão em três planos simétricos produz pacotes cúbicos de oito células, como observado no Gênero *Sarcina* (WYLLEY *et al.*, 2008)

As bactérias também podem ser encontradas em formato de haste conhecida como bacilo (lactobacilos). Os bacilos diferem consideravelmente na sua relação comprimento-largura dos cocos, com exceção dos cocobacilos que podem ser tão curtos e largos que se assemelham cocos. Outros formatos bacterianos comuns são o vibrião que se assemelha a uma vírgula, e o espirilo que se parece com um espiral, a qual geralmente possui tufo de flagelos em uma ou ambas as extremidades da célula, ou espiroquetas, que são mais flexíveis e tem um único arranjo flagelar interno (BENSON & BROWN, 2001).

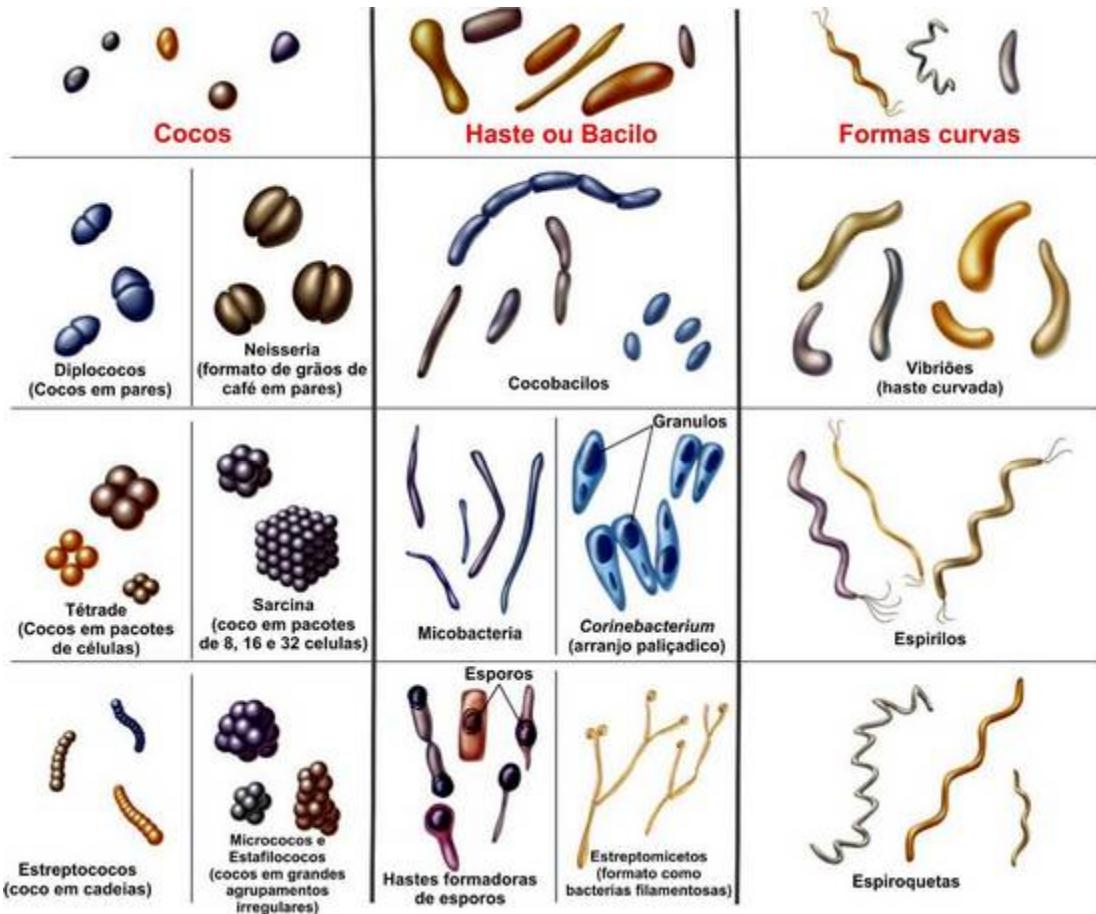


Figura 2. Diferentes formatos das células bacterianas. Fonte: adaptado de Talaro & Talaro (2003) p. 105.

A ampla gama de produtos que utilizam bactérias no seu ciclo produtivo afeta a sociedade humana de várias maneiras, além do que as atividades ecológicas desenvolvidas por estes micro-organismos são de enorme importância a regulação do ecossistema (ENGELKIRK & DUBEN-ENGELKIRK, 2011).

As bactérias têm importância ecológica na manutenção equilíbrio do meio ambiente através da reciclagem de elementos químicos, tais como o carbono e nitrogênio entre o solo, os organismos, e a atmosfera, utilizadas em aplicações comerciais e industriais para produzir alimentos, produtos químicos e drogas (tais como antibióticos) e tratamento de esgoto, controle de pragas, e limpar poluentes (TORTORA *et al.*, 2010).

c) Crescimento bacteriano

Os fatores necessários para o crescimento microbiano podem ser divididos em duas categorias principais: físicos e químicos. Os fatores físicos incluem temperatura, pH, pressão osmótica, pressão barométrica, a pressão atmosférica e sua composição. Os fatores químicos necessários incluem fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oligoelementos, oxigênio e fatos orgânicos de crescimento (TORTORA *et al.*, 2010). Se os cientistas desejam promover ou inibir o crescimento de micro-organismos, deve primeiro compreender essas necessidades fundamentais (ENGELKIRK & DUBEN-ENGELKIRK, 2011).

O domínio destes fatores promove o controle do crescimento de microorganismos em laboratórios, indústrias, hospitais e demais ambientes urbanos.

A maioria das bactérias se reproduz por fissão binária transversal, o termo *binário* significa que uma célula dá origem a duas, e *transversal* se refere à divisão em planos na largura da célula bacteriana. Durante a fissão binária, a célula-mãe aumenta, duplica seu cromossomo e forma um septo centro-transversal que divide a célula em duas. Este processo é repetido em intervalos por cada célula-filha, e com estas sucessivas divisões há o aumento de população bacteriana (TALARO & CHESS, 2012).

O crescimento bacteriano pode ser medido através de uma curva de crescimento (Figura 3). Essa curva apresenta quatro fases distintas: a) Fase *Lag*: ou fase de latência, ocorre logo após o micro-organismo ser distribuído em meio de cultura, e normalmente não existe aumento imediato no número de células; b) Fase *Log*: ou fase exponencial, as células bacterianas alcançam a taxa de divisão máxima na fase de crescimento exponencial (logarítmico). Esta fase continuará de acordo com o potencial genético do organismo, e contanto que células disponham de nutrientes adequados e que o ambiente seja favorável. Neste período a curva de crescimento aumenta geometricamente; c) Fase Estacionária: num sistema fechado, eventualmente, o crescimento da população cessa e a curva de crescimento se torna horizontal; d) Fase de Declínio ou morte: nessa etapa as mudanças ambientais se tornam prejudiciais a células bacterianas, que por privação de nutrientes e acúmulo de resíduos tóxicos sofrem danos irreparáveis resultando em perda de viabilidade e morte celular (KAR, 2008; TALARO & CHESS, 2012).

Curva de crescimento bacteriano

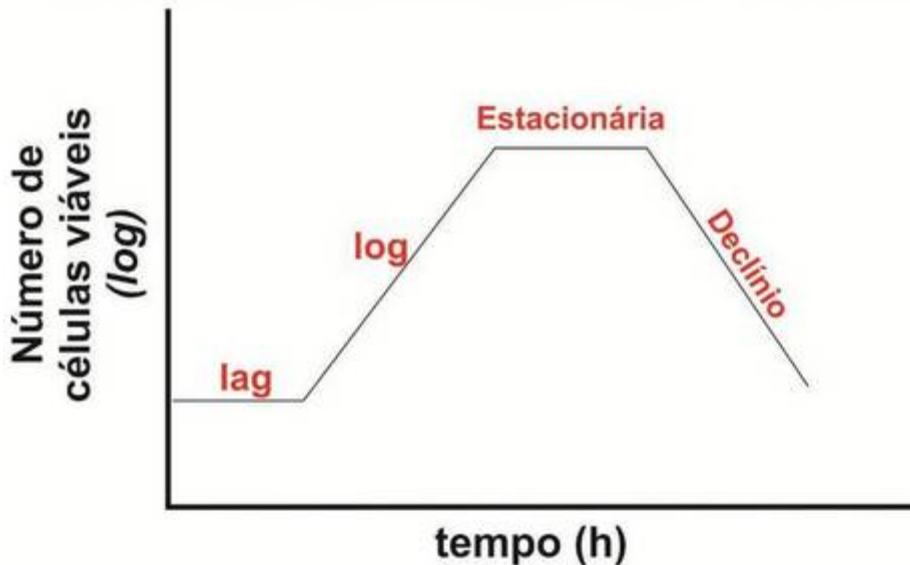


Figura 3 - Fases do crescimento bacteriano. Fonte: Próprio autor.

3.2 BACTÉRIAS SELECIONADAS

a) Método de coloração Gram

Em 1884, os estudos de coloração desenvolvidos pelo médico dinamarquês **Hans Christian Joachim Gram** possibilitaram a divisão das bactérias em dois grandes grupos, com base nos resultados da coloração (FREITAS & PICOLI, 2007).

Pela coloração Gram as bactérias gram-positivas são coradas em púrpura, enquanto bactérias gram-negativas foram coloridas de rosa ou vermelha. Essa diferença se deve ao fato que a parede celular de bactérias gram-positivas serem constituídas por uma única camada de peptidoglicano com aproximadamente 20-80 nm de espessura (Figura 3), enquanto nas bactérias gram-negativa a parede celular é bastante complexa, possui uma fina camada de peptidoglicano 2-7 nm (Figura 5), que é recoberta por uma camada de 7-8 nm de espessura de membrana externa (FREITAS & PICOLI, 2007).

Devido a esta diferença estrutural durante a metodologia de coloração de Gram as bactérias gram-negativas eliminam o primeiro corante e são coradas pelo segundo, enquanto as bactérias gram-positivas se comportam de forma distinta, retêm o primeiro corante e não absorvem o segundo.

Essa diferença estrutural também interfere fisiologicamente no corpo celular, podendo existir diferentes respostas biológicas das cepas bacterianas quando são expostas a uma mesma substância. Assim sendo, um mesmo antibiótico com amplo espectro de atividade, pode apresentar ação bactericida frente a uma cepa bacteriana gram-negativa e bacteriostática contra uma cepa gram-positiva.

Estudo clínico de pacientes em tratamento de listeriose humana comprovou que a Penicilina e Ampicilina, dois antióticos beta-lactâmicos reconhecidos por ação bactericida contra cepas gram-positivas e gram-negativas, apresentou ação bacteriostática frente a isolados clínicos de *Listeria spp*, uma bactéria gram-positiva (NOJIMOTO *et al.*, 1994).

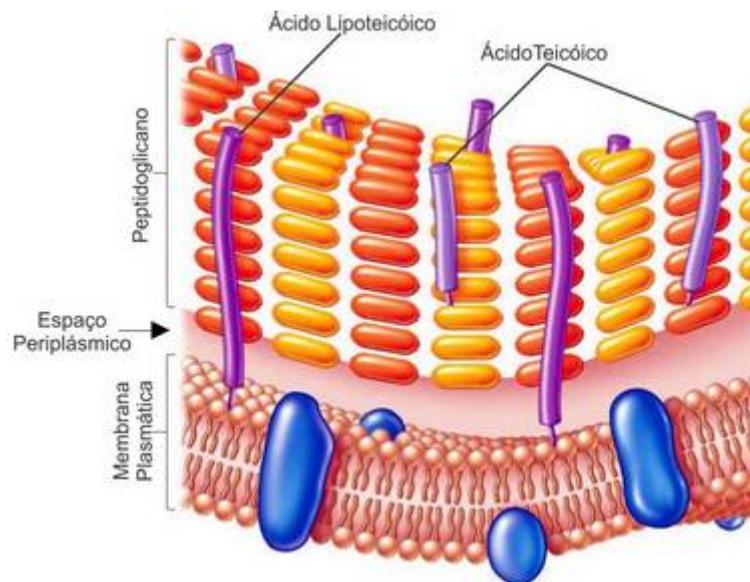


Figura 4. Estrutura básica da parede celular de bactérias gram-positivas. Fonte: adaptado de Willey *et al.* (2008) p.57.

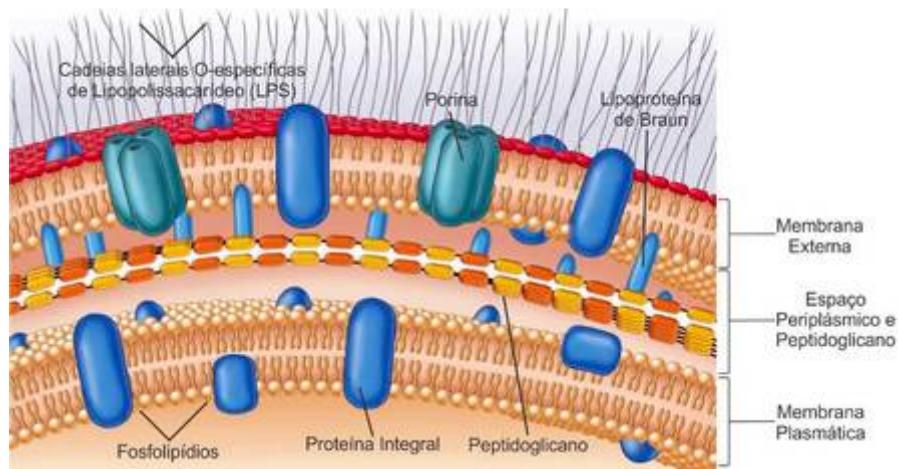


Figura 5. Estrutura básica da parede celular de bactérias gram-negativas. Fonte: adaptado de Willey *et al.* (2008) p.59.

Método de Coloração de Gram

Etapa 1: Preparação do esfregaço



Etapa 2: Coloração do esfregaço

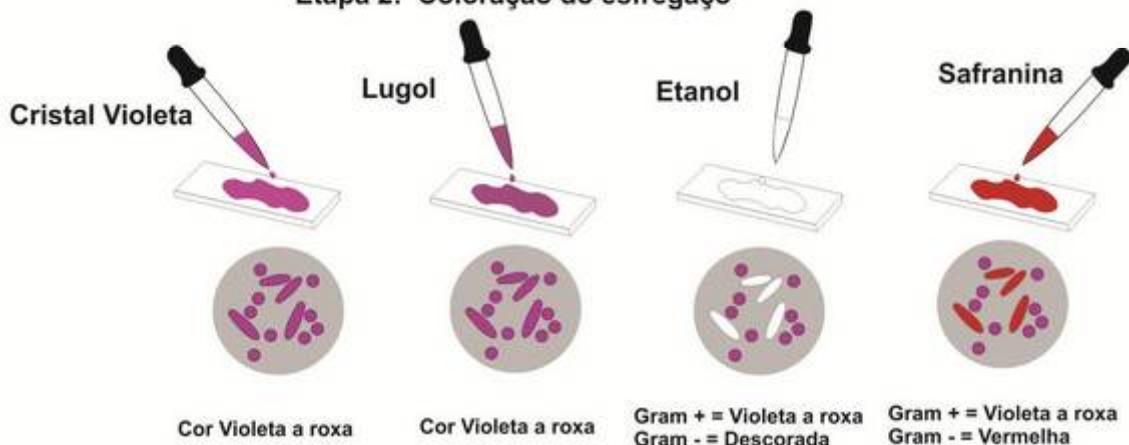


Figura 6. Etapas do método de coloração gram. Fonte: Próprio autor.

b) BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

b.1) *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis são bactérias gram-positivas que apresentam o corpo celular em formato estérico (cocos), podem ser encontradas isoladamente, em pares ou o mais cadeias mais. Essa anaeróbia facultativa, possuindo a capacidade de crescer na presença ou na ausência de oxigênio, apresenta um metabolismo fermentativo e motilidade, e são hospedeiros comuns do intestino grosso dos seres humanos (DALE & PARK, 2004).

Os *Enterococcus* podem metabolizar uma variedade de fontes de energia, incluindo hidratos de carbono, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina, e muitos ceto-ácidos, sobrevivem em ambientes muito severos, incluindo pH alcalino extrema e as concentrações de sal, são resistentes a sais biliares, a detergentes, metais pesados, etanol, azidas, dessecação, a temperaturas no intervalo de 10 a 45°C, e a 60° C durante 30 minutos (PARADELLA, 2007).

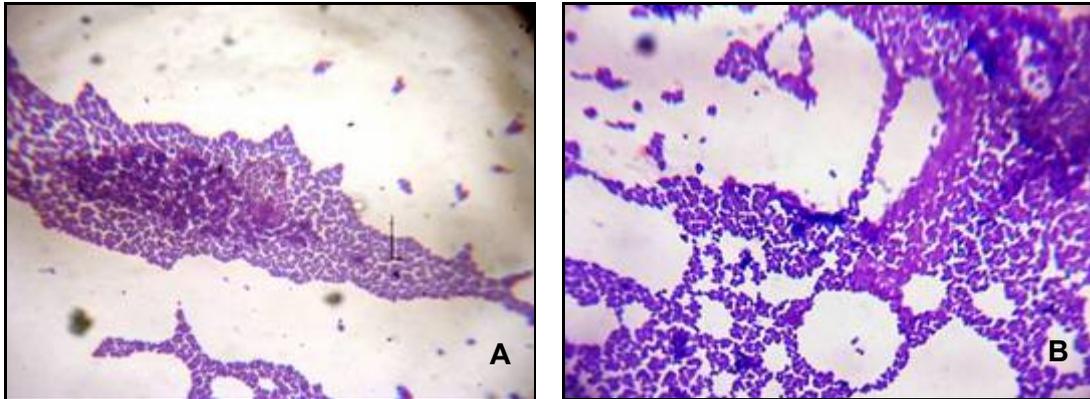


Figura 7. Ilustra fotomicrografias da cepa *E. faecalis* utilizada neste trabalho.
Fonte: Próprio autor.

A espécie *Enterococcus faecalis* é listada como a primeira das três principais causas de infecções hospitalares. A maioria destas infecções ocorre após uma cirurgia abdominal ou perfurações com trauma, mas pode também estar ligado ao reuso cateteres intravenosos, os quais deveriam ser considerados potenciais contaminantes. A *E. faecalis* também responsável é por infecções do trato urinário, bacteriemia, endocardite, meningite, e podem ser encontrados em infecções de feridas, juntamente com muitas outras bactérias (WILLEY, 2008).

E. faecalis está entre as bactérias mais resistentes aos antibióticos conhecidos. Ele contém muitas resistências a antibióticos naturais, juntamente com várias imunidades adquiridas transferidos em R-plasmídeos entre bactérias promíscuas. Mais de 25% do genoma de *E. faecalis* é exogenamente adquiridos, conduzindo a sua resistência aos antibióticos e o mais forte em certos casos todos os antibióticos. O *E. faecalis* também é considerado portador da resistência à vancomicina de outros gêneros de bactérias, ocorrendo frequentemente em infecções hospitalares secundárias, o torna essas cepas um problema de saúde pública. (STUART, 2006).

b.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um coco gram-positivo que ocorre isoladamente ou em agregados irregulares, são encontrados em cerca de 40% de pessoas saudáveis, nas narinas, sobre a pele, axilas e períneo alimentar (SCHELIN, 2011).

O *S. aureus* sobrevive a ambientes severos com grande variação de pH, temperatura, e concentração de cloreto de sódio (NaCl) em água. Essa robustez permite

que o micro-organismo se desenvolva em vários tipos de alimentos, produzindo enterotoxinas que podem causar intoxicação alimentar (SCHELIN, 2011).

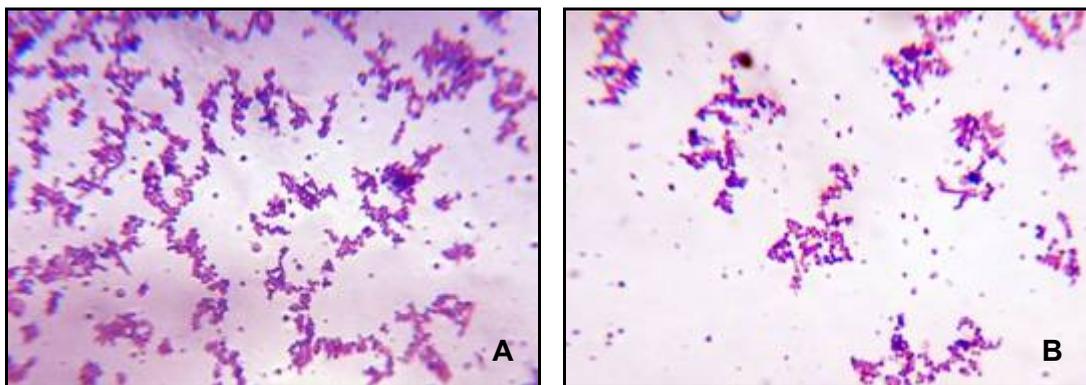


Figura 8. Ilustra fotomicrografias da cepa *S. aureus* utilizada neste trabalho.

Fonte: Próprio autor.

A história da suscetibilidade de *S. aureus* é uma lição na história de quimioterapia antimicrobiana. Inicialmente, os *S. aureus* eram sensíveis à penicilina, mas cepas que produziram β -lactamase logo predominaram, assim a meticilina e agentes relacionados (e.g. flucloxacilina) foram introduzidos e substituíram a penicilina (GILLESPIE & BAMFORD, 2012).

Posteriormente, surgiram *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), sendo necessário o uso de antibióticos do grupo dos glicopeptídeos, tais como vancomicina ou teicoplanina. Finalmente, surgiram cepas de *S. aureus* com resistência intermediária (heteroresistência) ou total resistência a glicopeptídeos (GRSA), que atualmente são o grande problema no tratamento clínicos de doenças causadas por esta bactéria (SOTOZONO, 2013).

Isolados clínicos de *S. aureus* são comumente encontrados em trabalhos de avaliação de atividade antimicrobiana por sua importância como causadora de infecções hospitalares e por possuir grande resistência aos antibióticos de uso clínico.

Na busca de novos antimicrobianos que sejam eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias multi-resistentes, deve-se considerar basicamente a descoberta de novos alvos e a potencialização da atividade de compostos com atividade antimicrobiana conhecida (MASUNARI & TAVARES, 2006; SCHAECHTER *et al.*, 2002)

c) BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

c.1) *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* está presente no trato intestinal de seres humanos e animais, é libertado para o ambiente através de material fecal e por isso é usado como um indicador de contaminação fecal (SAHOO *et al.*, 2012).

