



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RAÏSSA MAYER RAMALHO CATÃO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITOS BIOLÓGICOS DE
RIPARINAS SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES**

JOÃO PESSOA - PB

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RAÏSSA MAYER RAMALHO CATÃO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITOS BIOLÓGICOS DE
RIPARINAS SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES**

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacologia).

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima
Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Socorro Vieira Pereira

JOÃO PESSOA - PB

2007

RAÏSSA MAYER RAMALHO CATÃO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITOS BIOLÓGICOS DE RIPARINAS SOBRE
BACTÉRIAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES**

Aprovada em 11/05/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinador

Prof^a. Dr^a. Lindomar de Farias Belém
Examinador

Prof^a. Dr^a. Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Examinador

Prof. Dr. Lauro Santos Filho
Examinador

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Almir;

Aos meus filhos, Rodolfo, Rafaella e Raquel;

Aos meus pais Raíff (in memorian) e Eliane.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Almir, Rodolfo, Rafaella e Raquel por tudo que eles representam em minha vida.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em particular à Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima e ao Professor Dr. José Maria Barbosa Filho, orientadores que reúnem entre inúmeras qualidades sapiência e humildade.

A professora Dra. Maria do Socorro Vieira Pereira, pela paciência e dedicação durante todo este período de estudo.

A professora Dra. Bagnólia de Araújo Costa, pela dedicação e incentivo ao ensino e à pesquisa.

Aos colegas de turma, pelo companheirismo e amizade, em especial a Alessandra, Josimar, Rossana, Thúlio e Vanda, por acreditarem no PQI/UEPB.

Aos colegas do Departamento de Farmácia da UEPB.

A UEPB, por ter nos dado a oportunidade de investir na nossa qualificação profissional.

A CAPES, por ter concedido bolsa de estudos através do Programa de Qualificação Institucional – PQI, possibilitando a parceria entre a UEPB/UFPB-LTF.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

“... De tudo ficaram três coisas, a certeza de que estaremos sempre começando, de que é preciso continuar e de que seremos interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho, da queda um passo de dança, do medo uma ponte, da procura um encontro...”.

Fernando Sabino

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE GRÁFICOS	XII
LISTA DE QUADROS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Patogênese microbiana	25
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	28
3.1.3 <i>Pseudomonas</i>	29
3.1.4 Fungos leveduriformes	29
3.2 Antimicrobianos	30
3.2.1 Mecanismos de ação de alguns antimicrobianos	32
3.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos	38
3.3.1 Mecanismos genéticos de aquisição de resistência aos antimicrobianos	40
3.3.2 Plasmídeos	42
3.3.3 Transposons (Tn)	44
3.4 Aspectos botânicos e fitoquímicos da <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae)	45
3.4.1 <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez (Lauraceae)	45
3.4.2 Alcamidas de plantas	46
3.4.3 Riparinas	47

4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Local da pesquisa.....	52
4.2 Material.....	52
4.2.1 Obtenção dos produtos sintéticos	52
4.2.2 Linhagens microbianas.....	52
4.2.3 Meios de cultura	53
4.2.4 Substâncias.....	53
4.3 Métodos.....	54
4.3.1 Obtenção da <i>O</i> -metil- <i>N</i> -(benzoil)-tiramina (riparina I).....	54
4.3.2 Obtenção da <i>O</i> -metil- <i>N</i> -(2-hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II).....	55
4.3.3 Obtenção da <i>O</i> -metil- <i>N</i> -(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina III)	55
4.3.4 Obtenção das soluções de riparinas	56
4.3.5 Isolamento e identificação de bactérias.....	57
4.3.6 Suspensão bacteriana.....	57
4.3.7 Isolamento e identificação de leveduras.....	58
4.3.8 Suspensão de leveduras	58
4.3.9 Determinação da atividade antimicrobiana – Triagem.....	59
4.3.10 Estudo do efeito das riparinas sobre a cinética bacteriana.....	62
4.3.11 Estudo do efeito das riparinas sobre a cinética fúngica.....	64
4.3.12 Determinação da caracterização fenotípica dos padrões de resistência aos antimicrobianos – Perfil de sensibilidade.....	66
4.3.13 Tratamento por riparinas I, II e III, obtidas a partir da <i>A. riparia</i> – Avaliação da atividade curagênica	66
4.3.14 Estudo da relação estrutura/atividade antimicrobiana das riparinas.....	68
4.3.15 Análise estatística.....	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Resistência antimicrobiana.....	70
5.2 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de riparinas	72
5.2.1 Frente às cepas padrões ATCC	72
5.2.2 Frente às Cepas de <i>S. aureus</i>	72
5.2.3 Frente às cepas de <i>E. coli</i>	75
5.3 Determinação da CIM e da CBM.....	75
5.4 Classificação do perfil fenotípico das cepas de <i>S. aureus</i>	79
5.5 Avaliação da relação estrutura-atividade antimicrobiana das riparinas	80

5.6 Avaliação da cinética bacteriana	83
5.7 Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> de riparinas sobre linhagens de <i>Candida albicans</i>	90
5.8 Avaliação da cinética fúngica	91
5.9 Avaliação da atividade curagênica	92
6 CONCLUSÕES	98
7 PERSPECTIVAS.....	100
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Agar Müeller-Hinton
AS	Agar Sangue
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAB	Blood Agar Base
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CB	Cinética Bacteriana
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Enfermidades
CF	Cinética Fúngica
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CHM	Caldo Mueller-Hinton
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CS	Caldo Sabouraud
DCC	Dicloro Diciano Carbodiimida
DMSO	Dimetil-Sulfóxido
HCl	Ácido Clorídrico
MH	Müeller-Hinton
MIC	Minimum Concentration Inhibitory
MLS	Macrolídeos-Lincosamídeos-Estreptogramina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus Methicillin Resistant</i>
MSSA	<i>Staphylococcus aureus Methicillin Sensitive</i>
MRD	Mecanismo de Resistência Multidrogas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	<i>Protein Binding Penicillin</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plasmídeo de resistência.....	44
Figura 2. Foto de exsicata de <i>Aniba riparia</i>	46
Figura 3. Reação geral para síntese de riparina I - Acoplamento do éster metílico da tiramina com o cloreto de benzoila.....	54
Figura 4. Reação geral para síntese de riparina II - Acoplamento de éster metílico da tiramina com o salicilato de metila.....	55
Figura 5. Reação geral para síntese de riparina III - Acoplamento de éster metílico da tiramina com os ácidos 2,6 dihidroxibenzóico	56
Figura 6. Placa de microdiluição.....	60
Figura 7. Fluxograma da cinética bacteriana.....	63
Figura 8. Fluxograma da cinética fúngica	65
Figura 9. Fluxograma para avaliação da atividade curagênica.....	67
Figura 10. Perfil de suscetibilidade por difusão em meio sólido, da cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 frente às riparinas I, II e III nas concentrações de 400(1), 200(2), 100(3) e 50(4) µg/mL	77
Figura 11. Determinação da CIM e CBM da riparina III frente a linhagens de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (1), 122U (2), 146U (3), 223U (4), 312U (5), 319U (6), 129FN (7), 233FN (8), 322FN (9), 1A (10), 46c (11), 50c (12) nas concentrações de 400(A), 200 (B), 100 (C), 50 (D), 25 (E) e 12,5 (F) µg/mL	78
Figura 12. Demonstração do crescimento bacteriano (a) e do efeito da riparina III sobre a cepa de <i>S. aureus</i> 319U (b) em diferentes espaços de tempo..	88
Figura 13. Efeito bactericida da riparina III sobre <i>S. aureus</i> após exposição por 24h/37°C.....	89
Figura 14. Variantes da linhagem 319U após tratamento com riparina III, placa matriz – BAB (a) e placa “imprint” - BAB-penicilina (b).....	95

Figura 15. Antibiograma da linhagem 319U antes do tratamento de cura pela exposição à riparina III (a) e de sua “variante” sensível à penicilina após o tratamento (b)	96
Figura 16. E-test para penicilina da linhagem de <i>S. aureus</i> 319U antes (a) e após exposição à riparina III – confirmação de cura (b)	96
Figura 17. Determinação da CIM para penicilina por E-test em “variantes” 319U ...	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparação do efeito das riparinas frente às cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	82
Gráfico 2. Cinética bacteriana da cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 frente às riparinas.....	84
Gráfico 3. Cinética bacteriana da cepa de <i>S. aureus</i> 319U frente às riparinas.....	85
Gráfico 4. Cinética bacteriana da cepa de <i>S. aureus</i> 122U frente às riparinas.....	86
Gráfico 5. Cinética fúngica da cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 76643 frente à riparina III.....	92
Gráfico 6. Frequência da eliminação da marca de resistência à penicilina por riparinas em <i>S. aureus</i> linhagem 319U.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	42
Quadro 2. Características gerais das riparinas obtidas a partir da <i>Aniba riparia</i> (Ness) Mez (Lauraceae).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Identificação e origem das cepas microbianas testadas	53
Tabela 2.	Comportamento das cepas de <i>S. aureus</i> frente aos antimicrobianos ...	71
Tabela 3.	Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de riparinas frente às cepas padrões ATCC.....	72
Tabela 4.	Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> das cepas de <i>S. aureus</i> frente às riparinas.....	73
Tabela 5.	Comportamento das cepas de <i>E. coli</i> frente às riparinas	75
Tabela 6.	Determinação da CIM e da CBM das riparinas frente às cepas de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> por difusão em meio sólido.....	76
Tabela 7.	Classificação dos perfis fenotípicos das cepas de <i>S. aureus</i>	80
Tabela 8.	Apresentação da relação estrutura–atividade antimicrobiana de riparinas frente a <i>S. aureus</i> (n = 22).....	81
Tabela 9.	Avaliação do efeito das riparinas frente às cepas de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	82
Tabela 10.	Cinética bacteriana da cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, frente às riparinas.....	84
Tabela 11.	Cinética bacteriana da cepa de <i>S. aureus</i> 319U frente às rparinas.....	85
Tabela 12.	Cinética bacteriana da cepa de <i>S. aureus</i> 122U frente às riparinas.....	86
Tabela 13.	Perfil de suscetibilidade das cepas de <i>C. albicans</i> frente às riparinas.....	90
Tabela 14.	Cinética fúngica e efeito <i>in vitro</i> da riparina III sobre <i>C. albicans</i> ATCC 76643.....	91
Tabela 15.	Linhagens de <i>S. aureus</i> com marcas de resistência para penicilina e eritromicina	93
Tabela 16.	Freqüência da eliminação da marca de resistência à penicilina por riparinas em linhagens de <i>S. aureus</i>	94