A *E. coli* possui um reservatório de genes de resistência a antibióticos, que permite a evolução de isolados clínicos em formas resistentes aos medicamentos convencionais (TORTORA *et al.*, 2010). O uso indiscriminado de antibióticos também é um dos fatores que contribui para esta resistência.

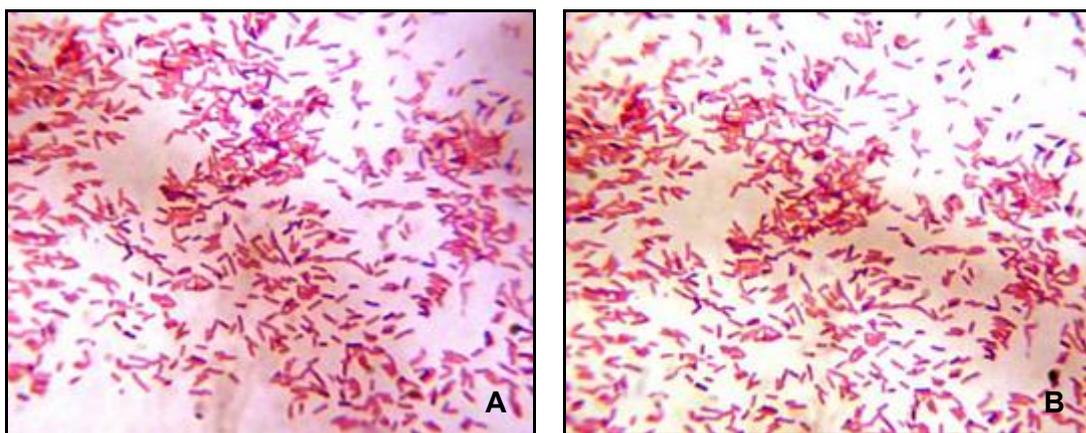


Figura 9. Ilustra fotomicrografias da cepa *Escherichia coli* utilizada neste trabalho.

Fonte: Próprio autor.

No ambiente natural, as bactérias resistentes ou que possuam genes de resistência, de origem animal ou ambiental, podem ser transferidas para o ser humano (TRAMUTA *et al.*, 2010, CANAL, 2010).

A *E. coli* é uma bactéria não-patogênica comensal que compõem a flora normal de humanos e diversos animais. No entanto, vários trabalhos citam a espécie como causadora de infecções do sistema gastrointestinal (PITOUT, 2012; BERTÃO & SARIDAKI, 2007; TRAMUTA *et al.*, 2010).

As bactérias da espécie *E. coli* podem causar infecções do trato urinário (ITU), infecções entéricas e infecções sistêmicas em humanos. As infecções sistêmicas incluem bacteremia, pneumonia nosocomial, colecistite, colangite, peritonite, celulite, osteomielite,

artrite infecciosa, sendo a principal causadora da meningite neonatal (PITOUT, 2012; SAHOO *et al.*, 2012).

c.2) *Pseudomonas fluorescens*

As *Pseudomonas fluorescens* são bactérias aeróbias obrigatórias, Gram-negativas, de oxidase positiva, com corpo celular em formato de haste com locomoção por flagelos, que habitam o solo, as plantas, e as superfícies de água, e crescimento ótimo a temperaturas entre 25-30 graus Celsius (SILBY *et al.*, 2009).

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* é a espécie fisiologicamente diversa das bactérias oportunistas (gama-proteobactérias), é abundante nas superfícies das raízes das plantas e das folhas, contribuindo grandemente para o acúmulo de matéria orgânica, e afetando positivamente a nutrição e saúde das plantas (YODER & KISAALITA, 2011).

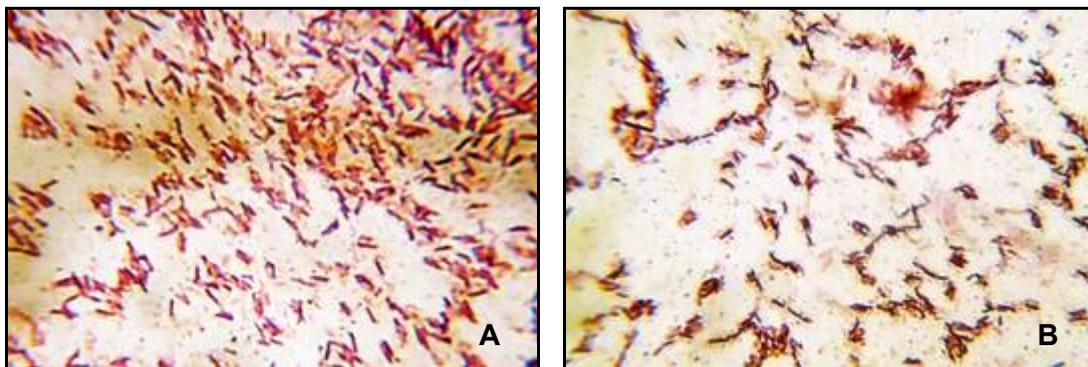


Figura 10. Ilustra fotomicrografias da cepa *P. fluorescens* utilizada neste trabalho.
Fonte: Próprio autor.

Os mecanismos envolvidos na relação simbiótica da *P. fluorescens* com as plantas ainda não foram amplamente estudado, porém se conhece a produção de hormônios de crescimento, fixação de Nitrogênio, a supressão de agentes patogênicos (principalmente fungos e oomicetos) prejudiciais a saúde das plantas, via competição e/ou efeitos alelopático (SPERANDIO *et al.*, 2012). De contrapartida as plantas fornecem nutrientes e abrigo a estes micro-organismos.

Devido à importância significativa da *Pseudomonas fluorescens* na agricultura, o sequenciamento do genoma de duas linhagens já foi concluído. E, estirpes puras de *P. fluorescens* estão disponíveis em institutos de investigação, os quais são mantidos sob condições controladas para o interesse de estudos científicos. A aplicação futura de *P.*

fluorescens é empregá-la para uso de controle biológico, com o objetivo de reduzir a pulverização de produtos químicos de controle baseados em pragas (GERSHMAN *et al.*, 2008).

Um dos subprodutos das células vegetais é o oxigênio ativo, tais como superóxidos que são tóxicos para os micróbios. A bactéria *P. fluorescens* possui a enzima superóxido dismutase que converte superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, o que contribui para a tolerância *Pseudomonas fluorescens* ao estresse oxidativo (SPERANDIO *et al.*, 2012).

Apesar de sua natureza comensal a *Pseudomonas fluorescens* pode apresentar fatores de virulência, e em alguns casos ser patogêna de vegetais. Em *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, não patogênicas, enzimas que degradam as paredes celulares de plantas e seus componentes, tais como a celulase e pectinase não estão presentes. No entanto, são capazes de quebrar alguns hidratos de carbono de origem vegetal, ácidos graxos, e óleos e podem hidrolisar as proteínas que causam a deterioração de leite, carne e peixe (SILBY *et al.*, 2009).

A *Pseudomonas fluorescens* possui em sua nomenclatura a "*fluorescens*" devido à capacidade de secretar o *pyoverdine*, um pigmento solúvel em água de cor verde fluorescente, que reage na presença de íon de Ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}). Esse mecanismo resposta pode ser utilizado como um biosensor de íons de Ferro em analitos e para a identificação bacteriana de indivíduos do gênero *Pseudomonas* (ONGENA *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; YODER & KISAALITA, 2011).

A *Pseudomonas fluorescens* está envolvida na alteração de alimentos refrigerados, pois consegue crescer a 4°C e hidrolisar lipídios e proteínas (lipase e protease) que causam acidificação do leite, e contaminação de produtos lácteos. Como exemplos de alterações ocorridas em alimentos referem-se as alterações de cor, sabor e aroma do leite e derivados. As *P. fluorescens* podem contaminar o sangue e derivados sob refrigeração, porém, como se multiplica com dificuldade a 37°C, raramente é patogênica (SILLANKORVA, 2004).

Embora normalmente apresentem baixo nível de virulência, em 1997 quatro pacientes do Hospital da Universidade Nacional de Taiwan desenvolveram bacteriemia a *Pseudomonas fluorescens*. Os pacientes foram tratados na sala de quimioterapia e começaram a apresentar sintomas como febre e calafrios. Oito culturas foram isoladas a

partir de cateteres e do sangue dos pacientes. Todos os isolados foram identificados como *Pseudomonas fluorescens* (HSUEH *et al.*, 1998).

O tratamento clínico de doenças causadas pela *P. fluorescens* tem sido relatado como um problema de saúde, a razão principal é sua resistência a anti-sépticos comuns e antibióticos utilizados em centros médicos. A invasão do corpo de um ser humano por *P. fluorescens* costuma ser assintomática, enquanto que em adultos com sistema imunológico enfraquecido e crianças causa infecção (GERSHMAN *et al.*, 2008).

A *P. fluorescens* é uma bactéria representante do gênero *Pseudomonas* no qual se inclui a *Pseudomonas aeruginosa*, uma cepa multirresistente a antibióticos, considerada como principal causadora de infecções em pacientes queimados (ROCHA *et al.*, 2011).

3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Uma grande variedade de métodos laboratoriais pode ser empregada para medir a suscetibilidade *in vitro* de bactérias a agentes antimicrobianos. Esses testes são também de grande importância em estudos sobre epidemiologia de resistência, e em investigações sobre novos agentes antimicrobianos (CLSI, 2006).

A concentração inibitória mínima (CIM) tem sido calculada por métodos *in vitro* e usada como parâmetro para avaliar a atividade antimicrobiana por vários autores. A CIM é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo em tubos de ensaio, placas de microtítulo em um tempo específico (CLSI, 2006),

Em alguns trabalhos, tanto o teste que estima a concentração bactericida mínima (CBM) quanto o teste de disco-difusão (halos de inibição) são denominados erroneamente como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Entretanto, o que o bioensaio da CBM estabelece é a menor concentração na qual a bactéria deixa de crescer em caldo (na avaliação da CIM), mas ao ser repicado em meio de cultura contido em placa de petri, e incubado durante certo tempo, não desenvolve colônias microbianas.

a) Bioensaios de difusão

Os bioensaios de difusão são métodos quantitativos nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada em um meio de cultura sólido, e inoculado com um micro-organismo. A partir da difusão, ocorre o aparecimento de um halo, onde não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição (OSTROSKY, 2008; FERRONATTO *et al.*, 2007).

Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados, incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e orifícios feitos no meio de cultura. A substância a ser testada é colocada em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão (ANVISA, 2010). Dentre eles, destaca-se o método do disco difusão ou difusão em ágar, que permite após a incubação, que os diâmetros dos halos de inibição serem medidos com o auxílio de régua milimetrada ou paquímetro (ALMEIDA, 2007; ADELMANN, 2005).

A atividade antimicrobiana pode ser significativamente influenciada pelo tipo e tamanho do disco ou orifício, pH, pela capacidade do composto em se difundir no meio de cultura, pelas propriedades do meio e pelo micro-organismo investigado (CLSI, 2006).

Nesse método, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar. Entretanto, o pequeno volume de amostra necessário e a possibilidade de testar cinco a seis compostos por placa, frente a um único micro-organismo, são vantagens do método de difusão em ágar (OSTROSKY *et al.*, 2008).

b) Bioensaios de diluição

Os bioensaios de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testados são adicionados aos meios de cultura líquidos ou sólidos adequados, previamente inoculados com o micro-organismo teste. Após a incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela comparação direta ou turbidimétrica da cultura teste com o controle negativo (meio de cultura inoculado sem adição de substância inibidora) ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (ALMEIDA, 2007).

O método de macrodiluição em tubo apresenta metodologia mais complexa, entretanto é o mais preciso. Esse método é recomendado principalmente para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CLSI M7-A7, 2006).

b) Bioensaios em meio de cultura

Os bioensaios em meio de cultura para avaliação de atividade antimicrobiana empregam alíquotas das soluções teste (diferentes concentrações do composto a ser testado) em placas de petri contendo meio de cultura, por plaqueamento pela técnica de superfície (*spread plate*) ou profundidade (*pour plate*) estimar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Outro bioensaio amplamente utilizado é o que determina a Concentração Bactericida Mínima (CBM), realizada em conjunto com a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A metodologia para avaliação da CBM se baseia na distribuição de inóculo das soluções teste da avaliação da CIM distribuídas em placas de petri com meio de cultura solidificado, e após um período de incubação se observa em que concentração da solução teste não houve o desenvolvimento de colônias microbianas (ARAÚJO *et al.*, 2009, CLSI M7-A7, 2006).

3.5 ANTIBIÓTICOS

Antibiótico uma substância natural ou sintética que destrói micro-organismos ou inibe o seu crescimento. Desse modo, interferem na biologia dos micro-organismos, destruindo o corpo celular, alterando o metabolismo ou inibindo a reprodução destes, o que auxilia o sistema imunológico a combater infecções (KAR, 2008).

Um grande grupo de autores divide a história dos antibióticos em eras, marcadas por três descobertas: a primeira, conhecida como era dos alcalóides, iniciada em 1619, diz respeito ao tratamento da malária com extrato de cinchona e de disenteria amebiana com raiz de ipecacuanha. Nesta época os extratos vegetais e seus derivados (fenól, alcalóides, quinino e a emetina) eram os únicos recursos terapêuticos disponíveis. A segunda, conhecida como dos compostos sintéticos, teve início em 1909, pela descoberta de Paul

Ehrlich de que doenças causadas por protozoários como o tripanossomas poderiam ser tratadas com compostos sintéticos, sendo aplicada no combate à sífilis até 1940, quando surgiu a penicilina. A terceira, conhecida como era moderna dos antibióticos, iniciada em 1936, com o uso clínico das sulfonilamidas no controle das infecções por estreptococos e pneumococos (TRIVEDI *et al.*, 2010).

A criação do termo “antibiótico” (contra a vida) é atribuída ao bioquímico ucraniano, naturalizado norte-americano, Selman Abraham Waksman, que definiu como sendo aqueles agentes que matavam as bactérias causadoras de doenças (TINER, 2004).

O primeiro antibiótico identificado pelo homem foi descoberto por acaso pelo médico escocês Alexander Fleming em 1928, enquanto trabalhava no hospital St. Mary’s em Londres com a bactéria *Staphylococcus aureus*. O bacteriologista após retornar de férias encontrou placas com cultura bacteriana contaminadas por fungos do gênero *Penicillium*, e que ao redor destes bolores havia sido formado um halo de inibição, sem crescimento bacteriano, estudos posteriores permitiram o isolamento de uma substância com alto poder antibacteriano, a penicilina. Em 1945, Fleming recebeu o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da penicilina (PEREIRA & PITA, 2005)

A medicina popular já utilizava bolores de fungos no tratamento de doenças a vários séculos, relatos históricos apontam o uso de coalhada de soja embolorada por chineses por volta de 500 a.C. no tratamento de furúnculos e outras infecções (DO CARMO, 2006).

No entanto, somente a partir dos estudos de Alexander Fleming que houve um avanço real na área de pesquisa de antimicrobianos, sendo produzidos antibióticos que possibilitaram a melhoria da qualidade de vida das pessoas que sofriam de tuberculose, pneumonia, meningite, sífilis, entre outras infecções (PEREIRA & PITA, 2005).

Em 1943, o Waksman encontrou um fungo da família dos *streptomyces* com interessantes propriedades antimicrobianas o qual extraiu um antibiótico e, em 1945, patenteou-o como estreptomicina. O antibiótico mostrou ser eficaz contra a tuberculose e outras bactérias gram-negativas, como as da pneumonia, meningite e tifo. O bioquímico recebeu o prêmio Nobel de medicina, em 1952, por sua descoberta da estreptomicina. A partir de suas muitas amostras de mofo e outros microorganismos, o pesquisador isolou diversos outros antibióticos, inclusive a neomicina (GILLESPIE & HAWKEY, 2006).

Atualmente, além dos antibióticos isolados de micro-organismos são produzidos compostos sintéticos com ação antimicrobiana, que podem ser utilizados de forma isolada ou em associação com outros medicamentos. As fluorquinolonas são uma importante classe de antimicrobianos sintéticos que tem se destacado no combate a diferentes tipos de bactérias, sendo os únicos agentes antimicrobianos sintéticos a competirem com antibióticos β -lactâmicos de uso clínico (*e.g.*: penicilinas e cefalosporinas). Devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, as fluorquinolonas têm sido utilizadas com sucesso no combate à tuberculose, estando sob investigação como fármacos de primeira escolha (SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

3.5.1 Mecanismos de ação dos antibióticos

Os cinco principais mecanismos de ação antimicrobiana são: 1) Inibição da síntese da parede celular (antibióticos anti-parietais), onde o antibiótico inibe a síntese do peptidoglicano da parede celular (bactericida); 2) Reação com a membrana celular (interação com os fosfolípidos) que causa o aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares (bactericida ou bacteriostático); 3) Inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese protéica de componentes estruturais (bactericida ou bacteriostático); 4) Destruição ou inativação funcional do material genético, atuando negativamente na síntese dos ácidos nucleicos, impedindo a reparação e replicação do DNA (bactericida); ou 5) Inibição do metabolismo celular por antibióticos antimetabólitos ou análogos metabólicos, conhecido como antagonismo competitivo (WALSH, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2007).

A membrana citoplasmática da bactéria é uma barreira permeável à passagem de pequenos íons como H^+ , K^+ , Na^+ e Ca^+ , além de serem responsáveis pela entrada e saída de diferentes compostos (CANAL, 2010). Essa permeabilidade da célula bacteriana é importante para várias funções celulares tais como, manutenção da energia no processo de transdução, transporte de solutos, regulação do metabolismo e controle da pressão (COX *et al.*, 2000 *apud* ALMEIDA, 2007).

Existe um consenso de que compostos aromáticos e fenólicos atuam na membrana citoplasmática, alteram sua estrutura e função, alteram o transporte ativo e coagulam o conteúdo celular (BURT, 2004 *apud* ALMEIDA, 2007).

Em pesquisa recente do mecanismo de ação de dois produtos fenólicos, o Eugenol e Timol, observou-se a fuga de potássio do corpo celular, que é a primeira indicação de danos na membrana em micro-organismos. Nesse estudo, as medições da fuga de potássio, após a exposição de cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* aos agentes antimicrobianos pesquisados, permitiram concluir que o sítio de ação do Timol e do Eugenol é a membrana citoplasmática (WALSH & FISCHBACH, 2010).

Os bioensaios de avaliação de atividade antimicrobiana são importantes para selecionar novos compostos com potencial inibição microbiana, para identificação do mecanismo de ação são necessários estudos específicos, como o citado anteriormente.

3.5.2 Antibióticos de uso clínico

Um antimicrobiano deve matar ou inibir o crescimento do agente infeccioso, sem danificar os tecidos do hospedeiro, a esse conceito dá-se o nome toxicidade seletiva. A dose tóxica é a concentração que efetivamente destrói ou elimina a patógeno. Juntos, estes dois valores são utilizados para formular o índice quimioterapêutico, que representa a concentração mais elevada (por quilograma de peso do corpo), do fármaco tolerado pelo hospedeiro, dividida pela concentração mais baixa (por quilograma peso corporal) da droga (POMMERVILLE, 2011).

Assim sendo, o melhor resultado deverá ser conseguido pela inibição de funções bacterianas que não estão presentes em células humanas, por exemplo, a inibição de peptidoglicano em células bacterianas pela penicilina (TALARO & CHESS, 2012).

A diferença entre a dose necessária para o tratamento e a que provoca danos ao paciente é normalmente grande, tal intervalo é conhecido como índice terapêutico. Os aminoglicosídeos são exceções, porque doses um pouco acima do nível terapêutico podem ser tóxicas. Embora todos os agentes antimicrobianos tenham potenciais efeitos indesejados, felizmente efeitos indesejados graves não são frequentes (ENGELKIRK & DUBEN-ENGELKIRK, 2011).

Os antibióticos utilizados no controle bacteriano podem ter efeito bacteriostático ou bactericida: São bacteriostáticos quando o agente antimicrobiano inibe o crescimento e/ou a reprodução das bactérias; e bactericidas quando o agente destrói (mata) as células bacterianas. Em sentido amplo, o termo microbicida é empregado para definir agentes que

inibem o crescimento de micro-organismos, e microbicida aqueles compostos que matam microbios (KAR, 2008).

Segundo Trivedi *et al.* (2010), a escolha do antibiótico para o tratamento de infecções depende:

a) Local da infecção - concentrações suficientes de antimicrobianos pode ser difícil de alcançar em alguns locais, como abscessos, osso, áreas com suprimento inadequado de sangue e alguns locais com baixo pH ação de certos antibióticos (por exemplo, aminoglicosídeos);

d) Organismo - a identificação do organismo patogênico prevê o histórico natural da infecção, permitindo a otimização do tratamento;

c) Padrão de suscetibilidade - *Streptococcus pyogenes* é invariavelmente suscetíveis a penicilina, mas outros organismos, tais como *Acinetobacter* e *Pseudomonas* são resistentes, assim os antibióticos devem ser escolhidas conforme o padrão de resistência dos potenciais agentes patogênicos;

d) Gravidade da infecção - infecções graves exigem que os antibióticos sejam administrados por via parenteral;

e) Histórico de alergia - uma resposta alérgica prévia pode limitar a escolha do antibiótico;

f) Efeitos colaterais - a probabilidade de efeitos indesejados pela administração de certo antimicrobiano - por exemplo, aminoglicosídeos que devem ser utilizados com precaução em pacientes com doença renal pré-existente

Existem diversos tipos de antibióticos de uso clínico, sendo citados a seguir os 12 grupos principais (GILLESPIE & BAMFORD, 2012; CLSI M7-A7, 2006):

a) Penicilinas: São beta-lactâmicos que atuam inibindo a formação de peptidoglicano em células bacterianas. Modificações nas penicilinas ter aumentado seu espectro de ação antibacteriana e melhorado a absorção do medicamento;

b) Cefalosporinas: as cefalosporinas são intimamente relacionadas com as penicilinas, pois interferem na síntese da parede celular de peptidoglicano via inibição de enzimas envolvidas no processo de transpeptidação. Eles são ativos contra bactérias Gram-positivos, e algumas cepas Gram-negativas, incluindo as *Pseudomonas*;

c) Monobactams: Os Monobactams estão relacionados com penicilinas e cefalosporinas. Eles têm um amplo espectro de atividade, incluindo bactérias anaeróbias. Por exemplo, o Imipenem e Meropenem têm apresentam efeitos antipseudomonas quando

administrados por via intravenosa;

d) Aminoglicosídeos: inibem da tradução do mRNA em proteínas bacterianas, constituintes do corpo celular;

e) Glicopeptídeos: Tais como a Vancomicina e Teicoplanina, inibem peptidoglicano de reticulação em bactérias Gram-positivas, e raramente produzem resistência, com exceção de enterococos (enterococos resistentes a glicopéptidos - GRE), e em alguns *Staphylococcus aureus*;

f) Daptomicina: é um novo agente com uma semi-vida longa, muito ativo contra micro-organismos Gram-positivos. Liga-se à membrana celular bacteriana levando à rápida despolarização do potencial de membrana, o que determina a inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, além do extravasamento de conteúdo citoplasmático e morte bacteriana;

g) Quinolonas: inibem a DNA-girase bacteriana. As quinolonas primitivas não atingiam níveis elevados do tecido e foram utilizadas apenas para infecções do trato urinário. A modificação com flúor (fluoroquinolonas) tornou-as ativas contra bactérias Gram-negativas, incluindo patógenos *Chlamydia*. Ciprofloxacina tem atividade contra *Pseudomonas spp.* Quinolonas são bem absorvidas por via oral, são largamente distribuídos e penetram nas células. Por exemplo, a moxifloxacina que possuem atividade inibitória contra bactérias patogênica Gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*;

h) Macrólídeos: Os macrólídeos (eritromicina, azitromicina e claritromicina) se ligam ao ribossoma 50S, interferindo na síntese protéica, eles são ativos contra cocos Gram-positivos, muitos aeróbios como *Mycoplasma* e *Chlamydia* (mas não Bacteróides);

i) Estreptograminas: São macromoléculas semi-sintéticas da mesma família dos macrólídeos e lincosaminas que, embora não possuam relação química, apresentam algumas propriedades semelhantes, como mecanismo de ação, espectro antimicrobiano, características farmacocinéticas e farmacodinâmicas e indicações clínicas. A quinupristina e dalfopristina sintetizadas a partir da pristinamicina IA e IIB, respectivamente, utilizados em conjunto inibem a formação da ligação peptídica, o que resulta na libertação de cadeias polipeptídicas incompletas. São ativas contra uma ampla gama de patógenos Gram-positivos e alguns Gram-Negativos, tais como *Moraxella*, *Legionella*, *Mycoplasma* e *Neisseria meningitidis*. É utilizado principalmente para o tratamento de bactérias gram-positivas resistentes a infecções (Por exemplo, GRE e glicopeptídeos intermediário *S.*

aureus [GISA]);

j) Oxazolidinonas: As oxazolidinonas (por exemplo, linezolida) inibem a síntese de proteínas na Subunidade 50S ribossomal. Elas são mais ativas contra bactérias Gram-positivas e são utilizados principalmente no tratamento de resistência infecções causadas por bactérias gram-positivas;

k) Metronidazol: A principal característica do metronidazol é sua ampla atividade contra os organismos anaeróbicos. Atua por meio de um receptor de elétrons, formando metabólitos tóxicos que danificam o DNA bacteriano; também são ativos contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Giardia*, *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*;

l) Tetraciclinas: bloqueiam a ligação do tRNA ao mRNA causando a inibição da síntese protéica. Eles são ativos contra muitas bactérias Gram-positivas e alguns patógenos Gram-negativos, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia* e *treponemas*, *Plasmodium* e *Entamoeba histolytica*;

m) Sulfonamidas e trimetoprim: Sulfonamidas e trimetoprim atuam inibindo a síntese de tetraidrofolato. Eles são raramente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, mas tem um papel importante no controle de *Pneumocystis jiroveci* e infecções por protozoários incluindo a malária.

3.5.3 Resistência a antibióticos

Anualmente, milhões de pessoas morrem em decorrência de infecções causadas por micro-organismos resistentes aos antibióticos atuais (WHO, 2012). A falha na terapia antimicrobiana causa o aumento da morbidade e mortalidade, e elevados custos no tratamento de infecções (Garcia, 2011).

Quando um antibiótico é descoberto e introduzido no mercado, sua utilidade clínica começa a diminuir até um ponto em que há um aumento na restrição de seu uso pelo surgimento de cepas resistentes (ROCHA *et al.*, 2011). Sendo uma das grandes causas de aquisição de resistência o uso indiscriminado de novos antibióticos em grandes populações (SILVEIRA *et al.* 2006).

As bactérias comensais resistentes a antimicrobianos produzem reservatórios de resistência que podem ser transmitidos para bactérias patogênicas (CALIMAN *et al.*, 2012). O surgimento da resistência em bactérias patogênicas pode reduzir a eficácia de

terapias antimicrobianas com antibióticos de amplo espectro de ação (GILLESPIE & HAWKEY, 2006), o que em alguns casos implica no uso de antibióticos seletivos, que em alguns casos podem ser mais tóxicos ao paciente e possuem custos mais elevados de produção.

A resistência a antibióticos é um problema global, devendo-se dar atenção aos genes que conferem esta resistência às bactérias. Os genes de resistência a antimicrobianos estão localizados em reservatórios conhecidos como plasmídeos, *transposons* e *integrans*, que permitem a transferência gênica entre diferentes gêneros e espécies de bactérias, tornando-as resistentes (CANAL, 2010). Os genes que conferem resistência a várias classes de antimicrobianos e aos desinfetantes são encontrados na forma de cassetes gênicos, estes, por sua vez, constituem um *pool* de genes (PARTRIDGE *et al.*, 2009).

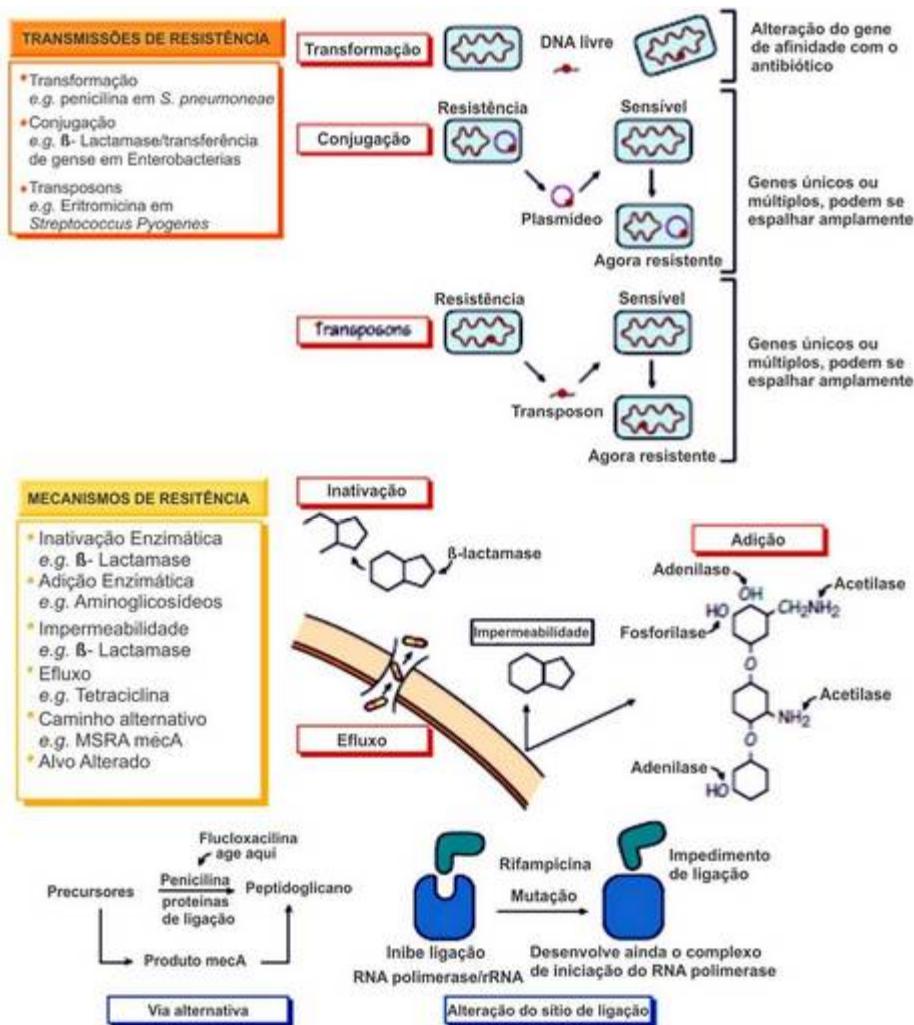


Figura 11. Mecanismos de resistência a antibióticos (Fonte: adaptado de Gillespie & Bamford (2012) p.19).

São conhecidos pelo menos três mecanismos de resistência a antimicrobianos: inativação, efluxo e adição. Na inativação a substância antimicrobiana é degradada em outra inerte a célula bacteriana; no efluxo os antibióticos são expulsos do corpo celular (possuem uma proteína na membrana interna que bombeia o antimicrobiano); e algumas bactérias possuem enzimas que adicionam um composto químico de inativação de grupos de antibióticos, para inibir suas atividades; existem ainda bactérias com impermeabilidade natural no envelope celular, o que não permite a alguns antimicrobianos alcançar o sítio de reação, ou que podem promover a alteração do sítio de ligação dos antibióticos (GILLESPIE & BAMFORD, 2012).

O desenvolvimento de novos antimicrobianos possibilita um resguardo clínico contra bactérias multirresistentes, principalmente no ambiente hospitalar. Contudo, em tais estudos deve se considerar a natureza química e bioquímica da substância testada, além de sua interação com o organismo patogênico, a fim de não induzir a resistência microbiana.

3.6 POLIFENÓIS

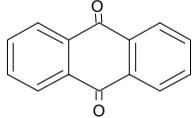
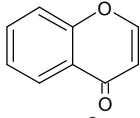
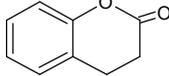
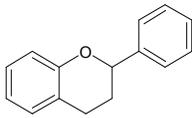
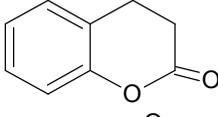
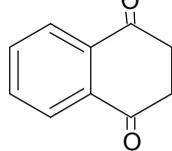
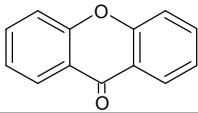
A palavra polifenol significa "*muitos fenóis*" [Do grego *poli* = muitos + fenol = composto químico formado por um anel aromático ligado um grupo hidroxila (-OH)]. Os polifenóis ou compostos fenólicos constituem um grupo heterogêneo, composto de várias classes de substâncias com propriedade antioxidante. (OLIVEIRA, 2011; BASLI, 2012).

Essas substâncias estão presentes em vários alimentos e bebidas, mas em especial na uva e em seus derivados. O suco de uva possui um elevado teor de açúcar, principalmente na forma de glicose e frutose, além de conter nutrientes essenciais, micronutrientes, vitaminas e uma grande quantidade e variedade de polifenóis (VARGAS *et al.*, 2008; BASLI, 2012).

Os polifenóis já foram amplamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde, como atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e formação de radicais livres, bem como na proteção contra danos ao DNA das células, com propriedades neuroprotetora, antiinflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica, antitrombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora (AFAQ & KATIYAR, 2011; CIMINO *et al.*, 2012; EFRAIM *et al.*, 2011).

A estrutura básica de alguns compostos fenólicos está representada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos principais dos compostos fenólicos.

Classe	Fórmula Estrutural	Estrutura Química
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Cromonas	C_6-C_3	
Cumarinas	C_6-C_3	
Flavonóides	$C_6-C_3-C_6$	
Isocumarinas	C_6-C_3	
Naftoquinonas	C_6-C_4	
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	

3.6.1 Flavonóides

Os flavonóides foram descobertos em 1930, pelo ganhador do prêmio Nobel Szent-Gyrgy, que extraiu da casca do limão a citrina, substância com a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares (SANTOS, 2009).

Inicialmente, os flavonóides eram denominados como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C₂, visto que algumas das substâncias pertencentes a esta classe apresentam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém, dada a não confirmação destas substâncias como vitaminas, esta classificação foi abandonada em 1950 (VAUZOUR, 2012).

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos nas plantas, abrangendo cerca de metade dos 8 mil compostos fenólicos que ocorrem na natureza. Consoante as variações no anel heterocíclico, também eles podem ser agrupados em diversas subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas, flavanonóis e antocianidinas (GRASSI *et al.*, 2010).

Essa classe de polifenóis apresenta compostos com 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (C₆-O₃-O₂-C₆). Nos compostos tricíclicos, as unidades são denominadas núcleos A, B, C e os átomos de carbono recebem numeração com números ordinários nos núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de linha(') no núcleo N (PIMPÃO, 2009).

As substituições nos anéis A e B dão origem a diferentes compostos dentro de cada classe. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação. Reações como a glicosilação tornam os flavonóides mais solúveis em água e permitem o seu armazenamento no vacúolo celular, onde são geralmente encontrados nas plantas (PIMPÃO, 2009;).

Os flavonóis são compostos amplamente distribuídos pelas plantas superiores, onde ocorrem normalmente na forma de glicosídeos, representam um constituinte comum da dieta humana, sendo encontrados em chás, vinhos, própolis, mel, em frutas, legumes, nozes, sementes, caules e flores de plantas, e representam (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Os flavonóides Kaempferol e Quercetina geralmente são encontrados em frutos de rosáceas como morangos, framboesas e amoras, que tem demonstrado em diversos estudos um alto potencial antiinflamatório e antioxidante (KIM, 2010). Estudos relatam o Kaempferol como inibidor da proliferação celular e indutor de apoptose em células do câncer pancreático (ZHANG, 2008).

Nos Estados Unidos, a ingestão dietética diária de flavonóides mistos é estimada estar na faixa de 500-1000 mg, mas este valor pode ser chegar a vários gramas em pessoas que completam suas dietas com alimentos preparações à base de plantas contendo flavonóides (CUSHNIE & LAMB, 2005).

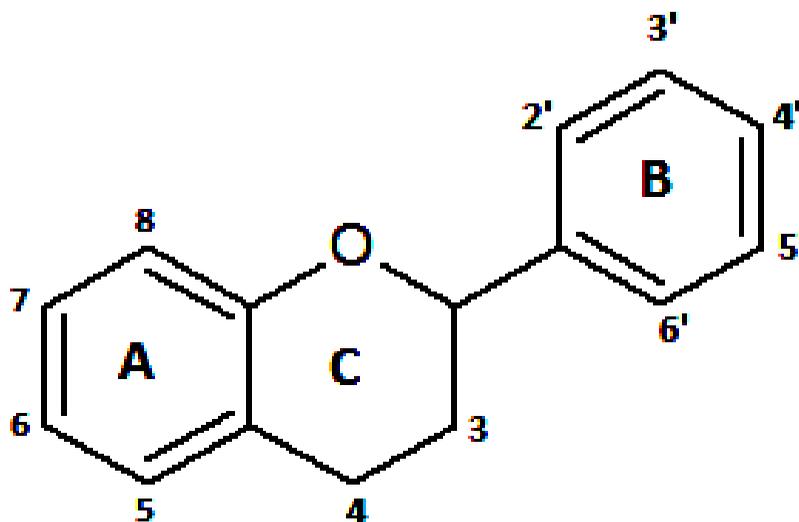


Figura 12. Estrutura básica dos flavonóides, dois anéis fenil (A e B) ligados através de um anel pirano (C).

Na natureza são encontradas diversas classes de flavonóides, as principais estruturas básicas destes compostos são ilustradas na Figura 13:

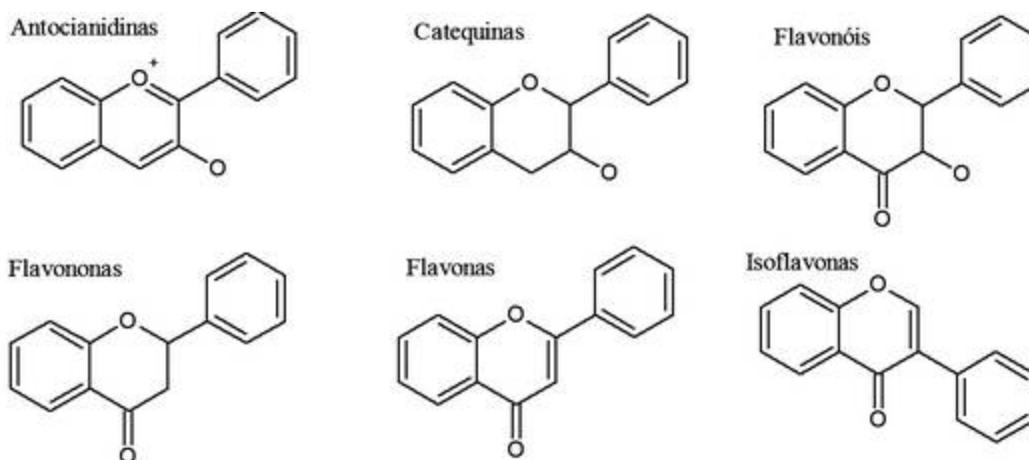


Figura 13. Estruturas básicas de algumas classes de flavonóides.

3.6.2 Efeitos Biológicos dos Flavonóides

Os flavonóides possuem diversas funções biológicas, tais como proteção das plantas a raio ultravioleta; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de

animais para polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (OLIVEIRA, 2011). Além de diversos efeitos biológicos importantes, como: antitumoral, antiulcerogênica, anti-hemorragicas, tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e cofator de vitamina C, antiinflamatório, e antioxidante (PEDRIALI, 2005).

Como antioxidantes, os flavonóides podem proteger contra dano oxidativo dos constituintes celulares e, portanto, limitar o risco de várias doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo (GRASSI *et al.*, 2010).

a) Atividade antioxidante

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. A atividade antioxidante dos flavonóides é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

As flavonas e catequinas parecem ser os flavonóides mais poderosos para a proteção do organismo contra espécies reativas de oxigênio (ROS). As células e tecidos corporais são continuamente ameaçados pelo dano causado por radicais livres e ROS que são produzidos durante o metabolismo normal de oxigênio ou são induzidas por via exógena (TAPAS *et al.*, 2008).

Os mecanismos endógenos de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas) podem ser auxiliadas favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta. As matérias-primas in natura disponíveis como: frutas, vegetais em geral e condimentos contém numerosos fitoquímicos além dos compostos fenólicos como, por exemplo, compostos nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico e tocoferóis. Muitos destes fitoquímicos apresentam significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (YILDRIM, 2002; KIM *et al.*, 2010).

O potencial de atividade antioxidante dos flavonóides, que atuam na eliminação de radicais livres, tem sido relatado na seguinte ordem: Miracetina > Quercetina > Rametina > Morin > Diosmetina > Naringenina > Apigenina > Catequina > 5,7-di-hidroxi-3',4',5'-Trimetoxiflavona > Robinin > Kaempferol > Flavonol (TAPAS *et al.*, 2008).

b) Ação antitumoral

O câncer é considerado uma das maiores causas de morte no mundo e é definido como uma doença genômica, surgindo como consequência de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais, as quais sofrem transformações até se tornarem malignas (DANTAS *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que com o aumento da ingestão de frutas e vegetais experimenta uma redução de 50% no risco de cânceres e trato digestivo respiratórias. Assim, o consumo de genisteína pode prevenir o desenvolvimento de tumores e promover a formação de novos vasos sanguíneos, evitando assim, a chegada de nutrientes e oxigênio para células novos tumores (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

A genisteína também regular as reações do estrogênio e seus receptores, diminuindo, desse modo, o risco de câncer de mama. De fato, tem sido mostraram que os flavonóides podem inibir monooxigenase dependentes do citocromo P-450, indicando potencial na inativação de carcinógenos; também relatam que chalconas e flavanonas são indutores das quinonas redutases e podem prevenir hepatomas (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

O câncer pode ser considerado uma doença genética uma vez que é desencadeado por alterações no DNA da célula. No entanto, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, o câncer não é necessariamente uma doença hereditária. Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais (BEHLING *et al.*, 2004).

No caso do câncer hereditário, as mutações germinativas estão diretamente associadas à predisposição familiar para o desenvolvimento de tumores e, nesses casos específicos, o câncer pode ser considerado uma doença genética e hereditária (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Estudos epidemiológicos têm apontado menor incidência de câncer de colo, de endométrio e de ovário em países do oriente, decorrente da dieta rica em alimentos contendo altas concentrações de flavonóides (ZHANG *et. al.*, 2008).

Estudos experimentais propõem a divisão da carcinogênese em três estágios: iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação é caracterizado por alteração do material genético, que pode ou não resultar em mutação. O estágio de promoção, caracterizado pela conversão da célula iniciada em pré-maligna, é um processo longo e reversível, sendo este um ponto estratégico para ação de agentes quimiopreventivos. A progressão da célula pré-maligna para célula maligna ocorre em consequência de dano adicional ao cromossomo. O resultado é a divisão celular incontrolada, resultante do aumento da autonomia celular. A atuação dos flavonóides, em especial as antocianinas, nessas diversas fases pode estar relacionada à sua ação antioxidante, ao aumento da resposta imune ou ainda à modulação da expressão do gene supressor tumoral. Entretanto, os estágios da carcinogênese em que os flavonóides podem agir ainda não estão estabelecidos (VOLP *et al.*, 2007)

Os flavonóides representam um grande grupo de fitoquímicos que são conhecidos por exercerem uma atividade antitumoral. Assim, estudos investigativos têm demonstrado que os possíveis mecanismos de inibição da carcinogênese por polifenóis estejam relacionados com o aumento da expressão de superóxido dismutase, inibição da ciclooxigenase e lipoxigenase, indução de apoptose e repressão do ciclo celular, como demonstrado em células carcinogênicas humanas *in vitro* (MACHADO, 2006).

c) Atividade antiinflamatória

O processo inflamatório encontrado em diversas patologias é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou injúria tecidual, e compreende basicamente dois mecanismos de defesa: a) resposta inespecífica (resposta inata), responsável pelas características da região inflamada (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função); e b) uma resposta imunológica, na qual há produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor (COUTINHO *et. al.* 2009).