RESUMO

CATÃO, R.M.R. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITOS BIOLÓGICOS DE RIPARINAS SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES.** João Pessoa, Tese de Doutorado. 2007. 126p. Universidade Federal da Paraíba.

A síntese de novas substâncias com atividade farmacológica representa um grande desafio, sendo o maior deles, a transformação de produtos de plantas medicinais em substâncias medicamentosas. Nessa pesquisa objetivou-se avaliar a relação estrutura/atividade antimicrobiana *in vitro* das riparinas I, II e III, obtidas por síntese a partir da *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), planta típica da região amazônica, sobre cepas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* e sobre cepas multirresistentes de *S. aureus*. Foram avaliadas a atividade antimicrobiana e a frequência de cura de plasmídeos de resistência à penicilina e à eritromicina em *S. aureus*. A atividade antimicrobiana foi determinada pela mensuração das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM), pelas técnicas de medição de halos, microdiluição em placas e determinação dos níveis de resistência através das Cinéticas Bacteriana (CB) e Fúngica (CF). Duas amostras representativas de *S. aureus* (linhagens 319U e 122U), com marcas de resistência plasmidial para penicilina e eritromicina foram selecionadas para avaliação da atividade curagênica sobre plasmídeos, após 24 horas de exposição frente às riparinas, na concentração sub-inibitória ($1/2$ CIM = 100 µg/mL). Não foi observada a eliminação da marca de resistência para eritromicina nessas linhagens após tratamento pelas riparinas. Apenas a riparina III foi capaz de produzir reversão fenotípica na linhagem 319U a qual teve sua marca de resistência à penicilina eliminada numa frequência de 61,7%. Todas as riparinas apresentaram atividade antimicrobiana sobre as linhagens de *S. aureus*. As CIMs demonstraram que as riparinas I e II apresentaram efeito bacteriostático sobre *S. aureus* enquanto que a riparina III apresentou efeito bactericida e ação curagênica eliminando a marca de resistência para penicilina, na concentração sub-inibitória. O desenvolvimento de novos agentes bactericidas pode ser alcançado pela elaboração racional de novas gerações de antimicrobianos visando minimizar a resistência, através do descobrimento de produtos naturais e sintéticos bioativos.

PALAVRAS-CHAVE: Riparinas; Atividade antimicrobiana; Cura de Plasmídeos; Bactérias; Leveduras.

ABSTRACT

CATÃO, R.M.R. **ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND BIOLOGICAL EFFECTS OF RIPARINS IN BACTERIA AND YEAST-LIKE FUNGI.** João Pessoa. Tese de Doutorado, 2007. 126p. Universidade Federal da Paraíba.

The synthesis of new substances with pharmacological activity represents a great challenge, and the greatest of all is the transformation of products from medicinal plants into medical substances. In this research study, the objective was to evaluate the antimicrobial structure/activity relation *in vitro* of riparinas I, II and III, obtained by synthesis from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), plants which are typical of the Amazon region, over strains of standard ATCC of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*, as well as multiresistant samples of *S. aureus*. The antimicrobial activity and the frequency of curing of plasmids of resistance to penicillin and to erythromycin were evaluated in *S. aureus*. The antimicrobial activity was determined by the measuring the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC), by using the technique for halo measurement, microdilution in plates and determining resistance levels by means of Bacterial Kinetics (BC) and Fungic Kinetics (CF). Two representative strains of *S. aureus* (lineages 319U and 122U) with marks of plasmidial resistance to penicillin and erythromycin were selected to the evaluate curagenic activity over plasmids, after 24 hours of being exposed to riparins, on the sub-inhibitory concentration ($1/2$ MIC = 100 µg/mL). It was observed that only riparin III was able to produce phenotypic reversion on lineage 319U, which had its mark of resistance to penicillin eliminated on a frequency of 61,7%. The riparins presented antimicrobial activity over the lineages of *S. aureus*. The MICs demonstrated that riparins I and II presented a bacteriostatic effect over of *S. aureus*, while riparin III presented a bactericide effect and curagenic action, thus losing their mark of resistance to penicillin on a sub-inhibitory concentration. The development of new bactericide agents might be reached by the rational elaboration of new generations of antimicrobial, which aim at minimizing the resistance, through the discovery of natural and synthetic bioactive products.

KEY-WORDS: Riparins; Antimicrobial activity; Curing of Plasmids; Bacteria; Yeasts.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O reino vegetal ocupa lugar de destaque, devido à possibilidade de utilização diversificada, tanto para fins alimentícios quanto para fins medicamentosos. Durante milhões de anos, os organismos incluídos no reino vegetal sofreram modificações para melhor adaptarem-se ao meio ambiente. Esses processos anátomo-fisiológicos deu-lhes a capacidade da síntese do próprio alimento e foi chamado de metabolismo de ordem primária, que inclui a biossíntese de lipídeos, proteínas e carboidratos. Os vegetais possuem mecanismos reguladores que os ajudam a desempenhar suas funções vitais (DI STASI, 1996; YAMADA, 1998; DIAS, 2001).

Por meio desses mecanismos, chamados em seu conjunto de metabolismo de ordem secundária, a planta consegue elaborar substâncias (metabólitos secundários), que desempenham papéis específicos em casos de estresse, crescimento, reprodução, capacidade para repelir organismos invasores, atrair insetos ou pássaros, que são necessários para a polinização e adaptação às mudanças físico químicas do meio externo (BEART, et al., 1985; CARVALHO; SARTI, 1995; MACHADO et al., 1995; DI STASI, 1996).

Devido a estas características, são atribuídas diversas ações biológicas aos princípios químicos vegetais, podendo-se dizer que a planta se constitui num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução (DI STASI, 1996; SALLÉ, 1996; VON POSER; MENTZ; SCHENKEL, 2000; DIAS, 2001; MONTANARI; BALZANI, 2001). Desse laboratório natural o homem se aproveita para obter substâncias que possam contornar a resistência aos antimicrobianos convencionais.

Por um longo período de tempo, as plantas foram usadas como as principais fontes de produtos naturais para a manutenção da saúde humana (GOTTLIEB; BORIN, 2002). As principais classes de compostos antimicrobianos de origem vegetal são fenóis, terpenos, alcalóides, lecitinas, polipeptídeos e poliacetilenos. Além das citadas, outras substâncias de origem vegetal mostram certa atividade antimicrobiana, como: poliaminas, isotiocianatos, tiosulfinais e glicosídeos (NOGUEIRA, 2000).

Com a descoberta dos antibióticos e com o avanço da indústria farmacêutica, que permitiu a criação dos medicamentos obtidos de síntese, alguns produtos

naturais utilizados até então, caíram em desuso durante o pós-guerra. Entretanto, o aparecimento de microrganismos resistentes às drogas, os altos níveis de resíduos tóxicos nos alimentos, aliados ao desequilíbrio ecológico causado pelo homem, fizeram com que se buscassem alternativas compatíveis com o modo de vida humana, nas mais diversas facetas do bem-estar bio-psico-social.

Atualmente em todo o mundo, são aproveitados os recursos naturais com bons resultados. Sob esse aspecto, a flora se torna o campo para a investigação de soluções satisfatórias e criativas, originando diversas pesquisas sobre produtos de origem natural. Na literatura científica emergem a todo o momento, trabalhos cujo objeto de estudo é a obtenção de agentes antimicrobianos de extratos vegetais (COUTINHO et al., 2004).

Nas últimas décadas, devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas de isolamento e elucidação estrutural, foram descobertos cerca de 50.000 novos metabólitos secundários isolados de plantas, muitos deles sem qualquer ou com pouca avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Sobre este prisma, a busca de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana, se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo assim com a melhoria da qualidade de vida, conforme estabelece a Carta Européia do Ambiente e da Saúde, publicada pela OMS em 1989 (DÉOUX; DÉOUX, 1998).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular em várias partes do mundo (ARAÚJO; LEON, 2001). Aproximadamente 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento são quase completamente dependentes da medicina caseira utilizando plantas para suas necessidades básicas de saúde (BARBOSA-FILHO, 1997; CAETANO et al., 2002). Grande parte da população brasileira consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase que exclusivamente de medicamentos de origem natural (FUNARI; FERRO, 2005).