Estudos dos efeitos dos flavonóides sobre os processos inflamatórios demonstraram que os integrantes deste grupo funcional apresentam a capacidade de inibir a ativação de uma série de enzimas. Desse modo, deixam de ativar as Isoformas de Indução de Óxido Nítrico (iNOS) e a ciclo-oxigenase (COX-2) e assim não são produzidas as substâncias envolvidas no processo inflamatório, tais como Prostaglandinas e Óxido Nítrico (GONZÁLEZ-GALLEGO *et al.*, 2007).

A exposição das células aos patógenos e a lesão tecidual resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos, responsáveis pelo processo inflamatório. Dentre os mediadores da inflamação, encontram-se histamina, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (COUTINHO *et al.* 2009).

d) Atividade hormonal

São vários os fatores que contribuem para o desenvolvimento da osteoporose, entre eles se destacam a idade, o sexo e a raça, que são principais determinantes a perda de massa óssea e ao risco de fraturas. Estudos relatam que fatores genéticos afetam as variações na massa óssea em diferentes grupos étnicos e raciais. Indivíduos da raça negra possuem maior pico de massa óssea e, portanto, são menos predispostos a sofrerem de osteoporose que brancos e asiáticos (ARAGÃO, 2004).

Quanto maior a sobrevivência do indivíduo, maior é o risco de desenvolver osteoporose. Na menopausa, que se inicia entre 45 e 55 anos de idade, é evento singular que ocorre devido à deficiência estrogênica, trazendo uma série de transformações ao organismo feminino. As mulheres passam a enfrentar perdas ósseas, sintomas vasomotores, alterações cardiovasculares, distúrbios sexuais e psicológicos, alterações urinárias, genitais e dermatológicas (ARAGÃO, 2004).

Além do mais, estudos têm demonstrado que a suplementação alimentar por isoflavonas de mulheres na pré-menopausa ocasiona riscos mínimos à saúde. Notou-se que a preparação isoflavona de soja, utilizada no estudo, afetou positivamente o funcionamento da tireóide, e controle da produção de o estrógenos, tanto por via endógena ou exógena, e que não ocorreu aumento das concentrações de globulina, o que normalmente resultaria na

compensação por produção de tiroxina (STEINBERG *et al.*, 2011), que pode resultar na necessidade de reposição hormonal.

Um estudo da prevenção de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, que incluiu na dieta isoflavonas da soja, observou um modesto aumento na densidade da mama das pacientes em comparação ao controle. Tais resultados indicaram a existência de atividade hormonal de flavonóides em mulheres que fizeram uso de isoflavona na pré-menopausa (HOOPER *et al.*, 2010). Um estudo anterior já havia revelado em mulheres uma atividade hormonal moderada produzida por isoflavonas em gonadotrofinas e estradiol (HOOPER *et al.*, 2009).

e) Atividade antiviral

Diversos estudos têm revelado a atividade antiviral nos flavonóides existentes na própolis. As frações de própolis afetam a replicação do vírus tais como vírus *Vaccinia* (varíola das vacas) e a responsável pela doença de Newcastle (peste aviária). Os flavonóides Crisina e Kaempferol têm demonstrado boa atividade na inibição de replicações de vários vírus de herpes, adenovírus, rotavírus (ADELMANN *et al.*, 2005).

Há relatos de flavonóides como crisina, acacetina, e apigenina são capazes de inibir a ativação de HIV-1 em modelos de infecção latente, por meio de um mecanismo que, provavelmente, inclui a inibição da transcrição viral (GEKKER *et al.*, 2005).

Os flavonóides Quercetina e Rutina, encontrados no mel e na própolis demonstraram atividade antiviral contra os vírus HSV (*herpes simplex virus*), o vírus Sincicial respiratório, poliovírus e vírus Sindbis (SINV), sendo proposto como mecanismo de ação a inibição da polimerase virais, do ácido nucléico e proteínas do capsídeo (VIUDA-MARTOS, 2008).

f) Atividade antimicrobiana

Diversos estudos têm avaliado a atividade antimicrobiana de flavonóides em associação com antibióticos de uso clínico. Os resultados têm demonstrado um aumento potencial antibacteriano destes antibióticos, como é o caso da amoxicilina, clavulina e ampicilina (EGERT & RIMBACH, 2011).

Estudos têm demonstrado a existencia de atividade antimicrobiana em flavonóides comercias, tais como: Apigenina, Galangina, Pinocebrina, Ponciretina, Genkwanina, Naringina, Naringenina, Galato Epigalocatequina e seus derivados, Luteolina, Luteolina, Quercetina e seus derivados, Kaempferol e seus derivados, Isoflavonas; Flavanonas; e Calconas (AKHLAGHI & BANDY, 2012).

Nos últimos anos, diversos extratos de plantas com um histórico de uso na medicina popular estão sendo selecionados para avaliação de atividade antibacteriana por muitos grupos de pesquisa. Os flavonoides contidos em extratos das espécies vegetais *L. vetulina*, *L. acida* e *L. microcarpa* foram relatados para possuir atividade antibacteriana (OUATTARA *et al.*, 2011).

A própolis tem sido analisada desde 1980, e amostras coletadas tem demonstrado altas concentrações de flavonoides com atividade antimicrobiana. Existem duas principais teorias propostas para explicar esta capacidade: uma é devido à ação do hidrogênio contido no peróxido de mel, que é produzido pela oxidação da glicose na presença de luz e de calor, e a outra hipótese é de que esta atividade ocorre sem o peróxido, e que independente da luz e do calor para inibir o crescimento microbiano. Esta atividade sem peróxido, que permanece inalterado até mesmo durante longos períodos de armazenamento, depende da flor que foi a fonte de néctar usada e, portanto nem todos os méis possuem esta atividade (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008).

Muitos grupos de pesquisa ter ido um pouco mais longe e ou isolada e identificada a estrutura de flavonoides que possuem atividade antibacteriana, ou quantificar a actividade de flavonóides disponíveis comercialmente. Exemplos de tais flavonóides são apigenina, galangina, pinocebrina, ponciretina, genkwanina, sophoraflavanone G e dos seus derivados, naringina e naringenina, epigalocatequina galato e seus derivados, luteolina e luteolina 7-glucósido, a quercetina, o 3-O-e metilquercetina vários glicosídeos de quercetina e kaempferol e seus derivados (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Diversos estudos têm identificado atividade antimicrobiana em calconas e flavonas naturais e com substitutos sintéticos. Combinações de flavonas (rutina, quercetina e morin) têm demonstrado maior atividade sinérgica contra micro-organismos Gram-negativos como a *S. aureus* (ALVAREZ *et al.*, 2008).

Por exemplo, Wang e colaboradores têm complexado a 5-hidroxi-7,4-Dimethoxyflavone com uma série de metais de transição e mostraram que este processo aumenta a actividade antibacteriana. Outro grupo relatou aumento antibacteriano atividade de 3-metilenoflavanonas quando o anel B contido substituintes bromo ou cloro (CUSHNIE & LAMB, 2005).

g) Toxicidade dos flavonóides

Estudos de toxidade têm demonstrado que os flavonóides possuem baixa toxicidade, e a sua combinação com antibióticos convencionais pode ser uma alternativa ao tratamento de bactérias resistentes. Em diversos trabalhos é relatado a dose letal 50 (DL₅₀) dos flavonóides, na sua forma aglicona, como sendo igual a 2 g/kg do peso do animal, quando administrados por via intravenosa em ratos (DUTHIE & ORRICE, 2012).

Devido à baixa solubilidade dos flavonóides agliconas em água, o curto tempo de residência dos flavonóides no intestino, e ao baixo coeficiente de absorção, não é possível para os seres humanos sofrer efeitos tóxicos agudos no consumo de flavonóides, com exceção de uma rara ocorrência de alergia (DUTHIE & ORRICE, 2012; MEOTTI, 2006).

Estudos toxicológicos preliminares demonstraram que a administração constante de doses extremamente altas de flavonóides causa alterações morfológicas na membrana dos hepatócitos, com necrose celular e morte do animal. Além disso, foi observado um efeito mutagênico por alguns flavonóides. A atividade tóxica e mutagênica dos flavonóides é atribuída, principalmente, à formação de epóxidos durante sua biotransformação. Porém, em geral, as mutações são reparadas antes de conduzirem a um distúrbio. Desta forma, o risco de consequências patológicas ocorridas pela mutação através do consumo de flavonóides é considerado baixo (HAVSTEEM, 2002).

Outro estudo toxicológico avaliou os efeitos da exposição de ratos a altas concentrações de flavonóides em ratos, durante três semanas, o que resultou em alterações morfológicas na estrutura da membrana dos hepatócitos, que levam à necrose das células e, eventualmente, à morte do animal. Assim, embora os flavonóides sejam normalmente absorvidos pelo organismo humano e provavelmente constituam uma das drogas conhecidas mais seguras, em concentrações elevadas, podem se tornar substâncias tóxicas (MEOTTI, 2006).

3.6.3 Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona), é o flavonóide de maior ocorrência na dieta humana, sendo encontrada em frutas, verduras, vinho, suco de frutas, chás, etc. Este flavonóide pode ser obtido em plantas a partir de glicosídeos (açúcares e derivados) por meio de extração, seguida de hidrólise para libertar a aglicona e subsequente purificação (HARWOOD *et al.*, 2007).

Em decorrência da prevalência de Quercetina na dieta humana e suas potenciais aplicações clínicas e nutricionais, este flavonóide foi avaliado extensivamente durante os últimos anos, em uma variedade de estudos de toxicidade, tais como: genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, toxicidade aguda, crônica e subcrônica (OKAMOTO, 2005).

A estrutura química da Quercetina é essencial também para sua atividade, ela participa de reações formando complexos com metais, desta forma, afetando o transporte, reatividade, biodisponibilidade e toxicidade dos íons metálicos. No seu esqueleto químico há três possíveis sítios de quelação de metais que competem entre si, e podem ser classificados da seguinte forma: catecol > α -hidroxicarbonila > β -hidroxicarbonila. A quercetina tem vários elementos estruturais característicos de funções antioxidantes: (1) as duas hidroxilas em posição orto no anel B - grupo catecol, (2) a presença da dupla ligação entre o C2 e C3 e (3) as hidroxilas substituídas em C3 e C4 em proximidade com a carbonila em C4 (AMSTALDEN, 2011).

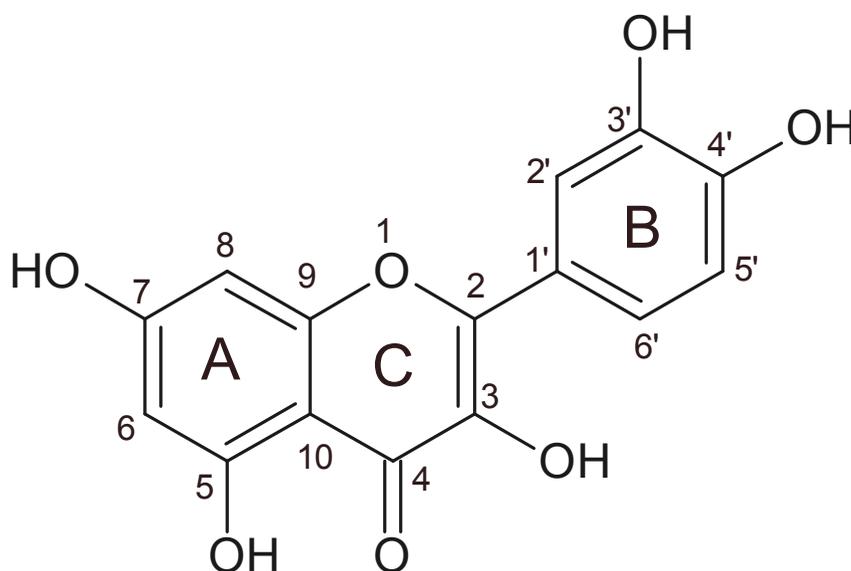


Figura 14. Estrutura química do flavonóide Quercetina.

Um estudo de reparação do DNA comprovou a capacidade da quercetina em reduzir danos em células Caco-2 (adenocarcinoma coloretal) quando expostas a doses de 1 $\mu\text{mol/L}$ do composto. Entretanto, observou-se o efeito inverso quando aplicadas doses de 100 $\mu\text{mol/L}$. Neste mesmo trabalho, os autores observaram a indução da produção de 8-oxiguanina DNA glicosilase (hOGG1), uma enzima envolvida no reparo do DNA, o que sugere que o flavonóide, em baixas concentrações, pode prevenir o dano e aumentar a reparação do DNA. Também, notou-se que altas doses (acima de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) a Quercetina pode apresentar efeitos pró-oxidante e citotóxico, que são características promissoras na terapia tumoral, uma vez que os efeitos pró-oxidantes têm uma tendência de iniciar a apoptose nas células (morte programada), contribuindo no tratamento do câncer (MIN & EBELER, 2009).

3.7 COMPLEXOS METÁLICOS DE INTERESSE BIOLÓGICO

De acordo com sua atividade biológica, os metais podem ser divididos em dois grupos: a) metais essenciais (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, e W), representados por aqueles que apresentam funções biológicas conhecidas e específicas; e b) metais não essenciais (Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Ti, Pb, Bi e Al), sem funções metabólicas conhecidas (BEVERIDGE *et al.*, 1996).

Os metais Ca, P, Na, K, Cl e Mg são conhecidos como macronutrientes, pois por serem elementos indispensáveis a síntese do meio intracelular devem ser ingeridos em quantidades maiores de 100 mg por dia; enquanto os elementos Cr, Co, Cu, I, Ferro, Mo, Mg, Se, Si, Zn e F os valores exigidos são menores de 100 mg/dia, conhecidos como micronutrientes ou oligoelementos (MURRAY *et al.*, 2009).

Os metais essenciais desempenham diversos papéis no metabolismo dos seres vivos. Os elementos de transição ligam-se firmemente a macromoléculas, particularmente proteínas, e estão envolvidos em processos como catálise enzimática de hidrólise ou reações de oxidação e/ou redução. Outras funções conhecidas são os mecanismos de controle de reações, a estabilização de estruturas, a neutralização de cargas e o controle de pressão osmótica (MURRAY *et al.*, 2009).

O estudo de complexos metálicos para uso na quimioterapia teve grande impulso depois da descoberta das propriedades antitumorais do *cis*[(diaminodiclora)platina(II)],

$cis[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, comumente chamado “cisplatina”, e que é um dos compostos mais utilizados no tratamento do câncer hoje em dia (FONTES *et al.*, 2005).

Esse complexo foi primeiramente descrito por Reiset em 1844, entretanto, as propriedades antitumorais de compostos contendo platina só foram descobertas mais de um século após. Em 1969, o físico Barnet Rosenberg estava trabalhando na Universidade do Estado de Michigan, nos Estados Unidos, procurava estudar os efeitos do campo elétrico em uma cultura de bactérias *Escherichia coli* (FONTES *et al.*, 2005).

Rosenberg observou que a divisão celular era inibida, e durante o processo, as células de *E. coli*, como não podiam se dividir, cresciam formando filamentos alongados. partir desta investigação, Rosenberg afirmou que tais complexos poderiam agir de maneira semelhante para inibir a divisão celular em células tumorais. Desde então, complexos de platina têm sido temática relevante ao longo da história da Química Bioinorgânica (LOPES, 2009).

Atualmente, a cisplatina (CDDP) é um dos fármacos mais efetivos e potentes na terapia antitumoral, apresentando espectro de ação contra vários tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, cabeça e pescoço, carcinoma de ovário (GIUBERTI, 2007).

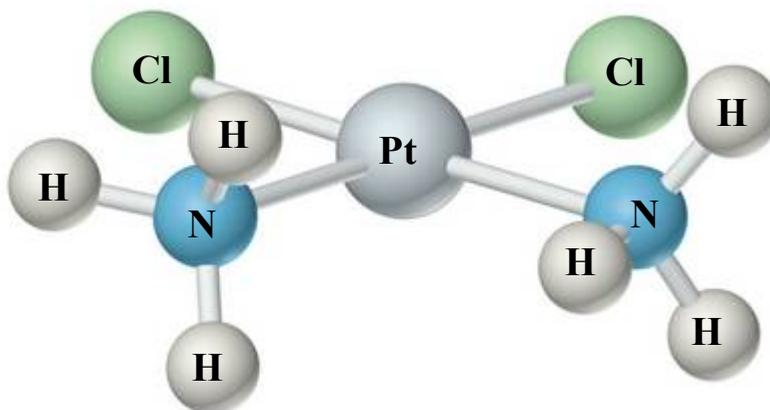


Figura 15 - Estrutura tridimensional da cisplatina.

Um estudo demonstrou que a presença do flavonóide floranol em um complexo metálico com íons Cu(II) contribuiu para impedir a formação de radicais livres, comuns na reação de oxi-redução de LDL pelo metal Cobre (BOTELHO *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm revelado um aumento significativo de atividades biológicas de flavonóides após complexação. A coordenação com íons metálicos pode potencializar

as atividades: antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antiviral, etc (GAMBINO et al., 2011; BASTOS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009; MOHAMMADI *et al.*, 2005; HAVSTEEN, 2002).

Uma nova estratégia de produção de fármacos propõe à coordenação de íons metálicos a antibióticos, com três frentes de estudo, a primeira tem por objetivo criar um mecanismo de reversão da resistência microbiana, e, por conseguinte promover o desenvolvimento de novas drogas com um mecanismo de ação desconhecido pelas bactérias patogênicas, enquanto a terceira ao mesmo tempo tentar reduza a toxicidade do íon metálico na forma de complexo (ROCHA *at al.*, 2011).

3.7.1 Gálio

O principal interesse clínico deriva da observação que propriedades metabólicas do gálio são similares aquelas do Fe(III), como raio iônico, eletronegatividade, afinidade eletrônica, geometria de coordenação e afinidade pelos mesmos tipos de ligantes, pois ambos mostram quase a mesma capacidade de ligação com quelatos e proteínas. Os mais importantes carreadores do ferro, transferrina e lactoferrina, não distinguem o gálio desse elemento e, possivelmente, uma parte de gálio no plasma sanguíneo esteja na forma de complexos com estas proteínas (MELNIKOV *et. al.*, 2008).

O gálio é o segundo metal mais utilizado no tratamento de câncer, depois da platina. Utilizado em terapias antitumorais na forma de sais: o nitrato de gálio e o cloreto de gálio. O nitrato de gálio constitui o sal de gálio mais utilizado para efeitos terapêuticos sendo ativo contra linfomas e tumores na bexiga, enquanto o cloreto de gálio é usado com a cisplatina no tratamento do câncer nos pulmões (PARRILHA, 2012).

A administração de gálio em doses terapêuticas na corrente sanguínea resulta numa saturação de pelo menos 90% das transferrinas do soro, que passam a receber quantidades aproximadamente equivalentes de Ga^{3+} e Fe^{3+} . Este excesso de gálio resulta numa redução da dose de ferro fornecida às células com a consequente quebra do nível de hemoglobina e aumento dos receptores de transferrina nos linfócitos sanguíneos e nas células. As células tumorais, caracterizadas por um crescimento descontrolado e acelerado, apresentam um número mais elevado de receptores de transferrina e assim, o fornecimento de gálio é superior nas células tumorais. A escassez do ferro e a substituição direta do Fe^{3+} por Ga^{3+}

pelo centro dinuclear diminui a atividade da enzima redutase ribonucleótica, responsável pela conversão dos ribonucleótidos em desoxirribonucleótidos, como resultado as células cancerígenas são imobilizadas na fase S, o que causa a morte celular (MATOS, 2009).

Estudos com complexos de gálio têm demonstrado atividade antimicrobiana contra isolados clínicos de cepas de sensível à meticilina *S. aureus* (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente meticilina (MRSA), sensível à meticilina *Staphylococcus epidermidis* (MSSE) e resistentes à meticilina *S. epidermidis* (MRSE) na fase logarítmica ou estacionária, e em biofilmes (BALDONI *et al.*, 2010).

3.7.2 Cobre

O cobre é um componente essencial de muitas enzimas endógenas antioxidantes, atuando na eliminação de radicais livres que participam do processo da carcinogênese. Estudos indicaram que o metal (como sais de cobre) não é genotóxico o que o habilita a ser utilizado em terapias antitumorais (VALKO *et al.*, 2006).

O cobre um dos maiores espectro de atividade antimicrobiana conhecidos: **a) fungos:** *Actinomucor elegans*, *Aspergillus Níger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus niveus*; **b) bactérias:** *Campylobacter jejuni*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus grupo D*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacterium linens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium erythrogenes* *Tubercle bacillus*, *Achromobacter fischeri*, *Listeria monocytogenes*, *Photobacterium phosphoreum*; (STEINDL *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; SANTO *et al.*, 2012; GYAWALI *et al.*, 2011; GRASS *et al.*, 2010; WARNES *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2010; RUPARELIA *et al.*, 2008 e 2008; WHEELDON *et al.*, 2008; ABUSHELAIIBI *et al.*, 2005; FAÚNDEZ *et al.*, 2004)

As propriedades antimicrobianas do cobre são conhecidas há mais de cinco milênios. No antigo Egito usaram tubos de cobre para transportar a água. Há registros históricos, de que em 1885, vinicultores franceses exterminaram fungos de uma videira utilizando um *Bordeaux* (mistura contendo o sulfato de cobre). O cobre é importante para a melhoria da saúde pública, sendo conhecidas suas propriedades anti-patógenicas, sendo o tubo de cobre amplamente utilizado em encanamentos, porque ajuda a preservar a pureza da água potável. O cobre tem efeito antimicrobiano que pode inibir o desenvolvimento de

micro-organismos na água potável, tais como: bactérias, vírus, algas, e outros parasitas infecciosos (ABUSHELAIBI, 2005).

A respiração também é afetada por íons de cobre e superóxido sobre as superfícies de cobre. A *E. faecalis* possui um citocromo BD na membrana que é conhecida por se ligar de cobre(II), o que causa a inibição de determinados citocromos pela alteração associadas a conformação de transferência eletrônica de redutases. Isto pode explicado pela respiração ser afetada tão rapidamente em inóculo seco. Por outro lado, um bloco respiratório pode resultar na acumulação de substâncias tóxicas intermediárias. Embora a atividade de ATPase de membranas de células de *Enterococcus* seja afetada por cobre solúvel, os nossos resultados sugerem que poucos danos a membrana *enterococcal* ocorre nas superfícies de cobre até após as morte celular. É pouco provável que a parede espessa dos micro-organismos Gram-positivos ajude a manter a integridade da célula, protegendo a membrana do contato direto com o cobre, uma vez que a absorção de íons de cobre é rápida e contribui rapidamente para a destruição de DNA e inibição respiratória, mas morfologia bacteriana parece afetar o mecanismo de toxicidade do cobre (WARNES & KEEVIL, 2011)

Um estudo de avaliar os efeitos antimicrobianos de ligas de cobre contra *S. entérica* demonstrou que em comparação com o aço inoxidável, todas as ligas cobre apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. enterica*, como o teor de cobre nas ligas ocorreu o aumento da atividade antimicrobiana. Mesmo as cepas resistentes a cobre só sobreviveram por curtos períodos de tempo nas ligas com elevado teor de cobre. As ligas metálicas apresentaram melhor ação inibitória em condições secas. As células de *Salmonella* foram mais sensíveis às ligas de cobre, na ausência de compostos orgânicos (ZHU *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes empregados nas sínteses e análises foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia: Quercetina [3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona] (Sigma), nitrato de gálio(III) (Sigma-Aldrich), solução tampão pH 4,5, Metanol PA (F Maia) e grau espectroscópico (Dinâmica), DMSO grau espectroscópico (Vetec), Etanol PA (Dinâmica).

4.1.2 Materiais utilizados

Visando analisar o comportamento dos compostos em diferentes grupos bacterianos foram selecionadas para este trabalho as bactérias: a) gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e b) gram-negativas: *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 2). Para uso nos bioensaios as bactérias foram reconstituídas em água destilada estéril, semeadas em meio de cultura Muller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas.

Tabela 2. Ilustra as cepas bacterianas utilizadas na avaliação de atividade antimicrobiana.

CEPA BACTERIANA	CÓDIGO	MARCA / LOTE
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC SP 13525	BAC-FAR (CCCD) LOTE L 1566 Julho/2011
<i>Escherichia coli</i>	ATCC SP 11229	BAC-FAR (CCCD) LOTE L 1503 Agosto/2011
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC SP 19433	BAC-FAR (CCCD) LOTE L 1499 Julho/2012
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC SP 25923	BAC-FAR (CCCD) LOTE L 1047 Julho/2011

As cepas bacterianas foram replicadas conforme o fabricante, sendo utilizadas nos bioensaios após a terceira incubação, de acordo com a norma M7-A7 da CLSI (2006).

ATCC = *American Type Culture Collection*.

Para o controle da concentração do inóculo bacteriano, empregado no teste de sensibilidade a antimicrobiano por disco difusão, foram utilizados discos antimicrobianos comerciais contendo antibióticos de uso clínico, conforme ilustrado na Tabela 3:

Tabela 3. Ilustra os discos antimicrobianos utilizados na avaliação de atividade antimicrobiana.

Antibiótico	Conteúdo por disco	Marca / Diâmetro
AZTREONAM (AZT)	30 µg	CEFAR / 6,25 mm
CEFTAZIDIMA (CAZ)	30 µg	CEFAR / 6,25 mm
CLORANFENICOL (CLO)	10 µg	CEFAR / 6,25 mm
IMIPENEM (IPM)	10 µg	CEFAR / 6,25 mm
TETRACICLINA (TET)	30 µg	CEFAR / 6,25 mm
VANCOMICINA (VAN)	30 µg	CEFAR / 6,25 mm

Os discos antimicrobianos foram armazenados sob refrigeração a 4° C, e utilizados nos bioensaios conforme recomenda a norma M7-A7 da CLSI (2006).

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: Meio de cultura Agar Muller Hinton 500 g da marca HIMEDIA, Lotes 0000131020 e 00128764; Suabes confeccionados em haste em plástico com ponta de algodão estéril individual em papel grau cirúrgico, da marca ABSORVE, lotes 18092 e 23007; Álcool etílico P.A. da marca CINÉTICA, Lote 18366 28/JUN/2011; Álcool metílico P.A. da marca CHEMCO, Lote 24247; Quercetina da marca SIGMA, lote Q495110G 23/03/2010; Tubos de ensaio com tampa, 16X160 mm com capacidade para 20 mL, da marca LABORGLAS; Papel de filtro qualitativo da marca J. PROLAB, com gramatura 80 g/m², espessura de 205 µm, com maioria dos poros possuindo 14 µm e permeabilidade ao ar de 14 l/s m².

4.1.3 Equipamentos utilizados

Foram utilizados os seguintes aparelhos e equipamentos: espectrofômetro UV-Vis da marca VARIAN, modelo Cary 50. Autoclave vertical da marca Phoenix Luterco. Estufa para secagem e esterilização marca MARCONI, modelo MA033. Estufa para incubação da marca Deleo. Agitador de tubos da marca PHOENIX, modelo AP56.

Paquímetro Digital da marca KING TOOLS, modelo 300 mm, precisão de 0,01 mm.
Refrigerador vertical marca CONSUL, modelo biplex CRM45 frost free.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Metodologias utilizadas nos bioensaios

As metodologias aplicadas aos bioensaios de atividade antimicrobiana foram elaboradas conforme as normas contidas nos manuais de **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico e Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão** (M7-A7 e M2-A8, respectivamente). Essas técnicas são recomendadas pelo Clinical and Laboratory *Standards Institute* (CLSI) e utilizada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) em testes de sensibilidade a antimicrobianos.

As normas da CLSI foram adaptadas para este estudo: sendo utilizados solventes orgânicos na solubilização dos complexos metálicos e seus ligantes, e para o ajuste das diluições nos bioensaios.

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente, foram realizadas diluições da substância teste (ligantes orgânicos e complexos metálicos) no solvente em que apresenta melhor solubilidade, sendo ajustadas concentrações derivadas de diluições em série 2:1 (1000, 500, 250, 125, 62,5) e com valores intermediários (600, 400, 300, 200), sendo numeradas nove soluções teste nas concentrações: 1000 µg/mL, 600 µg/mL, 500 µg/mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 250 µg/mL, 200 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL (Figura 16).

Em seguida, foram produzidos inóculos a partir das colônias bacterianas com tempo de incubação recente, não superior a 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina (bacteriológica), retirou-se 4 colônias bacterianas com a mesma morfologia, e diluiu-se em tubo de ensaio contendo 4,0 mL de água salina (0,8% de NaCl diluído em água destilada), utilizando-se um agitador de tubos tipo vortex.

O inóculo produzido foi ajustado à solução padrão de 0,5 McFarland, previamente preparada, que corresponde ao padrão de turvação da bactéria *Escherichia coli* a uma

concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro). Quando o inóculo não alcançava a turvação padrão eram acrescentadas colônias bacterianas, e quando superava a escala nefelométrica era adicionada água salina. Esta solução foi então diluída em caldo Luria-Bertani¹ para obter um inóculo com concentração de 5×10^5 UFC/mL (Figura 16).

Para a determinação da CIM foi distribuído em cada tubo de ensaio, previamente esterilizado, a alíquota de 1,0 mL de cada solução teste (nas concentrações especificadas no primeiro parágrafo deste item) e 1,0 mL da suspensão bacteriana ajustada (5×10^5 UFC/mL), exceto o tubo de controle negativo.

Os tubos de ensaio com a solução teste foram incubados a $35^\circ \pm 2$ por 20 horas. Após este período foi avaliada a presença de turvação nos tubos, que indicam o crescimento bacteriano.

A partir desta aferição é possível encontrar o intervalo em que está o valor da concentração inibitória mínima, que é a menor concentração de composto capaz de inibir o crescimento microbiano.

Em cada ensaio foram incubados tubos de Controle Negativo (menor concentração do composto e caldo LB sem inóculo); e de Controle Positivo (caldo LB e suspensão bacteriana ajustada). Para cada composto foram realizadas três incubações utilizando os solventes puros, objetivando verificar a existência de atividade antimicrobiana frente às cepas bacterianas.

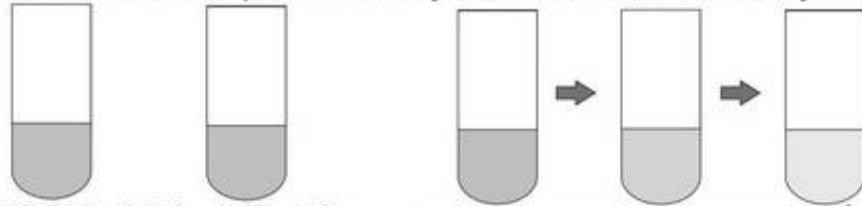
Os bioensaios foram realizados em duplicata com três repetições para cada cepa bacteriana; quando detectado erro ou contaminação o resultado foi descartado e o teste refeito.

¹ **Caldo Luria-Bertani**

Ingredientes: Triptona 10 g; Extrato de Levedura 5 g; NaCl 10 g. **Preparo:** Dissolve-se os componentes em um 1,0 litro de água destilada ou deionizada sob agitação e calor, após esteriliza-se a solução resultante em autoclave a temperatura de 121-124°C e pressão de 1 atm por 15 minutos. (SAMBROOK & RUSSELL, 2001)

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Macrodiluição em tubos

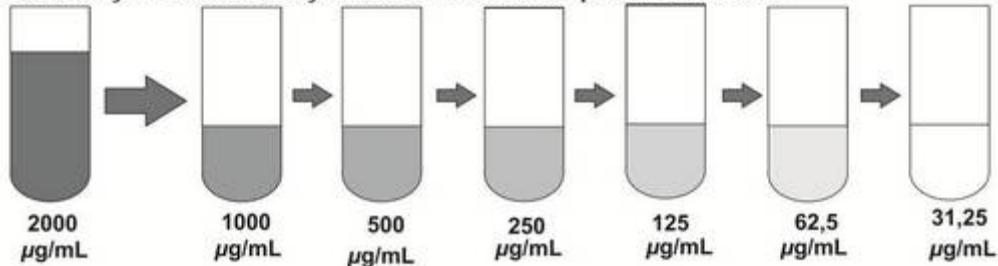
1 - Ajusta-se o inóculo ao padrão de turvação 0,5 McFarland e se faz diluições seriadas



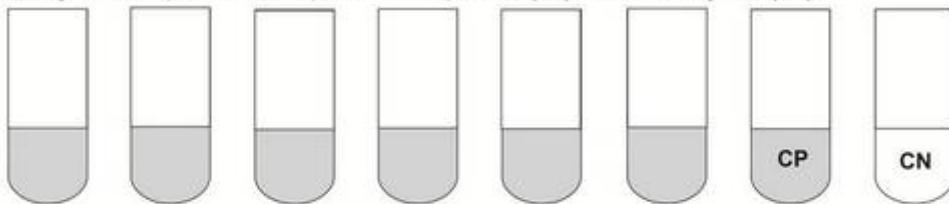
0,5 McFarland Inóculo Ajustado

Diluições seriadas (até alcançar 5×10^5 UFC/mL)

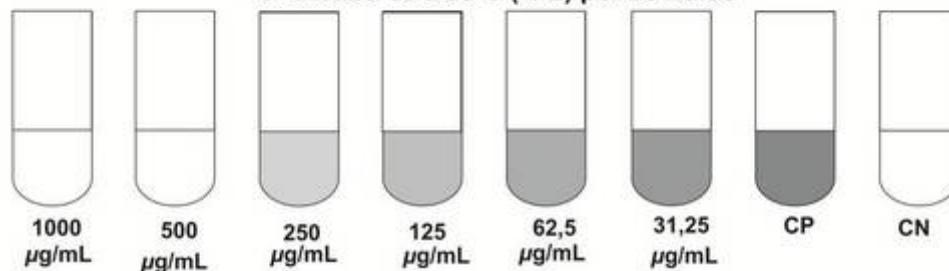
2 Realiza-se diluições seriadas (2:1) do composto no solvente de melhor solubilidade até alcançar as concentrações teste necessárias para o bioensaio.



3 - Distribui-se em tubos de ensaio 1,0 mL das soluções teste do composto (diferentes concentrações) e 1 ml de inóculo ajustado (em caldo nutriente). Promove-se a agitação dos tubos por 30 segundos. Separa-se tubos para controle positivo (CP) e controle negativo (CN).



4 - Incuba-se a 35°C (+/-2) por 20 horas



5 - Observa-se a turvação nos tubos e se determina a CIM

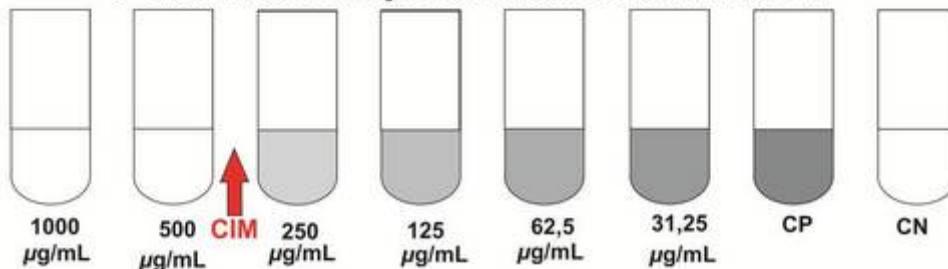


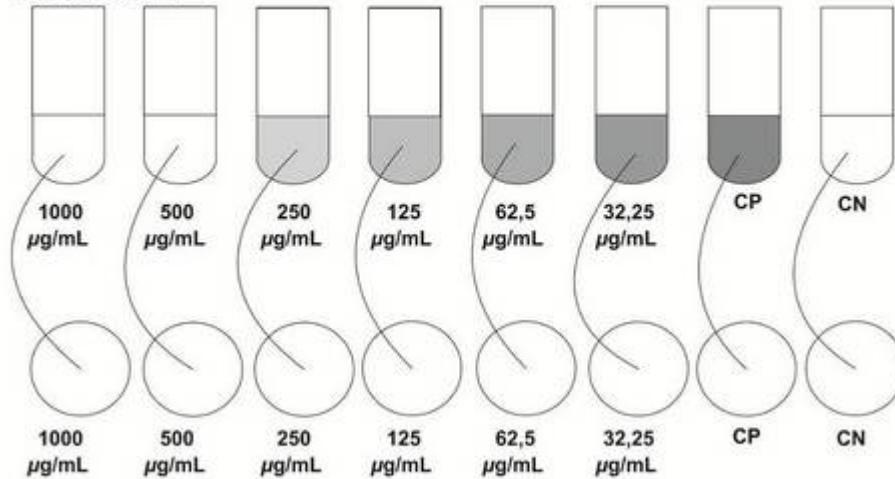
Figura 16. Ilustra a metodologia utilizada para determinação da CIM. Fonte: Próprio autor.

4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

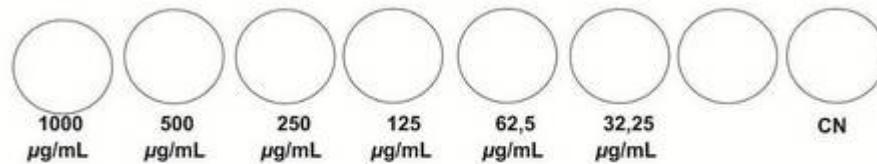
Em conjunto aos procedimentos para determinação da Concentração Inibitória Mínima, foram iniciados os procedimentos para determinação da Concentração Bactericida Mínima pelo método de plaqueamento em meio de cultura (Figura 17).

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método de plaqueamento em meio de cultura

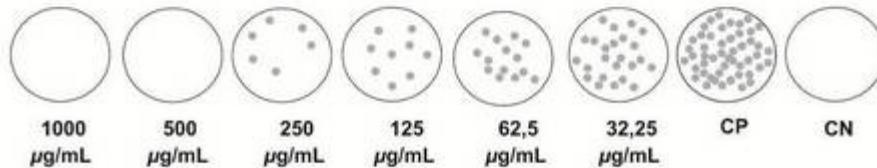
1 - Encerrado o bioensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (após incubação), retira-se de cada tubo de ensaio (soluções teste) uma aliquota de 0,1 mL, e distribuída sobre a superfície do meio de cultura (em placas de petri), com o auxílio de uma alça de Drigalski.



2 - Incuba-se a 35°C (+/-2) por 20 horas



3 - Observa-se o desenvolvimento de colônias



4 - Determina-se a Concentração Bactericida Mínima

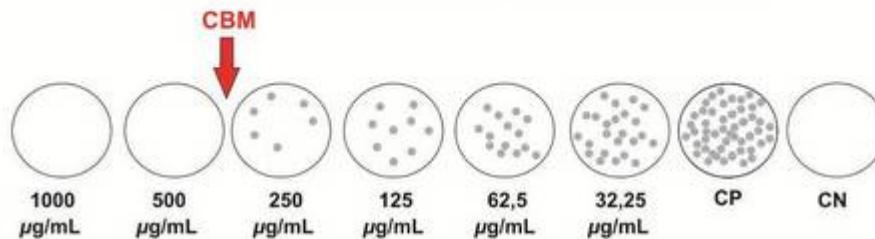


Figura 17. Ilustra a metodologia utilizada para determinação da CBM. Fonte: Próprio autor.

Em conjunto aos procedimentos para determinação da CIM, foram iniciados os procedimentos para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Após o período de incubação para determinação da CIM foi retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada tubo de ensaio, inclusive do controle positivo, negativo (sem inóculo). Os inóculos foram distribuídos sobre a superfície do meio de cultura em placas de petri, com o auxílio de uma alça de Drigalski próximo ao Bico de Bunsen.

As placas de petri inoculadas foram incubadas a temperatura de $35^{\circ}\pm 2$ por 20 horas. As placas foram incubadas a temperatura de $35^{\circ}\pm 2$ por 20 horas. Após este período foi observado a presença de colônias bacterianas em cada placa.

A CBM foi determinada como sendo a menor concentração do composto capaz de impedir o crescimento microbiano em meio de cultura (formação de colônias bacterianas). Os bioensaios foram realizados em duplicata com três repetições para cada cepa bacteriana; quando detectado erro ou contaminação o resultado foi descartado e o teste refeito.

4.2.4 Teste de sensibilidade a antimicrobiano (TSA)

O teste de sensibilidade a antimicrobiano foi realizado conforme o método de disco difusão em meio de cultura Muller-Hinton (método de Kirby-Bauer), utilizando discos de papel de filtro estéreis saturados com as soluções teste avaliadas.

Primeiramente, foram obtidos discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro (com auxílio de um perfurador de papel), sendo separados 40 discos em placas de petri com tampa, as quais foram esterilizadas durante 15 minutos em autoclave a 121°C e pressão de 1 atm. Em seguida, os discos foram secos em estufa a 100°C por 45 minutos, e impregnados com 4,0 mL da solução teste a ser avaliada, conforme a CIM determinada nos bioensaios.

Em seguida, foi distribuído 20,0 mL de meio de cultura em placas de petri estéreis. Após a solidificação do meio, as placas foram deixadas com a tampa entreaberta por dois minutos na estufa de incubação, posteriormente tampadas e viradas, e quando não utilizadas armazenadas sob refrigeração.

As placas com meio de cultura podem ser conservadas em geladeira a 4° C por até uma semana (Obs.: antes do uso as placas contendo meio de cultura devem ser retiradas da geladeira e colocadas em estufa a 25°C por cerca de 30 minutos).

Após os procedimentos preparatórios para TSA, foram produzidos inóculos a partir das colônias bacterianas com tempo de incubação recente, não superior a 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina (bacteriológica), retirou-se 4 colônias bacterianas com a mesma morfologia, e diluiu-se em tubo de ensaio contendo 4,0 mL de água salina (0,8% de NaCl diluído em água destilada), utilizando-se um agitador de tubos tipo vortex (Figuras 18a e 18b).

O inóculo produzido foi ajustado a escala nefelométrica de 0,5 McFarland, que corresponde ao padrão de turvação da bactéria *Escherichia coli* a uma concentração a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Quando o inóculo não alcançava a turvação eram acrescentadas colônias bacterianas, e quando superava a escala nefelométrica água salina.

Posteriormente, foi realizada a inoculação do meio de cultura, inserindo-se um suabe estéril no tubo de ensaio contendo o inóculo bacteriano ajustado ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, pressionou-se o suabe contra a parede do tubo para retirar o excesso, e distribuiu-se o inóculo sobre a superfície do meio de cultura, com uma inclinação de aproximadamente 60°, espalhando-o em três direções diferentes, duas em ângulo reto (Figuras 18c e 18d). Logo depois, as placas foram colocadas para secar em estufa de incubação a uma temperatura de 35°C durante 10 minutos (Figura 18e).

Em seguida, foram colocados em cada placa de petri 5 discos antimicrobianos impregnados com o composto. Um disco foi disposto no centro da placa de petri e os outros quatro ao redor, atentando-se para que a distância do centro a outro disco não fosse inferior a 20 mm, e que o disco não ficasse próximo à borda da placa (Figura 18f).

As placas foram incubadas em estufa a uma temperatura de 35°C durante 18 horas. Após este período foram realizadas medições dos halos de inibição produzidos ao redor dos discos (incluindo diâmetro do disco), com o auxílio de um paquímetro digital. Foram considerados como resultado positivo as zonas de inibição superiores a 7 mm de diâmetro (Figuras 18g e 18h).

Para o controle negativo ou ambiental foram inseridas em cada incubação uma placa de petri contendo apenas o meio de cultura Muller-Hinton sem inóculo, para

averiguar alguma contaminação durante o procedimento. Para o controle da concentração do inóculo foram incubadas, em cada bioensaio, duas placas de petri contendo discos antimicrobianos padronizados (Tabela 3).

Os bioensaios foram realizados em triplicata com três repetições, e quando detectada contaminação os resultados foram descartados e o teste foi refeito. A média da medida dos halos de inibição obtida para cada composto foi calculada.



Figura 18. Etapas do teste de sensibilidade a antimicrobiano. Fonte: Figuras 18a a 18f reproduzidas do manual LABORCLIN (2011), demais próprio autor.