As espécies do gênero *Aniba*, árvore da família Lauraceae, nativa da região amazônica é conhecida popularmente como “louro” (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000), e “pau-rosa” (MARQUES, 2001), destacam-se pelo alto valor econômico, devido à constituição do óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca. Aproximadamente 40 espécies de *Aniba*

ocorrem no Brasil e podem ser divididas em 3 grupos de acordo com a natureza química do constituinte predominante no óleo essencial: do linalol, do benzoato e do albenzeno (MARQUES, 2001).

A quimiodiversidade e a potencialidade farmacológica da flora brasileira são imensuráveis e permite o estudo de plantas nativas de cada região bem como o estudo de plantas exóticas na Paraíba como é o caso da *Aniba riparia* (Nees) Mez, árvore da família Lauraceae, considerada uma das mais primitivas famílias, cujos primeiros registros datam de 2.800 a.C. sendo originárias da Grécia antiga. As Lauraceae destacam-se das demais famílias pela sua importância econômica, sendo algumas espécies utilizadas na medicina popular e nas indústrias de perfumaria e química (MARQUES, 2001).

Na medicina popular, as Lauraceae apresentam utilizações variadas, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças. Deve-se ressaltar, entretanto, que o uso das plantas deve ser feito com critérios e com eficácia terapêutica conhecida (MARTINS; SANTOS, 1995).

Segundo Barbosa-Filho et al. (1987), do ponto de vista fitoquímico, *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), apresenta uma classe especial de alcalóides contendo uma função alcaloide, restrito a poucos representantes na natureza. Após a elucidação estrutural de um dos seus compostos o (O-metil-)-N-(2-hidroxibenzoil) tiramina verificou-se que, biogeneticamente, esta molécula é resultado da condensação de duas substâncias: o éter metílico da tiramina, agente simpaticomimético, e o ácido salicílico, agente queratolítico e antimicótico.

A partir daí despertou-se a curiosidade de se verificar a potencialidade farmacológica deste produto natural, de modo que este e outros análogos foram sintetizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba. Três são de ocorrência natural e foram isoladas pela primeira vez da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), sendo chamadas de riparinas I, II e III, denominação esta para fazer referência à planta de origem. Estes produtos foram submetidos a ensaios farmacológicos, observando-se que o composto mais ativo da série sintética é o (O-metil-)-N-(2,6-dihidroxibenzoil) tiramina, riparina III (BARBOSA-FILHO, 1997).

A síntese de novas substâncias, com atividade farmacológica significou um grande avanço tecnológico e o estudo químico e farmacológico dos produtos naturais representa um grande desafio, sendo o maior deles, o interesse pela transformação desses produtos obtidos de plantas medicinais em substâncias medicamentosas.

É provável que novos e revolucionários antimicrobianos não sejam descobertos em um futuro próximo. Porém, é importante que os agentes existentes sejam sabiamente empregados a fim de que se possa reduzir a emergência e a disseminação de bactérias resistentes. São necessários estudos sobre a concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e cinética bacteriana (CB), relacionados à determinação da ação curagênica na remoção de plasmídeos, de modo que se possa impedir ou mesmo minimizar a transferência plasmidial de resistência a antibióticos, levando à reversão do fenótipo de resistência para sensibilidade.

É com esse propósito que essa pesquisa visa à análise dos efeitos biológicos das riparinas obtidas por síntese a partir da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), sobre microrganismos multirresistentes, isolados de infecções humanas, animais ou de amostras ambientais. É importante também, avaliar a ação curagênica desses produtos sobre plasmídeos em bactérias e sua ação sobre leveduras, possibilitando de alguma forma a limitação da emergência da resistência aos antimicrobianos.

A relevância desse estudo consiste na possibilidade de contribuir para a prevenção de linhagens multirresistentes.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*, dos substratos sintéticos, Riparina I, II e III, inicialmente obtidos a partir da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) sobre cepas padrões *American Type Culture Collection* - ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e também sobre cepas de *S. aureus* de origem humana, animal e ambiental, verificando a que grupo farmacológico (bacteriostático ou bactericida) pertencem e estudar os efeitos biológicos da ação desses compostos sobre plasmídeos de resistência a drogas em linhagens de *S. aureus*.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das riparinas I, II e III sobre amostras ambulatoriais e padrões ATCC de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.
- Determinar as Concentrações: Inibitória Mínima (CIM), Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM) das riparinas ativas, pela técnica de microdiluição em placas e pelo método cavidade-placa, sobre as cepas ATCC.
- Determinar as Cinéticas: Bacteriana (CB) e Fúngica (CF) das riparinas I, II e III, sobre cepas que apresentaram sensibilidade aos respectivos substratos.
- Avaliar a relação estrutura/atividade das riparinas I, II e III em amostras ambulatoriais e padrão ATCC de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.
- Caracterizar fenotipicamente as cepas de *S. aureus*, utilizadas neste estudo, com relação aos padrões de resistência a antibióticos.
- Avaliar a ação das riparinas I, II e III na eliminação de plasmídeos de resistência à penicilina e eritromicina em cepas de *S. aureus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Patogênese microbiana

Dentre os principais microrganismos responsáveis por processos infecciosos, freqüentemente isolados em humanos, e que apresentam elevada resistência aos antimicrobianos, destacam-se: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (TRABULSI et al., 2006). Entretanto, outros microrganismos considerados emergentes, como *Listeria monocytogenes* e fungos, também têm sua importância devido à gravidade dos processos infecciosos por eles causados, principalmente quando atingem pacientes imunossuprimidos fisiológica ou patologicamente. Em geral, o quadro clínico da listeriose é de extrema severidade caracterizando-se primordialmente, pela meningite e septicemia (HOFER, 2001). Entre os fungos leveduriformes, *Candida albicans* é a espécie isolada com maior freqüência em infecções superficiais e/ou subcutâneas (COLEMAN et al., 1998; TRABULSI et al., 2006).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Esses microrganismos pertencem à família Micrococaceae, são caracterizados morfo-tintorialmente como cocos Gram-positivos que crescem agrupados formando “cachos” irregulares (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). O gênero *Staphylococcus* é constituído por várias espécies, sendo algumas produtoras da enzima coagulase além de outros componentes de superfícies, considerados fatores de virulência, utilizados na identificação e diferenciação deste gênero, através de suas propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas (NOVAK, 2000).

Trata-se de uma das bactérias mais resistentes não formadoras de esporos. São relativamente termo-resistentes e capazes de sobreviver por longos períodos em objetos inanimados secos. Essas propriedades permitem ao *S. aureus* sobreviver em qualquer tipo de ambiente onde se encontram seres humanos. São considerados como potentes patógenos e são amplamente encontrados na biota humana, podendo causar vários processos infecciosos piogênicos, algumas vezes levando à formação de abscessos em tecidos profundos, podendo produzir enfermidades mórbidas distintas por meio da produção de toxinas específicas

(TRABULSI et al., 2006; BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; NOVAK, 2000; KURODA et al., 2001).

A patogênese atribuída ao *S. aureus* é devida ao número de fatores de virulência na forma de toxinas, enzimas e proteínas associadas à parede celular, mediados por genes plasmidiais ou cromossômicos, que combinados conduzem à doença (CARDOSO, 1998; PEREIRA, 2000).

O potencial patogênico deste microrganismo está associado à diferenciada capacidade de mutação para formas resistentes, exigindo reavaliações periódicas de seu perfil de susceptibilidade (ZAVADINACK-NETTO, et al., 2001). Esses microrganismos são capazes de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos quase imediatamente após a sua introdução no mercado. Atualmente muitas cepas são resistentes a quase todos os antimicrobianos e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos disponíveis, constitui uma séria preocupação (SCHAECHTER et al., 2002).

Um dos principais aspectos da resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos, é que ela pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídeos (DYKE; RICHMOND, 1967; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005; YAMADA et al., 2006), além do uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos na clínica médica humana e veterinária que tem causado efeito seletivo no surgimento e manutenção de resistência às drogas (PEREIRA, 2000; COELHO et al., 2007).

Particularmente, *S. aureus*, possui versatilidade no desenvolvimento de resistência a vários agentes antimicrobianos, contribuindo para a sua sobrevivência em ambientes hospitalares e difusão entre pacientes, como é o caso do *S. aureus* resistente à meticilina (*Staphylococcus aureus* Methicillin Resistant - MRSA) e que geralmente, também, é resistente às cefalosporinas, tetraciclinas, aminoglicosídeos, rifampicina (GILLESPIE; MCHUGH, 1997). Esses microrganismos possuem três diferentes mecanismos de resistência à meticilina: 1) hiperprodução de beta-lactamases; 2) presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP – *Protein Binding Penicilin*) alterada, denominada PBP 2a; 3) modificações na capacidade de ligação das PBPs, podendo os três mecanismos estarem presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005; YAMADA et al., 2006).

Os mecanismos pelos quais os genes de resistência se movimentam entre os microrganismos, são complexos. Em *S. aureus* a resistência múltipla resulta principalmente da presença de plasmídeos, que geralmente se encontram em múltiplas cópias, o que permite sua transferência em uma frequência elevada (FORBES; SHABERG, 1983; PEREIRA, 2000). A transferência de resistência plasmidial, também pode envolver processos de transdução, os quais estão relacionados à ação de uma partícula viral (TRABULSI et al., 2006).

Outra estratégia da resistência em *S. aureus*, é a aquisição de genes de resistência no cromossomo, produzindo multirresistência a maioria das drogas usadas na prática clínica, como é o caso da linhagem de MRSA. Também há relatos de envolvimento de transposons para várias marcas de resistência em *S. aureus* (LYON; SKURRAY, 1987). Várias pesquisas foram realizadas em amostras de *S. aureus*, no intuito de se obter esclarecimentos sobre a localização e interação dos genes de resistência cromossomial ou em outros elementos genéticos como plasmídeos, transposons e bacteriófagos (KURODA et al., 2001).

Algumas cepas MRSA são associadas a infecções nosocomiais, no entanto existem relatos de casos em pessoas saudáveis e sem fatores de risco conhecidos para desenvolvimento deste tipo de infecção (NAINI et al., 2003; BERNARDES, JORGE; LEÃO, 2004). Algumas linhagens de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) também apresentam resistência a potentes β -lactâmicos (KURODA et al., 2001).

No Brasil, Pereira et al. (1997), demonstraram pela primeira vez, transferência de resistência à tetraciclina, por conjugação mediada por fago, em linhagens de *S. aureus* bovinas para linhagem de laboratório de origem humana, indicando que a conjugação pode desempenhar um importante papel na disseminação de resistência a drogas em condições naturais.

Além da resistência a vários antimicrobianos, *S. aureus* pode ainda apresentar resistência a íons metálicos (arsenato, cádmio, mercúrio) e a biocidas, tais como acriflavina, cloreto de benzalcônio, ceftrímida e ciclohexidina. A seleção e manutenção destas marcas de resistência se explicam pela presença desses agentes, como poluentes urbanos ou industriais ou mesmo o uso hospitalar como anti-séptico (RUSSEL, 1997).

Para destruir as bactérias, muitos antibióticos se ligam a proteínas da família PBP de forma a torná-las inativas. Essas proteínas estão envolvidas na construção da parede celular dos microrganismos. Sem a parede corretamente montada, as bactérias não podem manter sua integridade e morrem. O principal caminho usado pelas bactérias para se tornar resistente a meticilina (oxacilina), envolve a aquisição do gene *mecA*. Esse gene comanda a síntese da proteína PBP2a (adquirida ou alterada), que não é desativada pelos antibióticos e é capaz de formar a parede celular da bactéria. No entanto PBP2a, não age sozinha; sua atividade está associada a várias outras proteínas codificadas pelo DNA da própria bactéria e pela PBP2 (inata). A resistência ocorre pela incapacidade de agentes β -lactâmicos se ligarem a essa PBP interferindo na síntese da parede celular bacteriana (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Em bactérias Gram positivas, a resistência a macrolídeos, pode acontecer através de bomba de efluxo e pela produção de uma enzima metilase que atua na porção 23S do RNA ribossômico, codificada pelo gene *erm*, e pode conferir resistência cruzada a outras classes de drogas como lincosaminas e estreptograminas. Este fenótipo de resistência é conhecido como MLS (macrolídeos-lincosamídeos-estreptogramina) e pode ser constitutivo ou induzível. O fenótipo constitutivo pode ser facilmente detectado pelo antibiograma, observando-se resistência aos macrolídeos, estreptograminas e lincosaminas. Quando o fenótipo é induzível pode-se observar *in vitro* resistência a eritromicina e sensibilidade à clindamicina, através do teste de indução, conhecido por D-teste (NCCLS, 2004).

3.1.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende várias espécies, entretanto a única espécie de importância prática é *Escherichia coli* a qual se caracteriza por causar diversos processos patológicos, tanto no seu habitat natural, o trato intestinal, quanto fora dele. *E. coli* é a causa mais comum de infecção urinária, sendo responsável por 90% ou mais das infecções adquiridas na comunidade. Pode também causar, meningite em recém-nascidos e bacteremias, sendo as fontes mais comuns os tratos urinário e gastrointestinal, cateteres intravenosos, aparelhos respiratórios e pele. Essa espécie compreende grande número de grupos e tipos sorológicos distintos, identificados por meio de anti-soros específicos. Atualmente,

vem apresentando crescente resistência aos agentes antimicrobianos. Esta resistência em parte é também plasmidial (KONEMAN et al., 2001; MIMS et al., 2005; TRABULSI et al., 2006).

3.1.3 *Pseudomonas*

Gênero de microrganismos que compreende mais de 100 espécies são bastonetes curtos e Gram-negativos. Do ponto de vista clínico, a espécie mais importante do gênero é *Pseudomonas aeruginosa*. Considerado um patógeno oportunista, pode ser encontrado no solo e na água; possui necessidades nutricionais mínimas e é capaz de sobreviver sob condições ambientais bastante diversas. Devido a essa adaptabilidade e à sua resistência tanto intrínseca quanto adquirida, aos antimicrobianos mais comuns, o gênero *Pseudomonas*, encontra no hospital um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (SCHAECHTER et al., 2002), sendo causa freqüente de infecções nosocomiais, e agente causal de inúmeras infecções humanas.

P. aeruginosa é um patógeno importante, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, com fibrose cística, queimaduras e diabetes (TRABULSI, et al., 1999; SCHAECHTER et al., 2002). Também apresenta importância em estudos relacionados a microbiologia de alimentos, pois são microrganismos causadores de deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

3.1.4 Fungos leveduriformes

Dentre os fungos leveduriformes o gênero *Candida* destaca-se por ser responsável por várias micoses oportunistas, ou seja, micoses causadas por fungos de baixa virulência que convivem pacificamente com o hospedeiro, mas, ao encontrar condições favoráveis, como distúrbios do sistema imunodefensivo, desenvolvem seu poder patogênico invadindo tecidos. Atingem indivíduos de ambos os sexos, de todas as raças e faixas etárias (GOMPertz et al., 1999).

O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no âmbito hospitalar e constitui causa relevante de infecções na corrente sanguínea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). O agente mais freqüente é *Candida albicans*,

porém outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* podem ser encontradas em diversos processos patológicos (GOMPertz et al., 1999). Alguns processos patológicos envolvendo espécies emergentes, como *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. utilis* e *C. inconspicua* entre outras, também tem sido descritos (COLEMAN et al., 1998).

O aumento das infecções por *Candida* spp. deve-se entre outros fatores, aos tratamentos com antimicrobianos de amplo espectro, ao uso de nutrição parenteral, de cateteres intravenosos e de entubação endotraqueal. A maior frequência ocorre em pacientes imunossuprimidos e/ou submetidos a cirurgias de grande porte (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Vários são os fatores de virulência encontrados nas espécies de *Candida*, entre eles destacam-se a produção de toxinas e enzimas proteolíticas extracelulares, que constitui os mais importantes fatores relacionados ao desencadeamento das infecções fúngicas. A produção de fosfolipases e adesinas pela *C. albicans* também são componentes importantes no reconhecimento e disseminação hematogênica (ZARDO; MEZZARI, 2004).

3.2 Antimicrobianos

Com base nas propriedades farmacológicas, as substâncias antimicrobianas podem ser divididas em dois grupos principais: bactericida e bacteriostático. O primeiro, inclui as substâncias que exibem propriedades de eliminação de microrganismos em função da concentração como fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Para este grupo, quanto maior a concentração da droga, mais rápida a erradicação dos microrganismos. O segundo grupo inclui as substâncias capazes de impedir a multiplicação da população bacteriana, cujo pico das concentrações é pouco relevante. O tempo durante o qual as concentrações são mantidas acima da Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) é crítico para a erradicação bacteriana. Neste grupo, estão as drogas independentes da concentração, ou seja, são drogas dependentes do tempo de uso exposição ou contato. Na prática, os antimicrobianos bacteriostáticos, são geralmente eficazes (AGUIAR, 2003).

De um modo geral, um agente bactericida que cause a morte rapidamente de microrganismos é preferível a um agente bacteriostático que inibe reversivelmente o crescimento microbiano. No entanto, a preferência na clínica médica e veterinária, pelo uso de agentes bactericidas depende de várias circunstâncias relacionadas ao processo infeccioso. Por exemplo, a eritromicina, um inibidor da síntese protéica, é um agente bacteriostático, mas interrompe bruscamente a síntese de toxinas protéicas; a penicilina, ao contrário, é bactericida, mas não imediatamente, de modo que, durante um intervalo de tempo até que a substância exerça seu efeito lítico; e os microrganismos continuam a produzir toxinas (AGUIAR, 2003; TRABULSI et al., 2006).

A distinção entre bacteriostático e bactericida não deve ser tomada de forma absoluta. Primeiro, porque a ação da droga pode diferir em distintos organismos; segundo, porque algumas drogas apresentam cinética de ação peculiar, o que as torna de difícil classificação. Em outros casos, a combinação de duas substâncias bacteriostáticas pode induzir uma ação bactericida (SCHAECHTER et al., 2002).