Medição dos halos de Inibição

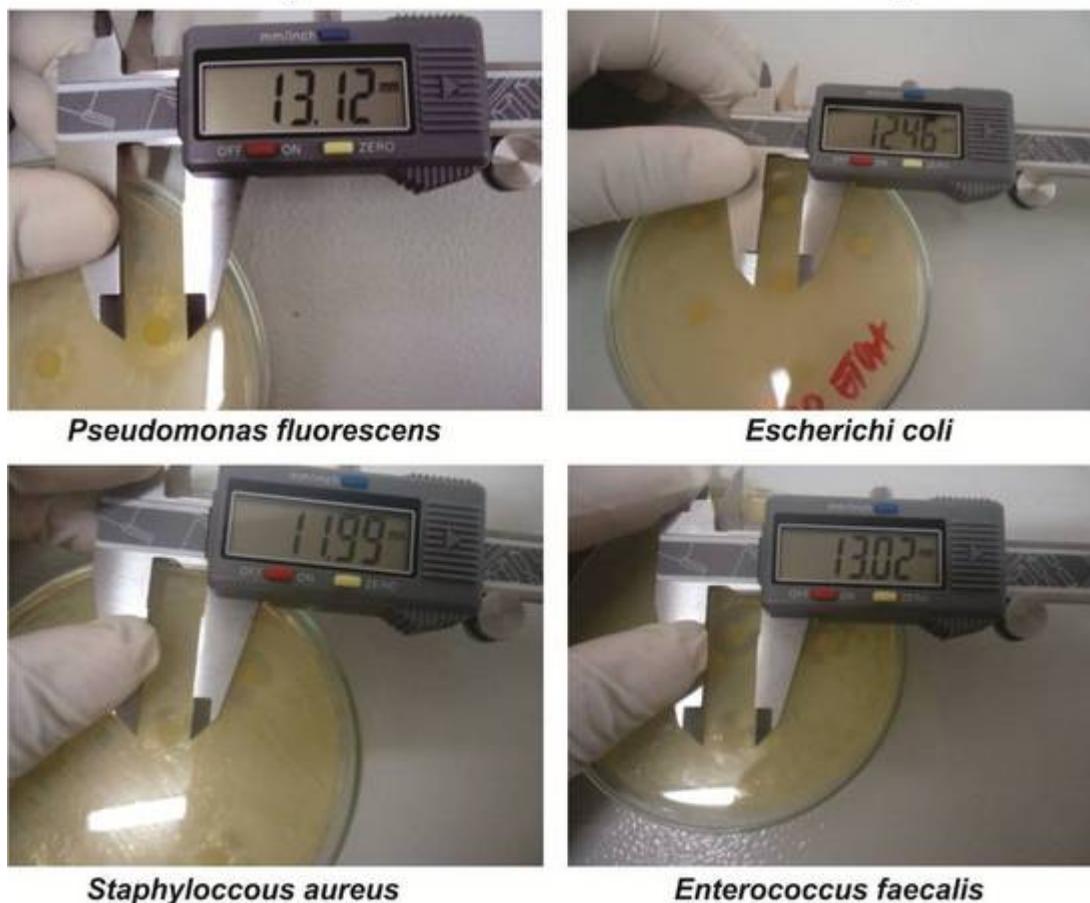


Figura 19. Ilustra a forma de medição dos halos de inibição. Fonte: Próprio autor.

4.2.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos Testes de Sensibilidade a Antimicrobiano pelo método de disco difusão foram analisados estatisticamente utilizando as ferramentas disponíveis no software BioEstat 5.0. Os gráficos estatísticos foram produzidos a partir do programa OriginPro 8.5 e SigmaPlot 12.0.

As medidas dos halos de inibição foram avaliadas estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em cada bioensaio; e as médias das medidas dos halos foram comparadas entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), que é um teste não-paramétrico apropriado para comparações de 3 ou mais amostras independentes (AYRES *et al.*, 2007).

4.2.6 Padrão de turbidez do inóculo

Conforme recomenda a norma M7-A7 da CLSI, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, para os bioensaios de sensibilidade antimicrobiana, foi criado um padrão de turvação de acordo com escala nefelométrica de McFarland. Para este fim foi preparada uma solução de BaSO₄, equivalente a solução padrão McFarland de 0,5, seguindo os procedimentos descritos na sequência:

Primeiramente, acrescenta-se uma alíquota de 0,5 mL de uma solução aquosa 0,048 mol/L de BaCl₂ (1,175% p/v BaCl₂ • 2H₂O) a 99,5 mL de uma solução aquosa 0,18 mol/L de H₂SO₄ (1% v/v), sendo a mistura agitada constantemente para manter a suspensão.

Em seguida, verifica-se a densidade da solução padrão usando um espectrofotômetro UV-Vis, com fonte de luz de 1 cm e cubetas apropriadas para determinar a absorbância. Nesse caso, a absorbância correta no comprimento de onda de 625 nm deve variar de 0,08 a 0,13 para a solução padrão McFarland de 0,5, que equivale a turvação do inóculo bacteriano de *Escherichia coli* a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro).

Posteriormente, uma alíquota de 4,0 mL da suspensão de sulfato de bário é transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca, hermeticamente fechado, do mesmo material e tamanho usado para cultivar e diluir o inóculo bacteriano usado nos bioensaios. O tubo de ensaio contendo o padrão de turvação deve ser armazenado em local escuro, e a temperatura ambiente até o momento do uso.

Antes do uso a solução do padrão de turvação deve ser agitada vigorosamente num misturador mecânico tipo vórtex, verificando a uniformidade de turbidez. O controle de sulfato de bário deve ser substituído sempre que constatada alteração em sua densidade padrão, o qual pode ser confirmado pelo espectrofotômetro UV-Vis.

4.3 SÍNTESES DOS COMPOSTOS QUÍMICOS

4.3.1 Complexo Metálico 1: Quercetina e íons de Ga(III)

A síntese do complexo de quercetina e íons Ga(III) foi obtida pela metodologia proposta por Simões (2012), a qual reagiu o flavonóide quercetina com o sal nitrato de gálio(III) em uma estequiometria 3:1. Essa síntese foi realizada da seguinte forma: a uma solução de 0,042 g de nitrato de gálio em 10 mL de água, com agitação e aquecimento, adicionou-se uma solução do flavonóide quercetina (0,151 g) que foi solubilizada em aproximadamente 10 mL de etanol.

A solução amarelada resultante foi colocada em agitação e aquecimento por 20 minutos, sendo adicionada três gotas de uma solução tampão pH 4,5 (ácido acético/acetato de sódio), o que resultou na mudança de coloração para laranja.

Manteve-se a solução em refluxo por 4 horas, e após algumas 10 horas se obteve a formação de um sólido amorfo de coloração esverdeada, que foi filtrado e devidamente seco. A Figura 20 ilustra a estrutura proposta para o complexo mononuclear de Ga(III).

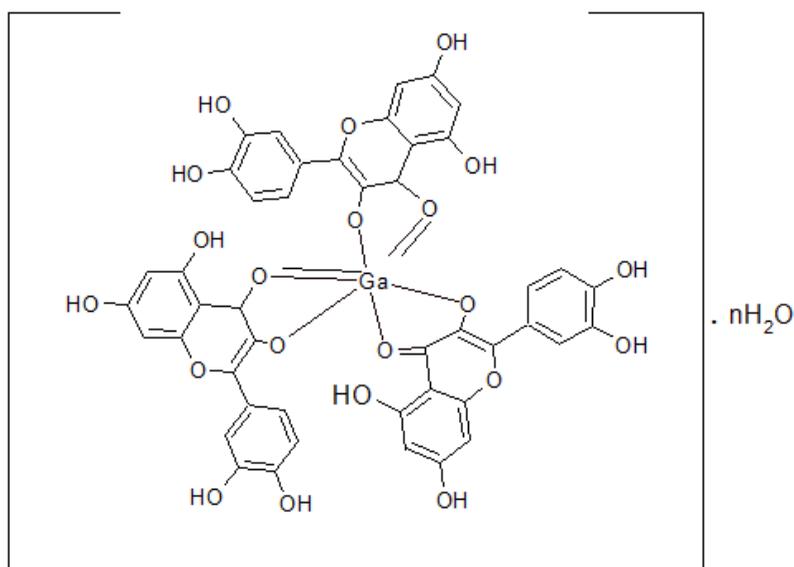


Figura 20 - Ilustra a estrutura química proposta para o complexo 1 (SIMÕES, 2012).

Os resultados de CHN (análise elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio) e espectroscopia no infravermelho indicam a formação de um complexo metálico mononuclear com grau de pureza adequado para a utilização nos bioensaios. A análise

elementar de CHN para $\text{GaC}_{45}\text{H}_{39}\text{O}_{27}$: $\text{MM} = 1.081,51 \text{ g mol}^{-1}$; calculado: C = 49,98 % e H = 3,63 %; encontrado: C = 49,41 % e H = 3,51 %.

4.3.2 Ligante Sintético H2bbppd

O ligante sintético N,N',N,N'-bis[2-hidroxi-3,5-di-*tert*-butilbenzil](2-piridilmetil)-1,3-diaminopropano, identificado neste trabalho como H2bbppd (Figura 21a) foi sintetizado (CABEZA *et al.* 2010) a partir de uma reação de aminação redutiva, onde se reagiu 1,3-diaminopropano com 2-piridinacarboxialdeído, obtendo-se uma imina que foi reduzida à respectiva amina com NaBH_4 .

Em seguida, reagiu-se a amina com o precursor CMTBF sintetizado como descrito por dos Anjos (2005). O ligante foi obtido na forma de um óleo esverdeado, que foi recristalizado em isopropanol, até a precipitação de um pó branco.

Os resultados da análise elementar de CHN e espectroscopia no infravermelho e RMN ^1H indicam a formação do ligante com grau de pureza adequado para a utilização nos bioensaios e na síntese do complexo de Cu(II). A análise elementar de CHN para $\text{C}_{45}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_2$: $\text{MM} = 693 \text{ g mol}^{-1}$; C = 77,99; H = 9,31; N = 8,08 %. Encontrada: C = 77,51; H = 9,42; N = 8,20 %. IV (KBr), em cm^{-1} : 3400-3300 (ν_{OH}); 2956 ($\nu_{\text{C-H}}$, *t*-butil); 1596, 1477 ($\nu_{\text{C=N,C=C}}$, aromáticos); 1394 ($\delta_{\text{O-H}}$, fenol); 1362 ($\delta_{\text{C-H}}$, *tert*-butil); 1237 ($\nu_{\text{C-O}}$, fenol); 879 ($\delta_{\text{C-H}}$, aromáticos); 756 ($\delta_{\text{C-H}}$ piridina).

4.3.3 Complexo Metálico 2: H2bbppd e íons Cu(II)

O complexo metálico foi sintetizado, conforme a metodologia descrita por Favarin *et al.* (2010): a partir de uma solução de Acetato Cupríco - $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,10 g; 0,5 mmol) em 20 mL de metanol, sob agitação e leve aquecimento, adicionou-se uma solução metanólica do ligante sintético H2bbppd (0,35 g; 0,5 mmol; 10 mL de metanol). A solução púrpura resultante permaneceu sob agitação e aquecimento por aproximadamente 15 minutos. Em seguida adicionou-se Perclorato de Potássio - KClO_4 (0,07 g; 0,5 mmol).

Deixou-se reagir, sob agitação e aquecimento, até a redução do volume à metade, então se filtrou e deixou em repouso. Após dois dias à temperatura ambiente, houve a formação de um precipitado púrpura microcristalino o qual foi filtrado e lavado com

metanol e éter etílico gelados, e posteriormente seco. Ao complexo metálico mononuclear foi proposta a estrutura química ilustrada na Figura 21b.

Os resultados da análise elementar de CHN e espectroscopia no infravermelho indicam a formação de um complexo metálico mononuclear com grau de pureza adequado para a utilização nos bioensaios. A análise elementar de CHN para $\text{CuC}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{ClO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$: MM = 887,03 g/mol^{-1} ; C = 62,29; H = 7,61; N = 6,32 %. Encontrada: C = 62,63; H = 7,52; N = 6,46 %. IV (KBr), em cm^{-1} : 3400-3300 ($\nu_{\text{O-H}}$); 2956 ($\nu_{\text{C-H}}$, *terc*-butil); 1610-1445 ($\nu_{\text{C=N,C=C}}$, aromáticos); 1390 ($\delta_{\text{O-H}}$, fenol); 1362 ($\delta_{\text{C-H}}$, *terc*-butil); 1234 ($\nu_{\text{C-O}}$, fenol); 1096 ($\nu_{\text{Cl-O}}$, ClO_4); 880 ($\delta_{\text{C-H}}$, aromáticos); 763 ($\delta_{\text{C-H}}$, piridina).

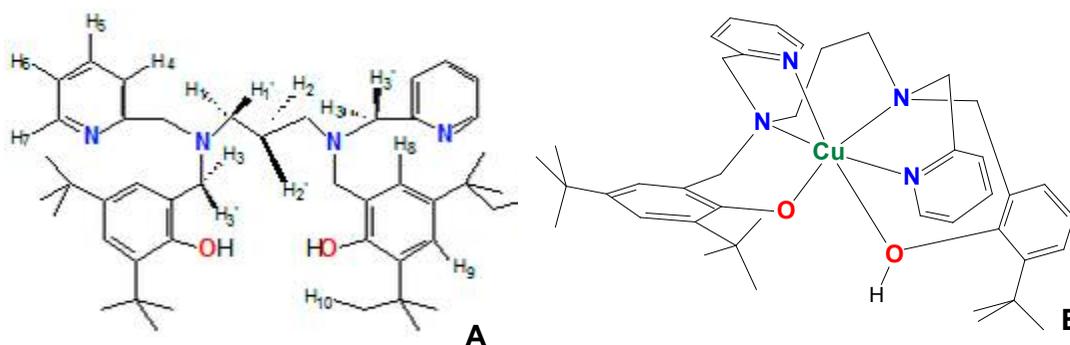


Figura 21 – As estruturas químicas para: o ligante sintético H2bbppd (a) e o complexo 2 (b) (CABEZA *et al.*, 2010; FAVARIN *et al.*, 2010)

Tabela 4. Tabela de solubilidade dos compostos.

	SOLVENTES UTILIZADOS			
	Etanol	Metanol	DMSO	Água
Quercetina	SOLÚVEL	PARCIALMENTE	PARCIALMENTE	INSOLÚVEL
H2bbppd	PARCIALMENTE	SOLÚVEL	PARCIALMENTE	INSOLÚVEL
Complexo Metálico 1	PARCIALMENTE	SOLÚVEL	PARCIALMENTE	INSOLÚVEL
Complexo Metálico 2	SOLÚVEL	SOLÚVEL	SOLÚVEL	INSOLÚVEL

H2bbppd = Ligante sintético N,N,N,N'-bis[2-hidroxi-3,5-di-*terc*-butilbenzil](2-piridilmetil)-1-3-diaminopropano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO

a) Complexo 1: Quercetina e íons Ga(III)

O complexo foi preparado, pelo grupo de pesquisa de Síntese e Caracterização de Complexos Metálicos da UEMS - Unidade Universitária de Naviraí, a partir do ligante natural quercetina e nitrato de gálio(III) em pH 4,5. A confirmação do complexo foi obtida a partir de caracterizações via análise elementar de CHN e espectroscopia no IV, conforme descrito na seção experimental (SIMÕES, 2012).

b) Ligante H2bbppd e Complexo 2 [H2bbppd e íons Cu(II)]

O ligante sintético N,N',N,N'-bis[2-hidroxi-3,5-di-terc-butilbenzil](2-piridilmetil)-1-3-diaminopropano e seu complexo metálico contendo íons Cu(II) também foram sintetizados pelo grupo de pesquisa de Síntese e Caracterização de Complexos Metálicos da UEMS - Unidade Universitária de Naviraí. A confirmação do complexo foi obtida a partir de caracterizações de análise elementar de CHN, espectroscopia no IV, conforme descrito na seção experimental (CABEZA *et al.*, 2010; FAVARIN *et al.*, 2010).

5.2 BIOENSAIOS

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Inicialmente, foram realizadas duas rotinas de bioensaios frente a cepas bacterianas utilizando a quercetina pura diluída em etanol e metanol. Estes bioensaios objetivaram avaliar a atividade antimicrobiana do flavonóide e produzir padrões de referência, possibilitando a comparação com resultados de bioensaios utilizando complexos metálicos sintetizados a partir deste ligante natural.

Os resultados demonstram suscetibilidade das cepas testadas ao flavonóide quercetina, apresentando valores de CIM diferentes quando utilizado como solvente o etanol (400 µg/mL) e o metanol (500 µg/mL). Provavelmente, devido a solubilidade da

quercetina em diferentes solventes, assim como descrito por Razmara *et al.* (2010), que determinou a seguinte ordem de solubilidade: ETANOL > METANOL > ÁGUA.

O efeito da quercetina sobre o crescimento bacteriano foi semelhante quando utilizado o mesmo solvente nas diluições, o que pode indicar um mesmo mecanismo de ação frente a bactérias Gram-positivas e negativas.

Diversos estudos têm relatado que a atividade antimicrobiana dos flavonóides pode estar relacionada à sua habilidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, ou ainda pelo caráter lipofílico destes compostos, que podem ser capazes de causar a ruptura da membrana celular dos micro-organismos (SARTORI, 2005).

Bem como, os flavonóides sem grupos hidroxila ligados ao anel B (Figura 15) possuem maior atividade contra micro-organismos, o que indica que o sítio de ação destes compostos possa ser a membrana dos micro-organismos. Este fato reforça a hipótese de que o sítio de ação dos flavonóides seja a membrana plasmática (COWAN, 1999).

Além do mais, nas bactérias a permeabilidade da membrana está associada à perda dos íons e a redução do potencial da membrana (TROMBETA *et al.*, 2005). E, danos na membrana celular podem causar o extravasamento de macromoléculas, acarretando um colapso das funções celulares e conseqüentemente a morte bacteriana (TORTORA *et al.*, 2003).

Os valores da CIM para o complexo metálico 1 indicam um aumento da atividade antimicrobiana da quercetina após a complexação com íons de Ga(III), bem como sugerem que o composto compartilha o mesmo mecanismo de ação de seu ligante (Tabela 7).

Os resultados obtidos com o complexo metálico 2 sugerem um aumento da atividade antimicrobiana após a complexação do sintético H2bbppd com íons de Cu(II). Estudos demonstram que complexos metálicos com íons cobre penetram mais facilmente na parede celular bacteriana, pela desnaturação protéica de componentes do grupo sulfidríla (GOULART, 2011), destruindo a parede celular bacteriana.

O fato de alguns complexos não serem mais ativos que os ligantes pode ser devido à baixa solubilidade, instabilidade, diminuição do caráter lipofílico do complexo obtido ou a fatores relacionados ao mecanismo de ação. Antibióticos frequentemente exibem mais de um sítio de coordenação e a introdução de um íon metálico em um determinado sítio pode inativar o fármaco ao invés de potencializar sua atividade (ROCHA *et al.*, 2011).

A análise dos resultados admite duas hipóteses para o mecanismo de ação dos complexos metálicos avaliados: 1) Modificação na membrana plasmática que causou perda de constituintes celulares; 2) Inibição da síntese de constituintes da parede celular. Sendo necessária a realização de estudos específicos para a determinação destes mecanismos.

Não foram encontrados na literatura critérios para categorizar a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos e complexos metálicos utilizados neste trabalho. Contudo, diversos trabalhos têm empregado uma classificação baseada nos resultados da CIM para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e suas frações, como: BOA - CIM inferior a 100 µg/mL; MODERADA - CIM entre 100 e 500 µg/mL; FRACA - CIM entre 500 e 1000 µg/mL; e INATIVA quando a CIM for superior a 1000 µg/mL (Holetz *et al.*, 2002; Dalmarco, 2010). Desse modo, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos complexos metálicos 1 e 2 como BOA e a de seus ligantes como MODERADA.

O efeito inibitório dos complexos metálicos 1 e 2 foi determinado como BACTERICIDA, conforme sugerido por Berche *et al.* (1988), que na proporção entre CBM/CIM ≤ 4 o agente será bactericida, e quando > 4 bacteriostático (Abou *et al.*, 2013; Konaté *et al.*, 2012). Além disso, os compostos avaliados inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas (*e.g.* *S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram-negativas (*e.g.* *E. coli* e *P. fluorescens*), o que indica um amplo espectro da atividade, e abre perspectivas de que os mesmos possam ser utilizados como futuros fármacos.

A microbiologia reconhece que as bactérias Gram-negativas possuem mecanismos especializados em expulsar substâncias estranhas para fora da célula (bomba de efluxo), limitando o acesso do agente antimicrobiano ao seu sítio de ação, prevenindo o acúmulo de antibiótico no interior da célula, e inibindo a ação do antimicrobiano (Reichling *et al.*, 2005). Apresentam, ainda, no espaço periplasmático com enzimas capazes de inativar fármacos (β -lactamases) tornando a célula resistente a eles (SILVA, 2011).

De modo análogo, as bactérias Gram-positivas protegem sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa. As muitas camadas de peptidoglicanos impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido à presença de açúcares e aminoácidos (SARTORI, 2005).

Nesse sentido, vem ganhando espaço no campo acadêmico pesquisas que busquem produzir compostos com amplo espectro de atividade, e que ainda apresentem mecanismos de ação desconhecidos pelas bactérias patogênicas.

Tabela 5. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL dos compostos.

		Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (µg/mL)							
		Bactérias Gram-Negativas				Bactérias Gram-Positivas			
		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. fluorescens</i>	
Composto	Solvente	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
EtOH	Etanol	R	R	R	R	R	R	R	R
MeOH	Metanol	R	R	R	R	R	R	R	R
QEtOH	Etanol	400	1000	400	1000	400	1000	400	1000
QMeOH	Metanol	500	>1000	500	>1000	500	>1000	500	>1000
CM1	Metanol	250	500	250	500	250	500	250	500
H2bbppd	Etanol	250	500	250	500	250	500	250	500
CM2	Etanol	125	250	125	250	125	250	125	250

EtOH = Solvente etanol puro; MeOH = Solvente metanol puro; QEtOH = Quercetina diluída em Etanol; QMeOH = Quercetina diluída em Metanol; CM1 - Complexo metálico 1; H2bbppd = Ligante sintético H2bbppd; CM2 = Complexo metálico 2. R = Nenhuma inibição de crescimento bacteriano foi observada

5.2.2 Teste de Sensibilidade a Antimicrobiano

A interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade a antimicrobiano deve ser realizada em conjunto com os valores da concentração inibitória mínima, objetivando avaliar o potencial de inibição bacteriana dos compostos testados.

Um antimicrobiano ideal deve possuir as seguintes características: a) que seja tóxico para o micro-organismo patogênico, mas não tóxica às células hospedeiras; b) microbicida em vez de microbiostático; c) relativamente solúveis, com mesmas funções quando altamente diluído em fluidos corporais; d) facilmente transportado para o sítio da infecção; e) que não perturbe a saúde do hospedeiro causando alergias ou predisposição do hospedeiro a outras infecções; e f) que possua preço razoável de produção (TORTORA *et al.*, 2010).