É importante ressaltar, a necessidade de desenvolver pesquisas que busquem outras maneiras de atuação das drogas, tais como a capacidade de inibir fatores de virulência, como toxinas e adesinas. No entanto, estas drogas não afetariam o crescimento de microrganismos *in vitro* e, por conseguinte sua ação se manifestaria apenas *in vivo* (SCHAECHTER et al., 2002).

A farmacocinética e a farmacodinâmica estão inter-relacionadas, de modo que as propriedades farmacocinéticas de uma droga caracterizam o aumento e a queda das concentrações da droga no sangue e no tecido no decorrer do tempo. Os parâmetros farmacodinâmicos integram a atividade microbiológica e farmacocinética de uma droga antimicrobiana, focalizando seus efeitos biológicos, especialmente a inibição do crescimento e a eliminação de patógenos (BURGESS, 2000).

A transferência de material genético entre organismos da mesma ou de diferentes espécies desempenha um papel crucial na evolução da resistência aos antimicrobianos. Por exemplo, em *S. aureus*, essa transferência pode ocorrer por transformação, transdução e processos que envolvem contato entre as células, mediada por fagos ou conjugação propriamente dita. Alguns fatores podem afetar a transferência conjugativa de plasmídeos, como a composição do meio, pH e temperatura. Antibióticos como a gentamicina e a vancomicina estimulam a

freqüência de transferência de 10 a 20 vezes enquanto meticilina e alguns inibidores da síntese de proteínas reduzem essa freqüência (AL - MASAUDI et al., 1991).

A resistência mediada por plasmídeos, pode ser simples, porém na maioria das vezes é múltipla, tornando a bactéria, resistente a dois ou mais antimicrobianos. Isto ocorre devido à presença de genes de resistência, para diferentes antimicrobianos, num só plasmídeo (TRABULSI et al., 2006). Geralmente, a multirresistência a antimicrobianos, resulta da presença de plasmídeos em múltiplas cópias, o que garante a sua distribuição durante a divisão celular e permite a transferência sem causar na maioria das vezes um custo biológico para a célula bacteriana (TOMAZ, 1994; PEREIRA; SIQUEIRA, 1995).

Os plasmídeos podem ser inativados ou removidos da célula, curados, depois de serem submetidos a diferentes condições de estresse, como mudanças na temperatura de incubação e presença de determinadas substâncias adicionadas aos meios de cultura. A eliminação de plasmídeos está bem estabelecida através de uma variedade de compostos, como os corantes de acridina, brometo de etídio, rifampicina, sal de bis-amônio, tioridazina (uma fenotiazina), assim como também antibióticos inibidores da sub-unidade B da DNA-girase, novobiocina, e coumermicina (HOOPER et al., 1984; WEISSER; WIEDMANN, 1985; PEREIRA, 2000).

Recentemente, alguns autores relataram a eliminação de resistência aos fármacos tetraciclina, estreptomicina e penicilina por concentrações sub-inibitórias de fluorquinolonas, em cepas de *S. aureus* de origem bovina (PEREIRA et al., 2004) e pelo extrato metanólico de *Punica granatum* em cepas de *S. aureus* (MRSA e MSSA) de origem clínica (BRAGA et al., 2005).

3.2.1 Mecanismos de ação de alguns antimicrobianos

- **β -lactâmicos (Penicilina)**

Todos os β -lactâmicos (cefalosporinas, oxacilinas, meticilina e outras penicilinas) caracterizam-se por apresentarem um anel β -lactâmico que é essencial para a sua atividade antibacteriana (MACEDO et al., 2005).

Embora o mecanismo de ação das penicilinas (moléculas caracterizadas por anel tiazolidínico e β -lactâmico), ainda não tenha sido completamente determinado, sua atividade bactericida inclui a inibição da síntese da parede celular e a ativação do sistema autolítico endógeno da bactéria. Esse processo ocorre através da inativação da transpeptidação na formação do peptidoglicano (inibidor de enzimas autolíticas) da parede celular levando à lise da bactéria (RANG et al., 2000; BRAOIOS, 2005).

A ação da penicilina depende da parede celular que contém na sua composição, peptidoglicano. Durante o processo de replicação bacteriana, a penicilina inibe as enzimas que fazem a ligação entre as cadeias peptídicas, impedindo, portanto, o desenvolvimento da estrutura normal do peptidoglicano. Estas enzimas, transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase, localizam-se logo abaixo da parede celular e são denominadas PBPs. A habilidade de penetrar na parede celular e o grau de afinidade destas proteínas, com a penicilina, determinam a sua atividade antibacteriana (RANG et al., 2000; KONEMAN et al., 2001).

As bactérias podem desenvolver resistência aos β -lactâmicos através de três mecanismos: prevenção da interação entre o antimicrobiano e a PBP alvo, incapacidade de se ligar à PBP e hidrólise do antimicrobiano por β -lactamases. Existem vários tipos de enzimas β -lactamases, que são classificadas pela sua seqüência de aminoácidos e divididas em quatro classes (A, B, C e D) baseadas em suas estruturas e substratos específicos (MACEDO et al., 2005). As β -lactamases rapidamente se disseminam e são encontradas em muitos isolados clínicos tanto de *S. aureus* quanto em outras espécies de *Staphylococcus* (RANG et al., 2000).

O uso indiscriminado da penicilina favoreceu a grande emergência de resistência em *S. aureus*. Essa resistência pode ser mediada por plasmídeos, tendo diferentes causas, entre elas: produção de β -lactamases, redução da permeabilidade da membrana externa (mais comum em microrganismos Gram negativos) e ocorrência de sítios modificados de ligação à penicilina, particularmente importante em cepas MRSA (RANG et al., 2000; TAVARES, 2000; MASUNARI; TAVARES, 2006).

As bactérias, por sua vez, diferem na sua composição quanto ao tipo e à concentração de PBPs e, conseqüentemente, quanto à permeabilidade de suas paredes celulares ao antibiótico. Tendo-se assim, diferentes suscetibilidades

bacterianas à penicilina. Alguns microrganismos possuem enzimas autolíticas defeituosas e são inibidos, porém não sofrem lise e são considerados como tolerantes (RANG et al., 2000).

- **Quinolonas**

O termo quinolona foi utilizado pela primeira vez por Prince, em 1949, ao descrever um ácido carboxílico com a estrutura das quinoleínas e contendo um átomo de oxigênio na posição 4 da molécula. Esta substância foi obtida por degradação de certos alcalóides, não sendo reconhecida como uma droga com atividade biológica, no entanto, serviu como estrutura básica para o desenvolvimento de uma série de compostos com aplicações terapêuticas (PEREIRA, 2000).

O primeiro composto dessa classe de drogas foi o ácido nalidíxico (protótipo de primeira geração), comercializado em 1964, a partir dele, outros compostos foram sintetizados, dentre eles destaca-se o ácido pipemídico (TILLOTSON, 1996; MIMS et al., 2005).

Um novo e decisivo avanço na família das quinolonas ocorreu em 1980, com a introdução das fluorquinolonas. Estes agentes compreendem um grupo de compostos antimicrobianos, que resultam de modificações estruturais do núcleo quinolônico, pela introdução de átomo de flúor e um grupo piperazinil. Estes radicais conferiram as quinolonas maior espectro antimicrobiano e diminuição dos efeitos adversos (ZUCARELLI, 1988; PEREIRA, 2000).

Todas as quinolonas agem por inibição da enzima alvo DNA-girase, uma topoisomerase, responsável primariamente pela introdução da superhelicoidização negativa do DNA, na presença de ATP. Estas alterações no estado topológica da molécula do DNA desempenham importantes funções nos processos de replicação, transcrição, recombinação. A inibição da atividade da DNA-girase pelas fluorquinolonas, resulta na interrupção da síntese do DNA e conseqüentemente na morte da célula bacteriana (TAKENOUCI et al., 1995).

- **Macrolídios (Eritromicina)**

O termo macrolídio está relacionado com a estrutura formado por um anel lactona de vários membros ao qual se ligam um ou mais desoxi-açúcares. Durante aproximadamente 40 anos, a eritromicina foi o único antibiótico macrolídeo de uso

clínico geral. O mecanismo de ação da eritromicina, assim como de outros macrolídeos (claritromicina e azitromicina), é baseado no fato que essas substâncias inibem a síntese de proteínas bacterianas através de um efeito sobre a translocação.

A eritromicina se liga ao RNA ribossômico 23S (rRNA) na subunidade 50S do ribossomo e bloqueia o passo de translocação no processo de síntese de proteínas (atividade bacteriostática), impedindo assim a liberação do RNA de transferência (tRNA) após a formação da ligação de peptídeos (MIMS et al., 2005). Esse processo pode ocorrer por modificação enzimática - metilação do rRNA de bactérias Gram positivas e a metilase envolvida é usualmente codificada por genes plasmidiais. A eritromicina pode interferir na ligação do cloranfenicol que também atua neste local. (SCHAECHTER et al., 2002).

Segundo Rang et al. (2000), alguns microrganismos resistentes, com mutações em componentes nessas subunidades ribossômicas, 23S e 50S, não se ligam ao fármaco. Acredita-se que o mesmo não iniba diretamente a formação de ligações peptídicas, mas sim, a etapa de transferência, através da qual uma molécula de peptidil-tRNA recém sintetizada, que migra do sítio acceptor sobre o ribossomo, para o sítio peptidil, ou doador. Os macrolídeos podem ser bactericidas e/ou bacteriostáticos.