A análise estatística detectou uma distribuição normal dos dados, não sendo observados valores discrepantes (outliers). Os dados obtidos nos testes de sensibilidade a antimicrobiano (TSA) foram submetidos à Análise de Variância-ANOVA, seguido do teste de Tukey (dados paramétricos); sendo as médias comparadas pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn (dados não-paramétricos). O intervalo de confiança foi de 95%, sendo considerado estatisticamente diferente quando $p > 0,05$. A distribuição dos dados podem ser observada na figura 22.

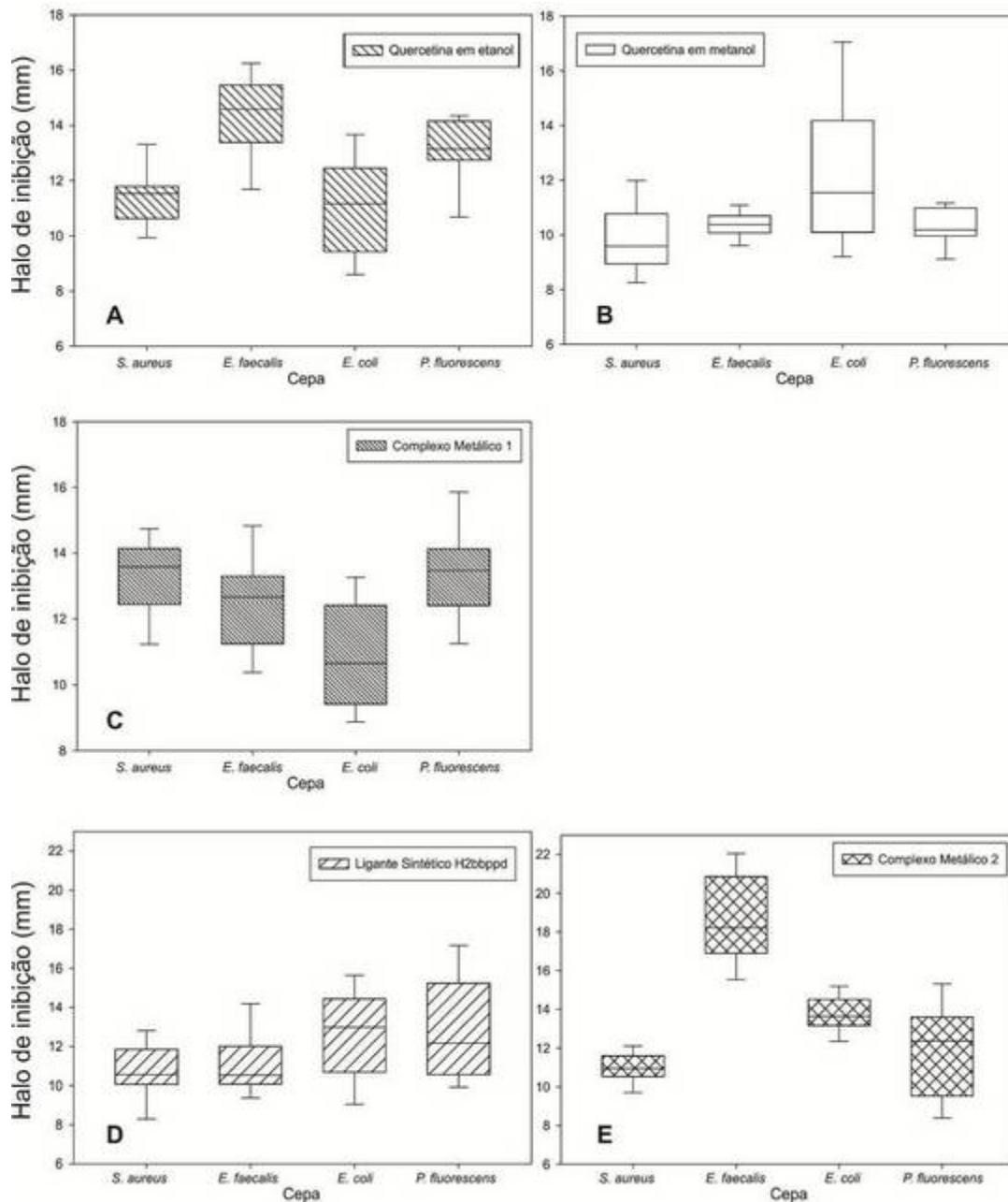


Figura 22 - Ilustra diagramas em caixa dos resultados do teste de sensibilidade a antimicrobiano utilizando diferentes compostos. A = Quercetina diluída em etanol; B = Quercetina diluída em metanol; C = Ligante sintético H2bbppd; D = Complexo metálico 1; E = Complexo metálico 2.

O complexo metálico 1 apresentou efeito inibitório superior a seu ligante, com halos de inibição maiores utilizando metade da concentração empregada no bioensaio com a quercetina (CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$). A menor suscetibilidade ao composto foi observada

frente à *Escherichia coli*, com valores relativamente menores, o que não descarta a utilização deste composto no tratamento de infecções provocadas por esta cepa.

Tabela 6. Diâmetro do halo de inibição, média e desvio padrão (mm), pela ação do flavonóide quercetina diluído em diferentes solventes.

		SOLVENTE UTILIZADO	
		Etanol	Metanol
Bactéria Gram-Positiva (ATCC)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	400	500
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)		11,43 \pm 1,17 Aa	9,84 \pm 1,24 Aa
<i>Enterococcus faecalis</i> (19433)		14,20 \pm 1,67 Ba	10,37 \pm 0,57 Ab
MÉDIA		12,81	10,10
Bactéria Gram-Negativa (ATCC)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	400	500
<i>Escherichia coli</i> (11229)		11,80 \pm 2,80 Aa	10,50 \pm 1,70 Ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (13525)		13,14 \pm 1,42 Ba	10,28 \pm 0,66 Ab
MÉDIA		12,47	10,39

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis com 95% de confiança.

Tabela 7. Diâmetro do halo de inibição, média e desvio padrão (mm), pela ação da quercetina diluída em metanol e complexo metálico 1.

		COMPOSTO UTILIZADO	
		QMeOH	CM1
Bactéria Gram-Positiva (ATCC)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	500	250
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)		9,84 \pm 1,24 Aa	13,26 \pm 1,16 Ab
<i>Enterococcus faecalis</i> (19433)		10,37 \pm 0,57 Aa	12,58 \pm 1,53 Ab
MÉDIA		10,10	12,94
Bactéria Gram-Negativa (ATCC)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	500	250
<i>Escherichia coli</i> (11229)		10,50 \pm 1,70 Ab	10,90 \pm 1,82 Bb
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (13525)		10,28 \pm 0,66 Aa	13,36 \pm 1,38 Ab
MÉDIA		10,39	12,13

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis com 95% de confiança. QMeOH = Quercetina diluída em Metanol; CM1 = Complexo metálico 1 diluído em metanol.

O mecanismo de ação inibitória do complexo 1 pode estar relacionado à habilidade do íon gálio de penetrar no corpo celular das bactérias através de mecanismos de transporte de ferro, reduzindo a absorção deste, e interferindo no metabolismo do Fe e na síntese do DNA e de proteínas essenciais (KANEKO *et al.*, 2007).

Os resultados do TSA com o complexo metálico 2 demonstraram maior atividade antimicrobiana que o ligante livre, com halos de inibição relativamente maiores utilizando metade da concentração utilizada para o bioensaio com o ligante (CIM de 125 µg/mL).

A maior suscetibilidade foi observada frente à bactéria *Enterococcus faecalis*, apresentando halo de inibição de 18,68 mm (Tabela 8). Indicando um potencial farmacológico no controle de crescimento desta bactéria, citada como a primeira das três principais causas de infecções hospitalares (WILLEY, 2008).

Tabela 8. Diâmetro do halo de inibição, média e desvio padrão (mm), pela ação do Ligante Sintético H2bbpppd e complexo metálico 2.

		COMPOSTO UTILIZADO	
		H2bbpppd	CM2
Bactéria Gram-Positiva (ATCC)	CIM (µg/mL)	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)		10,63 ± 1,39 Aa	10,95 ± 0,74 Aa
<i>Enterococcus faecalis</i> (19433)		11,15 ± 1,64 Aa	18,68 ± 2,68 Bb
MÉDIA		10,89	14,81
Bactéria Gram-Negativa (ATCC)	CIM (µg/mL)	250	125
<i>Escherichia coli</i> (11229)		12,56 ± 2,40 Ba	11,96 ± 2,54 Ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (13525)		12,74 ± 2,50 Ba	13,76 ± 0,95 Cb
MÉDIA		12,65	12,86

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significamente entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis com 95% de confiança. H2bbpppd = Ligante sintético H2bbpppd diluído em etanol; CM2 = Complexo metálico 2 diluído em etanol.

Os complexos metálicos 1 e 2 apresentam características de antimicrobianos, tais como: baixa concentração inibitória mínima (CIM ≤ 250 µg/mL), efeito bactericida e amplo espectro da atividade.

No entanto, para confirmação do potencial farmacológico destes compostos são necessários estudos de avaliação da toxicidade. Uma vez que, os estudos de toxicidade auxiliam na triagem de uma grande variedade de compostos com atividade biológica para definir seu potencial de aplicação terapêutica mensurando a toxicidade apresentada dos possíveis futuros fármacos (Carballo *et al.*, 2002).

O gráfico comparativo demonstra uma maior atividade antimicrobiana do ligante sintético H2bbpppd frente às cepas bacterianas Gram-negativas (*E. coli* e *P. Fluorescens*),

sendo observado um comportamento totalmente distinto pela ação do complexo metálico 2, sintetizado a partir desse ligante. O que pode indicar que o complexo metálico 2 apresenta um mecanismo de inibição diferente a do seu ligante (Figura 23).

Também pode ser observado no gráfico que os complexos metálicos 1 e 2 apresentaram menor atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli* em comparação aos resultados com outras bactérias, que pode estar relacionada aos mecanismos de resistência da espécie, como exemplo o reservatório de genes de resistência a antibióticos, que permite a evolução em formas resistentes aos medicamentos (TORTORA, 2010).

O complexo 2 com íons Cu(II) foi o composto que apresentou a maior atividade antibacteriana frente a todas as bactérias. Essa atividade pode ser resultado da estabilidade do complexo metálico com o ligante sintético.

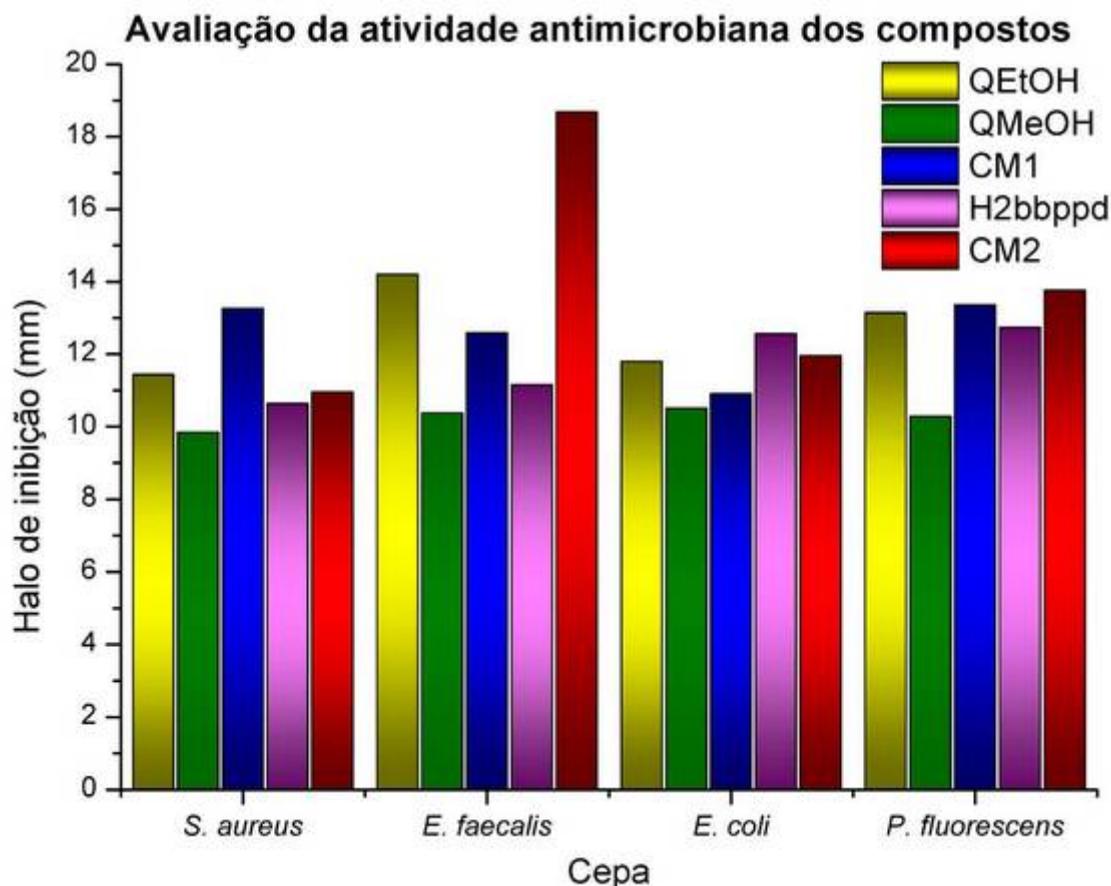


Figura 23 - Ilustra resultados do teste de sensibilidade a antimicrobiano. QEtOH = Quercetina diluída em etanol; QMeOH = Quercetina diluída em metanol; H2bbppd = Ligante sintético H2bbppd; CM1 = Complexo metálico 1; CM2 = Complexo metálico 2.

A cepa *Pseudomonas fluorescens* demonstrou ser eficiente para avaliar a atividade antibacteriana de complexos metálicos e de seus ligantes orgânicos. Pois apresentou alta sensibilidade aos compostos testados na determinação da CIM e CBM, e halos de inibição no TSA entre 10,39 e 13,76 mm. Além do mais, possui ótimo crescimento microbiano, com colônias de fácil visualização.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho buscou avaliar metodologias de baixo custo capazes de determinar a CIM e CBM, e realizar o TSA, de acordo com normas para teste de sensibilidade antimicrobiana com antibióticos e metodologias empregadas em estudos de atividade antimicrobiana com extratos vegetais.

Os resultados demonstraram boa eficiência e reprodutividade das metodologias utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos metálicos e respectivos ligantes livres (não coordenados). Os dados produzidos nos bioensaios são quantitativos e/ou qualitativos, relacionados à suscetibilidade das cepas bacterianas aos compostos testados.

Foram utilizadas bactérias gram-negativas (*Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli*) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), com o objetivo de testar a ação das substâncias avaliadas em células com diferentes morfologias. No entanto, os resultados indicam não existir diferença estatística da atividade antimicrobiana do composto relacionada ao grupo em que pertence a bactéria.

A análise dos resultados revelou atividade antimicrobiana nos complexos metálicos de quercetina com íons Ga(III) e do ligante sintético H2bbppd com íons de Cu(II) superior a de seus ligantes. Os valores de CIM obtidos para estes complexos demonstram potencial para o uso farmacológico.

Os resultados obtidos demonstraram que a cepa *Pseudomonas fluorescens* apresenta alta sensibilidade aos compostos testados, ótimo crescimento microbiano, com colônias de fácil visualização; o que são ótimas características para um organismo teste nesse tipo de pesquisa.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados de atividade antimicrobiana obtidos pelos complexos metálicos 1 e 2 os qualificam para estudos posteriores sobre o mecanismo de inibição do crescimento promovidos por estes compostos.

O uso de técnicas de microscopia eletrônica de varredura, e bioensaios a nível de DNA bacteriano podem contribuir para a identificação do mecanismo de inibição das bactérias utilizadas neste trabalho.

Estudos de toxicidade dos complexos metálicos 1 e 2 para definir seu potencial de aplicação terapêutica em futuros fármacos.

8 REFERÊNCIAS

- ABOU, O.; KARAMOKO, O.; ADAMA, C.; AUGUSTIN, A. A. **Phytochemical screening and evaluation of the antibacterial activity of bark extracts of *Pericopsis (Afroormosia) laxiflora* (Benth.) of *Scherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* ESBL.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. v. 5. n. 1p. 86-90, 2013.
- ABUSHELAIBI, A. **Antimicrobial effects of copper and brass ions on the growth of *Listeria monocytogenes* at different temperatures, pH and nutrients.** [Tese]. Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2005.
- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante.** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 87 p., 2005.
- AFAQ, F.; KATIYAR, S. K.. **Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis.** Mini Rev Med Chem, v. 11, n. 14. p. 1200-1215, 2011.
- AKHLAGHI, M.; BANDY, B. **Preconditioning and Acute Effects of Flavonoids in Protecting Cardiomyocytes from Oxidative Cell Death.** Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 782321, 9 p. DOI:10.1155/2012/782321, 2012..
- ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar.** [Tese]. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 17 p., 2007.
- ALVAREZ, M. A.; DEBATTISTA, N. B.; PAPPANO, N. B. **Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids.** Folia Microbiology. v. 53., n. 1., p. 23-28, 2008.
- AMSTALDEN, H. G. **Efeitos da quercetina em células de glioma humano: envolvimento de metaloproteinases de matriz e seus inibidores.** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. CURITIBA-PR, 2011.
- ANVISA. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Módulo I, Brasília, 2010.
- ARAGÃO, K. G. C. B. **Osteoporose: um artigo de atualização.** [Trabalho de Conclusão de Curso]. Curso de Fisioterapia da Universidade Católica de Goiás. Goiânia. 6 p., 2004.
- ARAÚJO, R. F. C.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. V. S.; ALVES, P. M.; HIGINO, J. S.; MARTINS, A. B. **Concentração Mínima Bactericida do Extrato do Cajueiro sobre Bactérias do Biofilme Dental.** Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa, v. 9., n.2., p. 187-191, 2009.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Help do BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Version 5.3. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>>, 2007.

BALDONI, D.; STEINHUBER, A.; ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A. **In Vitro Activity of Gallium Maltolate against Staphylococci in Logarithmic, Stationary, and Biofilm Growth Phases: Comparison of Conventional and Calorimetric Susceptibility Testing Methods**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54., n.1, p. 157–163, 2010.

BASLI, A.; SOULET, S.; Chaher, N.; MÉRILLON, J.; CHIBANE, M.; MONTI, J.; RICHARD, T. **Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection - Review article**. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. V. 2012, Article ID 805762. 14 p., DOI:10.1155/2012/805762, 2012.

BASTOS, T. O.; SOARES, B. M.; CISALPINO, P. S.; MENDES, I. C.; SANTOS, R. G.; H. BERALDO. **Coordination to gallium(III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus* opportunistic fungi**. *Microbiological Research*. n. 165. p. 573-577, 2010.

BEHLING, E. B. ; SENDÃO, M. C. ; FRANCESCATO, H. D. C. ; ANTUNES, L. M. G. ; BIANCHI, M. L. P. **Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas**. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara-SP, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENSON, H. J.; BROWN, A. E. **Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology**. 8. ed. The McGraw-Hill Companies, 455 p., 2001.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKI, H. O. ***Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos**. *Revista Cultura e Científica da Universidade Estadual de Londrina - Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. Londrina. v. 28, n. 2. p. 81-92, 2007.

BEVERIDGE, T. J.; HUGHES, M. N.; LEE, H.; LEUNG, K. J.; POOLE, R. K.; SAVVAIDIS, I.; SILVER, S.; TREVORS, J. T. **Metal-microbe interactions contemporary approaches**. *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier. v. 38. p.178-243, 1996.

BOTELHO, F. V.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; LEMOS, V. S.; PIMENTA, A. M. C.; CALADO, H. D. R.; MATENCIO, T.; MIRANDA, C. T.; PEREIRA-MAIA, E. C. **Physicochemical study of floranol, its copper(II) and iron(III) complexes, and their inhibitory effect on LDL oxidation**. *Journal of Inorganic Biochemistry*. n. 101. p. 935–943, 2007.

CABEZA, N. A.; dos ANJOS, A.; FAVARIN, L. R. V.; ANDRADE, G. R.; ANDRADE, L. H. C. **Novo Complexo de Relevância Bioinorgânica e Ambiental. Resumo Expandido**. 8º ENIC/1º EPEX. UEMS. Disponível em: <periodicos.uems.br/index.php/enic/article/view/1264/235>. Acesso em: 12 nov 2012, 2010.

CALIMAN, M. C. W.; MARIN, J. M. **Comparação da resistência antibacteriana entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos diarreicos ou saudáveis, em Ituverava - São**

Paulo, Brasil. ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, v.28, n.4, 244-249. ISSN 2175-0106, 2012.

CAMARGO, M. S. **Efeito da quercetina sobre alguns fatores relacionados com a virulência de *Staphylococcus aureus***. [Dissertação]. Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara-SP, 2008.

CANAL, N. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia Coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS**. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, RS. 11 p., 2010.

CARBALLO, J. L.; ZAIRA L. H.; PILAR, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. **A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products**. BMC Biotechnol., v. 2, n.1, 2002.

CIMINO, S.; SORTINO, G.; FAVILLA, V.; CASTELLI, T.; MADONIA, M.; SANSALONE, S.; RUSSO, G. I.; MORGIA, G. **Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. Review article. Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. V. 2012, Article ID 632959, DOI:10.1155/2012/632959, 8 p., 2012.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 7. ed. M7-A7. v. 26. n. 2, 2006.

CLSI/ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão**. 8. ed. M2-A8. v. 20. n. 1, 2003.

COWAN, M.M. **Plant products as antimicrobial agents**. Clinical Microbiology Reviews. v.12. n.4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. J. **Antimicrobial activity of flavonoids**. International Journal of Antimicrobial Agents. v. 26, p. 343–356, 2005.

DALE, J. W.; PARK, S. F. **Molecular genetics of bacteria**. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, Inglaterra. 4. ed., 2004.

DALMARCO, J. B. et al. **Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus comiculatus*: var. São Gabriel**. International Journal Green Pharmacy. v. 4. n. 2, p. 108-114, 2010.

DANTAS, E. L. R.; SÁ, F. H. L.; CARVALHO, S. M. F.; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, E. M.; RIBEIRO, E. M. **Genética do Câncer Hereditário**. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos**. Revista visão acadêmica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

dos ANJOS, A. **Novos Complexos Metalo-Radicalares de Relevância Bioinorgânica: 1) Modelos Biomiméticos para a Enzima Galactose Oxidase, 2) Modelos Complexos Metalo-Fenoxil.** [Tese]. Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 241 p, 2005.

DUTHIE, G.; ORRICE, P. **Antioxidant Capacity of Flavonoids in Hepatic Microsomes Is not Reflected by Antioxidant Effects In Vivo.** Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 165127, 6 pages. DOI:10.1155/2012/165127, 2012.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. **Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde.** Braz. J. Food Technol. Campinas. v. 14, n. 3, p. 181-201. DOI: 10.4260/BJFT2011140300023, 2011.

EGERT, S.; RIMBACH, G. **Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements.** American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.* 2: 8–14. DOI:10.3945/an.110.000026, 2011.

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Burton's microbiology for the health sciences.** 9. ed, Baltimore, EUA, Lippincott Williams & Wilkins, 446 p., 2011.

FAÚNDEZ, G.; TRONCOSO, M.; NAVARRETE, P.; FIGUEROA, G. **Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*.** BMC Microbiology. v.4. n.19. DOI:10.1186/1471-2180-4-19, 2004.

FAVARIN, L. R. V.; dos ANJOS, A.; ANDRADE, G. R.; CABEZA, N. A. **Novo complexo mononuclear de relevância bioinorgânica como modelo biomimético para a enzima galactose oxidase e Ambiental.** Resumo Expandido. 8º ENIC/1º EPEX. UEMS. Disponível em: <periodicos.uems.br/index.php/enic/article/view/1232/232>. Acesso em: 12 nov 2012, 2010

FERNÁNDEZ, D. U.; Fuchs, R.; SCHÄFER, M.; BUDZIKIEWICZ, H.; MEYER, J. **The Pyoverdinin of *Pseudomonas fluorescens* g173, a novel structural type accompanied by unexpected natural derivatives of the corresponding ferribactin.** Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen, 2003.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (asteraceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 17. n.2. João Pessoa, 2007.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. **A química inorgânica na terapia do câncer.** Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n. 6, p. 4-6, 2005.

FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A. **Coloração de Gram e as Variações na sua Execução.** Centro Universitário Feevale – Laboratório de Biomedicina. NewsLab, 82. Ed, p. 124-128, 2007.

GAMBINO, D.; FERNÁNDEZ, M.; SANTOS, D.; ETCHEVERRÍA, G. A.; PIRO, O. E.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; TOMAZ, I.; MARQUES, F. **Searching for gallium**

bioactive compounds: Gallium(III) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazone derivatives. Polyhedron. Elsevier. n. 30. p. 1360–1366, 2011.

GEKKER, G.; HUA, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K.. Egyptian Propolis: 2. **Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east nile delta propolis.** Journal of Ethnopharmacology, n. 102. p.158–163, 2005.

GERSHMAN, M. D.; KENNEDY, D. J.; NOBLE-WANG, J.; KIM, C.; GULLION, J.; KACICA, M.; JENSEN, B.; PASCOE, N.; SAIMAN, L.; MCHALE, J.; WILKINS, M.; SCHOONMAKER-BOPP, D.; CLAYTON, J.; ARDUINO, M.; SRINIVASAN, A.; **Multistate Outbreak of Pseudomonas fluorescens Bloodstream Infection after Exposure to Contaminated Heparinized Saline Flush Prepared by a Compounding Pharmacy.** CID. Oxford-UK, n. 47, p. 1372-1379, 2008.

GILLESPIE, S. H.; BAMFORD, K. B. **Medical microbiology and infection at a glance.** WILEY-BACKWELL: Garsington Road, Oxford-UK, 4. ed., 2012.

GILLESPIE, S. H.; HAWKEY, P. M. **Principles and practice of clinical bacteriology.** 2. ed. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 604 p., 2006.

GIUBERTI, C. S. **Estudo da estabilidade e produção piloto de lipossomas pH-sensíveis furtivos de cisplatina.** [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. p. 18, 2007.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J., SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.. **Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids.** Nutrición Hospitalaria. 22(3). p. 287-293, 2007.

GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. **Metallic Copper as an Antimicrobial Surface.** **Applied and environmental microbiology.** American Society for Microbiology. v. 77. n. 5. p. 1541–1547. DOI:10.1128/AEM.02766-10, 2011.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; FERRI, C. **Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis.** Nutrients. v. 2, p. 889-902. DOI:10.3390/nu2080889, 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A.; HASFA, S. H. A.; SMQADRI, S. Q.; HAIK, Y. **Antimicrobial Activity of Copper Alone and in Combination with Lactic Acid against Escherichia coli O157:H7 in Laboratory Medium and on the Surface of Lettuce and Tomatoes.** SAGE-Hindawi Access to Research Journal of Pathogens. Article ID 650968. 1022. DOI:10.4061/2011/650968, 2011.

GOULART, D. S. **Detecção de resíduos de soluções sanitizantes empregadas em pedilúvio para bovinos no leite e solo.** (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiania, 65 p., 2011.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G.W.; WILLIAMS, G.M.; LINES, T.C. **A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of**

genotoxic/carcinogenic properties. Food and Chemical Toxicology. v. 45., p. 2179–2205, 2007.

HAVSTEEN, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** Pharmacology & Therapeutics. Elsevier, n. 96. p. 67-202, 2002.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. **Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. v. 97. n.7. p. 1027-1031, 2002.

HOOPER, L.; RYDER, J.J.; KURZER, M.S.; LAMPE, J.W.; MESSINA, M.J.; PHIPPS, W.R.; CASSIDY, A. **Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis.** Human Reproduction Update. n. 15. p. 423–440, 2009.

_____; MADHAVAN, G; TICE, J. A.; LEINSTER, A. J.; CASSIDY, A. **Effects of isoflavones on breast density in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** Human Reproduction Update, v.16. n. 6. p. 745–760, 2010.

HSUEH, P.; TENG, L.; PAN, H.; CHEN, Y.; SUN, C.; HO, S.; LUH, K. **Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* Bacteremia among Oncology Patients.** Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, p. 2914-2917, 1998.

KANEKO, Y.; THOENDEL, M.; OLAKANMI, O.; BRITIGAN, B.E.; SINGH, P. K. **The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity.** J. Clin. Invest. n. 117, p. 877-888, 2007.

KAR, A. **Pharmaceutical microbiology.** New age internation (p) limited, publishers. Nova Deli, India, 363 p., 2008.

KIM, J. M.; LEE, E. K.; KIM, D. H.; YU, B. P.; CHUNG, H. Y. **Kaempferol modulates pro-inflammatory NF- κ B activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase.** American Aging Association, v. 32. p. 197-208, 2010.

KONATÉ, K.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGUÉ, A. N.; AWORET-SAMSENY, R. R. R. HILOU, A; SOUZA, A.; DICKO, M. H.; M'BATCHI, B. **Antibacterial activity against β - lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. p. 11-18, 2012.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J.. **Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review.** International Journal of Food Microbiology. n. 144. p. 51–63, 2010.

LABORCLIN. **Manual para antibiograma - Difusão em disco (Kirby & Bauer).** Trabalho elaborado pela equipe do Setor Técnico da Laborclin destinado à orientação para execução do antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer. 29 p., 2011

LESSA, J. A.; PARRILHA, G. L.; BERALDO, H. **Gallium complexes as new promising metaldrug candidates**. *Inorganica Chimica Acta*. Elsevier. v. 393. p. 53-63, 2012.

LOPES, J. F. **Estudo teórico das interações da cisplatina e análogos em solução**. [Tese]. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte. p. 1-2., 2009.

MACHADO, H. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o Tumor ascítico de ehrlich “in vivo”**. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. Viçosa-MG. p. 15, 2006.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**. *Nutrición Hospitalaria: Madri-Espanha*. p. 271-278, 2002.

MASUNARI, A., TAVARES, L. C. **Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.42, n.3, p. 461-471, 2006.

MATOS, M. R. P. N. **Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro**. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. n. 85. Portugal, 2009.

MELNIKOV, P. MALZAC, A. COELHO, M. B. **O gálio e a patologia óssea**. *Acta Ortopédica Brasileira*. Campo Grande-MS. v. 16. n.1. p. 54-57, 2008.

MIN, K.; EBELER, S. E. **Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells**. *Food Chemical Toxicology*. v. 47. n. 11, p. 2716-2722, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de GRAM**. Secretaria de Políticas de Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Brasília, 2001.

MOHAMMADI, K.; THOMPSON, K. H.; PATRICK, B. O., STORR, T.; MARTINS, C.; POLISHCHUK, E.; YUEN, V.G.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. **Synthesis and characterization of dual function vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications**. *Journal of Inorganic Biochemistry*. n. 99. p.2217-2225, 2005.

MURRAY, Robert K; BENDER, David; BOTHAM, K.; KENNELLY, P.; WEIL, A. **Harper Bioquímica Ilustrada**. 28. ed. Mcgraw-hill Interamericana. p. 741-743, 2009.

NIJVELDT, R.J; VAN NOOD, E; VAN HOORN, D.E., BOELENS, P.G., VAN NORREN, K., VAN LEEUWEN, P.A. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda, Maryland-USA. v. 74. p. 418-425, 2001.

NOJIMOTO, I. T. I.; CENTENA, A. J.; YANAGUITA, R. M.; WATANABE, K.; KAKUMOTO, M.; MACHADO, R M. **Efeitos bacteriostáticos e bactericida de antibióticos sobre as listeria spp isoladas em Goiânia de pacientes com clínica de aborto repetitivo**. *Revista de Patologia Tropical: Goiânia-GO*. v.23. n.l. p. 45-59,1994.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R. S.; HOUGHTON, P. J. **Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides.** PHYTOTHERAPY RESEARCH. n. 19. p. 782–786, DOI: 10.1002/ptr.1723, 2005.

OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application (Review). **International Journal of Molecular Medicine.** Londres. v. 16. p. 275–278, 2005.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp.*** [Dissertação]. Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011. 81 p.

ONGENA, M.; JACQUES, P.; THONART, P.; GWOSE, I.; FERNÁNDEZ, D. U.; SCHÄFER, M.; BUDZIKIEWICZ, H. **The pyoverdinin of *Pseudomonas fluorescens* BTP2, a novel structural type.** Tetrahedron Letters. n. 42. Elsevier, 2001.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** São Paulo: Sarvier, 254 p, 2000.

ORIGINLAB CORPORATION. **OriginPro 8.5.0 SR1,** 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2008. 18(2). p. 301-307, 2008.

OUATTARA, L.; KOUDOU, J.; ZONGO, C., BARRO, N., SAVADOGO, A., BASSOLE, I.H.N.; OUATTARA, A. S.; TRAORE, A. S. **Antioxidant and antibacterial activities of three species of *Lannea* from Burkina Faso.** Journal of Applied Sciences. V. 11. N. 1. P. 157-162, 2011.

PARADELLA, T. C., KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. ***Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas.** Revista de Odontologia da UNESP. v. 36. n.2. p. 163-168, 2007.

PARRILHA, G. L. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividade farmacológica e avaliação de relações estrutura-atividade.** [Tese]. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. p. 147-148, 2012.

PARTRIDGE, S.R.; TSAFNAT, G.; COIERA, E.; IREDELL, J. R. **Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons.** FEMS Microbiology Reviews, v.33, n.4, p.757-784, 2009.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de seus propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica, p. 32-38, 2005.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. **Alexander Fleming (1881-1955): Da descoberta da penicilina (1928) ao prémio Nobel (1945)**. Revista da Faculdade de Letras. Universidade do Porto. História. vol. 6, n.3, p. 129-151, Porto, Portugal, 2005.

PIMPÃO, R. C. S. **Compostos fenólicos e sua actividade antioxidante em espécies de *Juniperus*: análise da produção sazonal e sob condições de stresse**. [Dissertação]. Programa de Mestrado em Biologia Molecular e Biotecnologia. Universidade de Lisboa, p. 4-5, 2009.

PITOUT, J. D. D. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance**. *Frontiers in microbiology*, v. 3. Article 9. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00009, 2012.

POMMERVILLE, J. C. **Alcornoque's fundamentals of microbiology**. 9. Ed. Jones and Bartlett Publishers. Canada, 2011.

REICHLING, J.; KOCH, C.; STAHL-BISKUP, E.; SOJKA, C.; SCHNITZLER, P. **Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture**. *Planta Medica*. v. 71, p. 1123-1127, 2005.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T. MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. **Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana**. *Química Nova*. v. 34. n. 1. p. 111-118, 2011.

RUPARELIA, J. J.P., CHATTERJEE, A. K., DUTTAGUPTA. S. P., MUKHERJI, S. **Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles**. *Acta Biomater*. v. 4, n. 3, p. 707-713, 2008.

SAHOO, K. C.; TAMHANKAR, A.; SAHOO, S.; SAHU, P. S.; KLINTZ, S. R.; LUNDBORG, C. S. **Geographical Variation in Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Stool, Cow-Dung and Drinking Water**. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 9, 746-759; doi:10.3390/ijerph9030746, 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. Apêndice. A.2.1 Media. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANTO, C. E.; QUARANTA, D.; GRASS, G. **Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage**. *Microbiology Open*. p. 46-52, 2012.

SANTOS, L. P. **Caracterização química e avaliação da propriedade antioxidante de diferentes variedades de uva**. (Dissertação) - Mestrado em Química. Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, p. 8, 2009.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *acmela brasiliensis spreng (wedelia paludosa)* (asteraceae)**. [Dissertação]. Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências farmacêuticas.

Universidade do vale do Itajaí, 81 p., 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia**. 3. ed. Guanabara Koogan: São Paulo. p. 120-127. 642 p., 2002.

SCHELIN, Jenny; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M. T.; LINDQVIST, R.; BARKER, G. C.; RADSTROM, P. **The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment**. Virulence. Landes Bioscience, v.2, n. 6. p. 580-592, 2011.

SIATKA, T.; KAŠPAROVÁ, M. **Seasonal Variation in Total Phenolic and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers**. Molecules, v. 15, p. 9450-9461, 2010.

SILBY, M. W.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; VERNIKOS, G. S.; GIDDENS, S. R.; Robert. W. JACKSON; PRESTON, G. M.; ZHANG, X.; MOON, C. D.; GEHRIG, S. M.; GODFREY, S. A.; Christopher G KNIGHT; MALONE, J. G.; ROBINSON, Z.; SPIERS, A. J.; HARRIS, S.; CHALLIS, G. L.; YAXLEY, A. M.; HARRIS, D.; SEEGER, K.; MURPHY, L.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; QUAIL, M. A.; SAUNDERS, E.; MAVROMATIS, K.; BRETTIN, T. S.; BENTLEY, S. D.; HOTHERSALL, J.; STEPHENS, E.; THOMAS, C. M.; PARKHILL, J.; LEVY, S. B.; RAINEY, P. B.; THOMSON, N. R. **Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens***. Genome Biology. v. 10. p. R51.1-51.16, 2009.

SILLANKORVA, S. M. **Utilização de Bacteriófagos no Controlo de Células Suspensas e Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens***. [Dissertação]. Programa de Pós-graduação em Tecnologia do Ambiente Alimentos da Escola de Engenharia da Universidade do Minho. Portugal, 112 p., 2004

SILVA, J. G.; AZZOLINI, L. S.; WARDELL, S. M. S. V.; WARDELL, J. L.; BERALDO, H. **Increasing the antibacterial activity of gallium(III) against *Pseudomonas aeruginosa* upon coordination to pyridine-derived thiosemicarbazones**. Polyhedron. Elsevier. n. 28. p. 2301–2305, 2009.

SILVA, P. E. S. **Atividade antimicrobiana de *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)**. (Dissertação) Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais. Universidade do Estado do Amazonas, 69 p., 2011.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TERENZI, H. **Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana**. Quimica Nova, v. 29, n. 4, 844-855, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**. 5. ed., UFSC: Santa Catarina, 2004.

SIMÕES, V. N. **Ligante biomimético natural utilizado na síntese de complexos metálicos de interesse biológico**. (Dissertação). Mestrado em Recursos Naturais. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 88 p., 2012

SOTOZONO, C.; FUKUDA, M., OHISHI, M.; YANO, K.; ORIGASA, H.; SAIKI, Y.; SHIMOMURA, Y.; KINOSHITA, S. **Vancomycin Ophthalmic Ointment 1% for methicillin-resistant Staphylococcus aureus or methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis infections: a case series.** BMJ. DOI:10.1136/bmjopen-2012-001206, 2013.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. **Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro.** Química Nova. v. 28. n. 4. p. 678-682, 2005.

SPERANDIO, D.; DECOIN, V.; LATOUR, X.; MIJOUIN, L.; HILLION, M., FEUILLOLEY, M. G. J.; ORANGE, N.; MERIEAU, A. **Virulence of the Pseudomonas fluorescens clinical strain MFN1032 towards Dictyostelium discoideum and macrophages in relation with type III secretion system.** BMC Microbiology, v. 12, n. 223, 10 p., 2012.

STEINBERG, F. M.; MURRAY, M. J.; LEWIS, R. D.; M. CRAMER, A.; AMATO, P.; YOUNG, R. L.; BARNES, S.; KONZELMANN, K. L.; FISCHER, J. G.; ELLIS, K. J.; SHYPAILO, R. J.; FRALEY, J. K.; SMITH, E. O.; WONG, W. W. **Clinical outcomes of a 2-y soy isoflavone supplementation in menopausal women.** American Society for Nutrition. n. 93. p. 356–367, 2011.

STEINDL, G.; HEUBERGER, S.; SPRINGER, B. **Antimicrobial effect of copper on multidrug-resistant bacteria.** Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria. Austria. v. 99. p. 38-43, 2012.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J. OWATZ, C. B. **Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment.** Journal of Endodontics Elsevier. v. 32, n. 2, 2006.

SYSTAT SOFTWARE. **SigmaPlot for Windows version 12.0.** Build 12.2.0.45, 2011.

TALARO, K. P.; CHESS, B. **Foundations in microbiology.** 8 ed. McGraw-Hill. New York, USA, 937 p., 2012.

_____, K. P.; TALARO, A. **Foundations in microbiology.** 4 ed. McGraw-Hill. New York, USA, 890 p., 2002.

TALIB, W. H.; ZARGA, M. H. A.; MAHASNEH, A. M. **Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from Inula viscosa.** Molecules. v. 17, 3291-3303; DOI:10.3390/molecules17033291, 2012.

TAPAS, A.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. **Flavonoids as Nutraceuticals: A Review.** Tropical Journal of Pharmaceutical Research. p.1089-1099, 2008.

TINER, J. H. **100 cientistas que mudaram a história do mundo.** Marise Chineli (trad.). Rio de Janeiro: Ediouro. p. 193-194, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction.** 10 ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, EUA, 960 p., 2010.

TRAMUTA, C.; NUCERA, D.; ROBINO, P., SALVARANI, S.; NEBBIA, P. **Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy.** Journal of Veterinary Science, DOI: 10.4142/jvs.2011.12.1.49., 2011.

TRIVEDI, P. C.; PANDEY, S.; BHADAURIA, S. **Text book of microbiology.** Aavishkar Publishers, Distributors. Jaipur (Raj.), India, 2010.

TROMBETA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C. S.; MAZZANTI, G.; BISIGNANANO, G. **Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 49. n.6. p. 2474-2478, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chemico-Biological Interactions*. n. 160. p. 1–40, 2006.

VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. **Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais.** *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – Araraquara, SP. v.19. n.1. p. 11-15, 2008.

VAUZOUR, D. **Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects.** Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 914273, 16 p. DOI:10.1155/2012/914273, 2012.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. **Functional properties of honey, propolis, and royal jelly.** *Journal of Food Science*. v. 73. n. 9. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x, 2008.

VOLP, A. C.P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. **Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde.** *Revista Brasileira de Nutrição Clínica: Porto Alegre*. V. 23. n.2. p. 141-149, 2007.

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

WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. **Natural products version 2.0: connecting genes to molecules.** *Journal of the American Chemical Society*. *J Am Chem Soc*, v. 132. n.8. p. 2469–2493. doi:10.1021/ja909118a, 2010.

WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y.; RUSSEL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L.; BARTOLO, R. G. **Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria.** *J. Appl. Microbiol.*, v. 94, p. 240-247, 2003.

WARNES, S. L.; KEEVIL, C. W. **Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact.** *Applied and environmental microbiology*, v. 77., n. 17, p. 6049–6059, 2011.

WARNES, S. L.; KEEVIL, C. W. **Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact.** Applied And Environmental Microbiology. American Society for Microbiology. p. 6049–6059. doi:10.1128/AEM.00597-11, 2011.

WEBER, I. C.; NOAL, Charlise Bolson.; WINCKLER NETO, C. H. D. P.; SANTOS, R. C. V. **Prevalência e perfil de resistência de microrganismos isolados de uma unidade de tratamento intensivo de um hospital da região central do Rio Grande do Sul.** Prática Hospitalar. v. 66, n. 6. p. 57-62, 2009.

WHEELDON, L. J.; WORTHINGTON, T.; LAMBERT, P. A.; HILTON, A. C.; LOWDEN, C. J.; ELLIOTT, T. S. J. **Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 62. p. 522-525. DOI:10.1093/jac/dkn219, 2008.

WHO. **Promoting Access to Medical Technologies and Innovation Intersections between public health, intellectual property and trade.** World Health Organization, World Intellectual Property Organization and World Trade Organization, 2012.

WILLEY, J. M.; SHERWOOD, Linda M.; WOOLVERTON, C. J. **Prescott, Harley, and Klein's microbiology.** McGraw-Hill: New York, NY, USA. 7. ed., 2008.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. **Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Chicago, 2001. v.49, p. 4083-4089, 2001.

YODER, M. F.; KISAALITA, W. S. **Iron specificity of a biosensor based on fluorescent pyoverdinin immobilized in sol-gel glass.** Journal of Biological Engineering, v. 5, n. 4, 2011.

ZHANG, Y.; CHEN, A. Y.; LI, M.; CHEN, C.; YAO, Q. **Ginkgo Biloba Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells.** Journal of Surgical Research. Elsevier. v. 148. n. 1. p. 17–23. DOI:10.1016/j.jss.2008.02.036, 2008.

ZHU, L, ELGUINDI, J., RENSING, C.; RAVISHANKA, S. **Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*.** Food Microbiology. v. 30. p. 303-310, 2012.

ZHU, L.; ELGUINDI, J.; RENSING, C.; RAVISHANKAR, S. **Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*.** Food Microbiology. v. 30, 303-310, 2012.