A eritromicina é um indutor de resistência, e as cepas resistentes a esse antibiótico também poderão ser resistentes à lincomicina e à clindamicina, em um processo conhecido como resistência MLS (macrolídeos-lincosamídeos-estreptogramina). A capacidade de indução varia entre as espécies bacterianas, porém são mais comuns em cocos Gram positivos (MIMS et al., 2005).

- **Tetraciclina**

As tetraciclina formam uma família de grandes estruturas cíclicas com vários sítios para possíveis substituições químicas. O grupo inclui além da tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e minociclina. As tetraciclina são inibidores específicos do ribossomo de células procarióticas, bloqueando o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica. Atuam inibindo a síntese de proteínas após sua captação em microrganismos sensíveis por transporte ativo (RANG et al., 2000).

As tetraciclina são antimicrobianos bacteriostáticos, de amplo espectro, porém muitas cepas microbianas tornaram-se resistentes a esses fármacos, diminuindo sua utilidade. A resistência é mediada principalmente por plasmídeos que possuem genes capazes de codificar uma proteína (bomba de efluxo) que ativamente expulsa a tetraciclina da célula; esses plasmídeos também podem codificar uma proteína capaz de ligar-se ao ribossomo impedindo a ação da tetraciclina (RANG et al., 2000).

- **Aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos constituem um grupo de antimicrobianos com estrutura química complexa, que se assemelham entre si quanto à sua atividade antimicrobiana, características farmacocinéticas e toxicidade. Possuem um dos mais complexos mecanismos de ação de todos os antimicrobianos anti-ribossômicos. Basicamente, ele segue três etapas: penetração na membrana externa das bactérias Gram negativas; associação a um sistema de transporte ativo de duas fases; e ligação à subunidade ribossômica 30S para inibir a síntese protéica, principalmente na etapa inicial, interferindo na codificação feita pelos ribossomos, conduzindo assim a produção de proteínas não-funcionais (RANG et al., 2000; SCHAECHTER, et al., 2002; MIMS et al., 2005).

Os dois principais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos foram descobertos em bactérias Gram negativas. O primeiro é a inativação do seu transporte, esse mecanismo de resistência ocorre em bactérias anaeróbicas e o segundo envolve a inativação enzimática, que é considerado como o mecanismo mais comum em amostras de origem clínica. Muitas das diferentes enzimas que inativam essas substâncias foram identificadas em linhagens de *E. coli*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. Normalmente, as enzimas que inativam aminoglicosídeos são codificadas por plasmídeos ou transposons, além disso, mais de um desses determinantes genéticos podem ser transportado em um plasmídeo (SCHAECHTER, et al., 2002).

- **Antifúngicos**

O número de agentes terapêuticos, adequados, contra fungos (antifúngicos ou antimicóticos), quando comparados às substâncias antibacterianas, é muito limitado. Geralmente, os antifúngicos são considerados como substâncias tóxicas e

alguns não apresentam toxicidade seletiva, como é o caso da maioria dos antimicrobianos que inibem os ribossomos de fungos e são também ativos contra ribossomos humanos (RANG et al., 2000). Não existem, atualmente, inibidores da síntese protéica dos fungos que também não inibam a via equivalente nos mamíferos (MIMS et al., 2005).

Entretanto, existem antifúngicos com toxicidade seletiva, dentre eles os poliênicos, anfotericina B, considerada o padrão “ouro”, nistatina e natamicina que se ligam com maior avidéz ao ergosterol das membranas de fungos do que ao colesterol das membranas de eucariotos superiores; os imidazóis que constituem um grupo de fármacos com maior especificidade para o citocromo P-450 desmetilase fúngica do que para a desmetilase animal, envolvida na síntese de esteróis; e a griseofulvina que é considerada como um dos antifúngicos mais eficazes contra micoses superficiais e age ligando-se fortemente à queratina recém-formada (RANG et al., 2000; NOBRE et al., 2002).

Foi iniciada uma nova era no tratamento das micoses, com a introdução dos antifúngicos azólicos, especialmente, fluconazol e itraconazol que possuem boa disponibilidade via oral e baixa incidência de efeitos adversos (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Tem sido observado, com freqüência, o isolamento de cepas de leveduras com suscetibilidade diminuída ou resistente aos antifúngicos. Esta resistência pode ser clínica, por consequência do baixo nível do fármaco no tecido e no sangue, devido à interação entre fármacos ou à imunodepressão do paciente, ou pode ser *in vitro*, onde as cepas suscetíveis se transformam em resistentes devido ao contato prévio com o antifúngico. É consenso que a resistência aos fármacos depende da interação deste, com o hospedeiro e com o fungo. Porém fatores relacionados aos hospedeiros são considerados como os mais importantes para o surgimento da resistência (SILVA; DÍAZ; FEBRÉ, 2002).

O tratamento de infecções fúngicas é ainda dificultado por problemas de solubilidade, estabilidade e absorção dos fármacos existentes e a busca de novos agentes antifúngicos, constitui prioridade máxima. Além disso, a resistência medicamentosa é cada vez maior e nenhum agente antifúngico é ideal se usado isoladamente (MIMS et al., 2005).

3.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos pode ter origem genética (cromossômica e extra-cromossômica por conjugação, transdução, transformação e transposição) e não genética (relacionada ao metabolismo), e tem se tornado um fato rotineiro desde o início da era dos antibióticos, considerados como uma das grandes contribuições da medicina no Séc. XX. Entretanto, essa resistência microbiana tem acarretado crescente morbidade e mortalidade, bem como elevação nos custos da saúde. Por esta razão a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Centro de Prevenção e Controle de Enfermidades (CDC) e outros órgãos americanos e europeus, têm desenhado novos programas e sistemas de vigilância da resistência bacteriana. Mesmo assim, solicita-se que cada país tenha seu próprio programa de vigilância nacional e local para poder realizar um melhor controle desse fenômeno (CRESPO, 2002).

Desde o início dos anos 80, o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente, ao mesmo tempo, a resistência bacteriana aos antimicrobianos tem crescido de forma imensurável. Enquanto, nos anos 70 e 80, as bactérias Gram-negativas resistentes eram consideradas como o principal flagelo, entretanto no final do Séc. XX, as bactérias Gram-positivas, resistentes, tornaram-se importantes, indicando que estes microrganismos estão cada vez mais desenvolvendo novos mecanismos de resistência. Com o uso excessivo de antimicrobianos, principalmente penicilina G, algumas cepas resistentes a esse fármaco começaram a se tornar um grande problema, principalmente dentro dos hospitais (BRAOIOS, 2005).

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes para o tratamento de doenças infecciosas representa uma das mais marcantes realizações do Séc. XX. Como consequência desse avanço científico, evidenciou-se uma considerável redução de morbidade e mortalidade associadas. Entretanto, a emergência disseminada de resistência adquirida a antimicrobianos nos últimos anos, facilitada por diversos fatores demográficos tais como: crescimento populacional e urbanização, facilidade de deslocamento de grandes continentes populacionais, como o turismo, por exemplo, constituem, atualmente, uma séria ameaça à saúde pública global, tanto em ambientes hospitalares quanto nas comunidades. É importante ressaltar que o desenvolvimento de qualquer novo fármaco com atividade

antimicrobiana vem acompanhado do aparecimento da resistência microbiana. E que a emergência de patógenos resistentes, aos antimicrobianos, é uma ameaça a esses avanços (MOELLERING Jr., 2000).

A resistência bacteriana tornou ineficaz, vários tratamentos com antimicrobianos anteriormente valiosos e ameaça a eficácia de novas terapias similares. O aparecimento de resistência resulta em vários fatores, tais como o uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasivos, em grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas no controle de infecções, ocasionado aumento da transmissão de organismos resistentes, principalmente em ambientes hospitalares e em pacientes imunocomprometidos (BRAOIOS, 2005).

A pressão seletiva resultante da administração de drogas antimicrobianas pode levar ao aparecimento de cepas previamente susceptíveis, que adquiriram resistência ou à proliferação de cepas que são intrinsecamente resistentes. Em geral a resistência é adquirida por mutação ou pela aquisição de material genético com código de resistência, ou seja, a informação genética que controla a resistência bacteriana aos antimicrobianos é codificada no DNA cromossomial e no DNA extracromossomial, nos plasmídeos (BRAOIOS, 2005).

O uso cada vez maior de antimicrobianos na prática clínica, assim como também a enorme quantidade de antibióticos utilizados, às vezes usados indiscriminadamente, na agricultura, na criação de peixes, aves e outros animais, possibilita condições favoráveis para a seleção de microrganismos resistentes (TOMAZ, 1994; BRAOIOS, 2005). Essa pressão ambiental proveniente do uso excessivo de agentes antimicrobianos evidentemente contribuiu para disseminar os determinantes de resistência. Praticamente todas as bactérias patogênicas adquiriram genes de resistência antimicrobiana (FILE Jr., 2000).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da resistência bacteriana às substâncias antimicrobianas, porém um dos principais fatores é a exposição repetida, à concentração de antimicrobianos, abaixo do ideal. Dados farmacológicos que descrevem a relação entre concentração da droga no soro e seus efeitos farmacológicos podem ser úteis em esquemas de tratamento que minimizam a probabilidade de exposição dos patógenos a níveis subletais de drogas (BURGESS, 2000).

3.3.1 Mecanismos genéticos de aquisição de resistência aos antimicrobianos

Múltiplos, complexos e ainda não totalmente conhecidos, são os mecanismos reguladores da expressão de resistência pelos quais os microrganismos podem sobreviver aos efeitos dos antimicrobianos (MARANGONI, 1997; NOVAK, 2000). Entre os vários mecanismos, incluem-se os de resistência adquirida, tais como: alteração da estrutura molecular de antimicrobianos ou produção de enzimas que inativam a droga ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular (por exemplo: β -lactamases ou enzimas modificadoras de aminoglicosídeos), alteração das proteínas ligantes da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade, que restringe a penetração de alguns compostos (as bombas de resistência multidrogas – MDRs), efluxo contínuo do antibiótico (resistência a tetraciclina e fluorquinolonas) modificações ribossômicas e rotas metabólicas alternativas (DYKE; RICHMOND, 1967; FILE Jr., 2000; STERMITZ et al., 2000; TEGOS et al., 2002; FUCHS, 2004; MOREIRA, 2004).

A utilização de um ou mais desses mecanismos, permite que linhagens bacterianas consigam reprimir a ação até dos antimicrobianos mais promissores, independentemente da classe química a qual pertençam (SILVEIRA et al., 2006b).

A resistência aos antimicrobianos pode ser mediada por intercâmbio genético e por mutações cromossômicas. Pode ser transferida entre bactérias pelos plasmídeos, transposons, ou pelos mecanismos de inserção seqüencial. Entretanto a forma mais eficaz e poderosa de propagação da informação genética ocorre por intermédio dos plasmídeos R também conhecidos como Fatores R, que são plasmídeos conjugativos capazes de conferir, aos microrganismos, resistência a diversos grupos de antimicrobianos (TRABULSI et al., 2006).

Grande parte da resistência de diversos microrganismos, às drogas, é de natureza extracromossômica, isto é, determinada por plasmídeos portadores de genes para essa finalidade (LYON, SKURRAY, 1987). A transferência plasmidial pode ser dividida em quatro estágios: formação de uma união específica, doador-receptor (contato efetivo); preparação para transferência do DNA (mobilização); transferência do DNA; e formação de um plasmídeo funcional replicativo no receptor. Nem todos os plasmídeos são capazes de desenvolver todos estes estágios,

portanto, de acordo com sua funcionalidade os plasmídeos são classificados como: conjugativos, mobilizáveis e autotransmissíveis (TRABULSI et al., 2006).

O uso constante e inadequado de antimicóticos e inibidores celulares, em geral, têm levado à seleção de isolados resistentes, tornando estes fármacos pouco eficientes (ROCHA, 2002). Os primeiros dados de resistência aos antifúngicos ocorreram em pacientes com candidíase muco-cutânea, tratados com cetoconazol, principalmente em pacientes imunocomprometidos pela infecção com o vírus da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), pela quimioterapia de pacientes com câncer ou nos transplantados. O desenvolvimento de resistência aos azóis precede o uso prolongado e repetido do fluconazol na terapêutica de pacientes com candidíase oral e esofágica (RUHNKE, et al, 1994).

Os principais grupos de antifúngicos de uso clínico são os polienos, os derivados azólicos e os alilaminas/tiocarbamatos, todos interagem com o ergosterol, principal esterol presente na membrana plasmática da maioria dos fungos (ZARDO; MEZZARI, 2004). O ergosterol é necessário na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática. A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando o fungo vulnerável a danos (ROCHA, 2002).

Os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos estão relacionados às alterações na rota da biossíntese do ergosterol e da expressão do gene ERG 11 envolvidos na síntese da enzima 14 alfa-demetilase (14 DM) que reduz o acúmulo intracelular do fármaco e/ou inativação do mesmo (MORSCHHÄUSER, 2002).

É necessário conhecer os mecanismos da resistência das espécies de *Candida* para auxiliar no desenvolvimento de estratégias em novas ações terapêuticas.

O Quadro 1 apresenta de modo simplificado alguns dos mais comuns mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Quadro 1. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Antimicrobianos	Mediação por plasmídeos	Mecanismos de resistência
Penicilinas e Cefalosporinas	Sim	Hidrólise do anel β -lactâmico pelas β -lactamases. Alvo alterado, permeabilidade alterada, inativação do agente.
Tetraciclina	Sim	Bomba de Efluxo; Deficiência no transporte ativo da tetraciclina.
Aminoglicosídeos	Sim	Modificação enzimática da substância pela ação de enzima codificada por plasmídeos R. Alvo alterado, permeabilidade alterada, inativação do agente.
Macrolídeos (Eritromicina)	Sim	Modificação enzimática (metilação do RNA ribossômico 23S). Alvo alterado, permeabilidade alterada, inativação do agente.
Quinolonas	Não	Mutação espontânea da DNA-girase e outras enzimas-alvo; Alteração da permeabilidade às quinolonas.
Meticilina	Não	Modificação das proteínas ligadoras de penicilina (não em β -lactamases)
Azóis, Anfotericina e Nistatina	Não	Modificação da permeabilidade da membrana citoplasmática fúngica. Alterações na biossíntese do esterol.
Griseofulvina	Não	Modificação da síntese de ácido nucléico.

Fonte: Adaptado de SCHAECHTER et al., 2002; MIMS et al., 2005.

3.3.2 Plasmídeos

A caracterização de plasmídeos compreende entre outros estudos, a determinação do seu grupo de incompatibilidade, a verificação de sua capacidade de transferência e mobilização e determinação do seu peso. Este tipo de análise permite informações sobre as relações filogenéticas e a origem de uma determinada

amostra bacteriana e também sobre os tipos de plasmídeos que ela possui (CEBALLOS, 1984).

Entre as várias propriedades mediadas pelos plasmídeos de maior relevância médica, estão as relacionadas com a resistência a antibióticos e aos fatores de virulência. Existe grande variedade de plasmídeos, diferentes em tamanho, composição genética e capacidade de transferência entre bactérias. Vários tipos distintos de plasmídeos penicilinase podem ser encontrados em *S. aureus*. Essa diferenciação está baseada na proporção da produção da enzima penicilinase e na degradação dessa enzima extracelularmente (DYKE; RICHMOND, 1967).

Alguns plasmídeos realizam sua própria transferência entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, estes são chamados de plasmídeos de conjugação. Muitos plasmídeos de resistência a antibióticos, também são plasmídeos de conjugação. Alguns apresentam capacidade de se replicar em diferentes hospedeiros e propagar a resistência às drogas entre espécies bacterianas não-relacionadas. Esses plasmídeos contribuem para o drástico aumento da resistência antimicrobiana em populações naturais (SHCAECHETER et al., 2002).

Os plasmídeos transferíveis podem possuir genes que apresentam código de transferência em relação a uma ampla gama de drogas antimicrobianas. Assim, para os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, uma única transferência pode resultar na aquisição de vários determinantes de resistência microbiana. A resistência antimicrobiana é um problema emergente na medicina humana e exige uma mudança na terapia empírica e revisão das estratégias dos procedimentos de testes. A velocidade na qual se desenvolvem os microrganismos está relacionada à sua exposição aos agentes antimicrobianos (TENOVER, 2000).

Certos plasmídeos, como o plasmídeo R, amplamente distribuído, transportam um ou mais transposons, elementos de transposição de regiões de DNA, responsáveis por resistência a drogas (Figura 01). A capacidade desses determinantes de “saltar” de um plasmídeo para outro, propicia às bactérias a capacidade de se adaptarem a ambientes hostis, como o de hospitais, comumente inundado por antibióticos. Nesses tipos de ambientes, as bactérias podem tornar-se resistentes a antibióticos pela aquisição de genes de resistência. Devido à pressão seletiva, os plasmídeos R podem adquirir muitos transposons com novos genes de

resistência a drogas e como muitos desses plasmídeos R são de conjugação, a resistência a múltiplas drogas pode disseminar-se entre vários tipos de bactérias (SCHAECHTER et al., 2002).

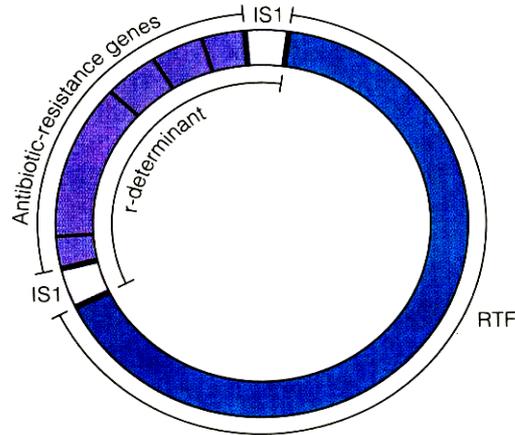


Figura 1. Plasmídeo de resistência
Fonte: Tortora et al., 2000

3.3.3 Transposons (Tn)

Elementos de transposição, ou transposons, são regiões de DNA que podem se transferir de uma região para outra do genoma, deixando ou não uma cópia no local antigo onde estavam. A transposição pode ser para o mesmo cromossoma, para outro cromossoma, para um plasmídeo ou para um fago. Foram descobertos em torno de 1950, por Barbara McClintock, inicialmente no milho e bem mais tarde em bactérias; estão presentes em todos os organismos (SUZUKI et al., 1998; TORTORA et al., 2000).

Os transposons podem ser divididos em duas classes: transposons compostos, onde duas cópias de um elemento IS (Seqüência de Inserção) idêntico flanqueiam genes de resistência aos antimicrobianos, como por exemplo, a resistência a canamicina no Tn5; e transposons simples, como o Tn3, que codifica resistência aos β -lactâmicos (MIMS et al., 2005).

Existe uma enzima associada com a transposição, denominada transposase, que é normalmente codificada pelo próprio elemento de transposição, que, portanto, carrega consigo o mecanismo para a transposição. Outros elementos importantes da transposição são as extremidades do mesmo, geralmente repetições invertidas na faixa de 30bp (pares de base). A freqüência de transposição é comparável à taxa de

mutação espontânea que ocorre nas bactérias, geralmente é baixa em torno de 10^{-5} a 10^{-7} por geração. Os transposons são úteis na engenharia genética por transportarem genes exógenos, de possível interesse clínico, como o gene da resistência a antimicrobianos (SCHAECHTER, et al., 2002; TORTORA et al., 2000).

3.4 Aspectos botânicos e fitoquímicos da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae)

3.4.1 *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae)

A família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas pertencente à divisão Magnoliophyta, e apresenta-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formada por 49 gêneros e cerca de 3.000 espécies. Os primeiros registros relativos à utilização desta família datam 2.800 a.C. sendo originários da Grécia antiga. O destaque da família se dá pela sua importância econômica, onde algumas espécies são utilizadas pela indústria para fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização destas plantas (MARQUES, 2001).

No gênero *Aniba*, estabelecido por Aublet (1775), incluem-se 41 espécies classificadas em seis subgrupos. Sua distribuição se estende desde as Antilhas, Guianas, Andes, regiões secas do centro e sul do Brasil. Algumas destas espécies, por exemplo, *A. perutilis* e *A. canelilla* são utilizadas na marcenaria, dormentes de trilhos e em construções duráveis (LÉON; PERNIA, 2000).

Em estudos sobre a anatomia do lenho de oito espécies do gênero *Aniba*, incluindo a *Aniba riparia*, foi observado a cor amarela, odor aromático e textura mediana (LÉON; PERNIA, 2000; MARQUES, 2001). *A. riparia* é árvore de médio porte, com folhas cartáceas e foscas em ambas as faces, Apresenta reticulação aureolada, ramos com aproximadamente 3 mm de espessura, marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm, arqueadas, pelo menos os pares basais. Folha não papilosa (Figura 2) (VICENTINI et al., 1999).



Figura 2. Foto de exsicata de *Aniba riparia*

Fonte: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/index.php?language=esp&page=view&id=26963&PHPSESSID=fc4166ccc9368eb31a2ecb8134721b67&PHPSESSID=fc4166ccc9368eb31a2ecb8134721b67>

No Brasil *A. riparia* é nativa da região amazônica, podendo também ser encontrada em outras regiões. Dela pode-se obter um extrato dos frutos e dos cálices persistentes que possuem atividade comprovada contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (MARQUES, 2001).

3.4.2 Alcamidas de plantas

A condensação química de um ácido com uma amina resulta na formação de uma amida. O grupo funcional amida é ubíquo, se encontra em todos os organismos vivos constituindo as uniões peptídicas, ou seja, a união entre os aminoácidos para

formação da estrutura primária das proteínas, base funcional da vida (MOLINA-TORRES; GARCIA-CHÁVEZ, 2001).

As amidas como produtos naturais, não são abundantes. Um exemplo interessante deste grupo de compostos são as alcanidas que compreendem um grupo aproximadamente de 70 estruturas conhecidas e distribuídas no reino vegetal. Do ponto de vista biogenético, as alcanidas representam uma classe distinta de produtos naturais que se forma ao combinar duas diferentes rotas metabólicas (MOLINA-TORRES; GARCÍA-CHÁVEZ, 2001). Estão constituídas pela união de um ácido graxo, de cadeia longa que pode ser de 8 a 18 átomos de carbono. A cadeia geralmente é alifática ou linear, unida a uma amina proveniente de algum aminoácido por descarboxilação no momento da condensação. Dependendo do número de ligações duplas que apresentem, as alcanidas são definidas em dois grupos principais: alcanidas alifáticas, que tem apenas duplas ligações e alcanidas acetilênicas, com pelo menos uma ligação tripla (MOLINA-TORRES; GARCÍA-CHÁVEZ; RAMÍREZ-CHÁVEZ, 1999) e as que apresentam anéis homo ou heterocíclicos que são mais observadas na família Piperaceae (PARMAR et al., 1997).

As alcanidas são consideradas como compostos bioativos, visto que uma pequena quantidade destes compostos produz uma resposta em células receptoras. São encontradas em vários grupos de plantas, dos quais os mais importantes estão presentes nas famílias Asteraceae, Solanaceae e Piperaceae. Cada uma delas tem suas próprias características individuais, porém é interessante citar que suas moléculas apresentam estruturas químicas relacionadas. As alcanidas alifáticas têm demonstrado sua eficácia como compostos medicinais, saborizantes e no controle biológico, sendo desta forma um grupo de metabólitos de grande interesse na atualidade (MOLINA-TORRES; GARCÍA-CHÁVEZ, 2001).

3.4.3 Riparinas

Riparinas são alcanidas presentes na *A. riparia* e obtidas por síntese, após condensação de duas moléculas, o éter metílico da tiramina e ácido 2-hidroxibenzóico, mais conhecido como ácido salicílico (BARBOSA-FILHO, 1997).

De acordo com Seixas (1996), a síntese das riparinas, pode ser dividida em 5 grupos:

1. Acoplamento do éter metílico da tiramina com cloreto de benzoila (riparina I),
2. Acoplamento do éter metílico da tiramina com o salicilato de metila (riparina II),
3. Acoplamento do éter metílico da tiramina com os ésteres dos respectivos ácidos:
 - 2,6 dihidroxibenzóico (riparina III),
 - 2,5 dihidroxibenzóico (riparina IV),
 - 2,4 dihidroxibenzóico (riparina V),
4. Metilação da Riparina 3 por diazometano (riparina VI)
5. Acoplamento do éster metílico da tiramina com os ácidos:
 - 2-hidroxi-5-metoxibenzóico (riparina VII),
 - 2-hidroxi-4-metoxibenzóico (riparina VII),
 - 3-hidroxi-4-metoxibenzóico (riparina IX),
 - 3-metoxibenzóico (riparina X),
 - 3,4-dimetoxibenzóico (riparina XI),
 - 3,5-dimetoxibenzóico (riparina XII),
 - 3,4,5-trimetoxibenzóico (riparina XIII),
 - 3,4-metilnódioxibenzóico (riparina XIV).

• **Atividades biológicas**

A descoberta de atividade antimicrobiana de amidas isoladas da *A. riparia*, induziu o estudo de suas características químicas e atividade biológica (BARBOSA-FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990). Estas alcamidas naturais, riparinas, através de estudos farmacológicos *in vitro*, apresentaram atividade antimicrobiana, antimalárica, schistosomicida e moluscicida (CASTELO-BRANCO, 1992).

Após a síntese, as alcamidas foram submetidas a uma triagem farmacológica, cujo principal efeito observado foi uma diminuição da pressão arterial e frequência cardíaca, em ratos acordados e não estressados. De todas as alcamidas avaliadas, apenas as riparinas II, III, IV e V na dose 1mg/kg, por via intravenosa (i.v.), apresentaram efeito significativo sobre a pressão arterial (SEIXAS, 1996). As

riparinas mostraram também, potente efeito relaxante quando utilizadas em preparações com íleo de cobaia, útero de rata e aorta de coelho (SEIXAS, 1996).

Entre outros efeitos observados pelas riparinas I, II e III, pode-se citar atividade anti-inflamatória (ARAÚJO et al., 2006), relaxante muscular (MARQUES et al., 2005), citotóxica para linfoblastos L929 (SILVEIRA et al., 2006), ansiolítico (SOUSA et al., 2004; MELO et al., 2006) e anticonvulsivante (LEITE et al., 2006).

- **Mecanismos de ação**

Embora se reconheça que as riparinas possuem propriedades antimicrobianas, poucas são as informações de como elas atuam, de modo que o seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado. Porém é importante enfatizar que a característica hidrofóbica, de sua molécula poderá permitir relacionar-se com lipídeos da membrana celular bacteriana promovendo desarranjos estruturais e tornando-a mais permeável. Entre outras possibilidades de mecanismo de ação, pode-se supor: degradação da parede celular bacteriana, danos à membrana citoplasmática, danos às proteínas de membrana, diminuição da força de prótons na cadeia de transporte de elétrons da membrana.

A maior resistência das bactérias Gram negativas aos antimicrobianos é, em parte, devido à grande complexidade da composição da dupla camada lipídica da sua membrana celular, em contraste com as estruturas únicas encontradas nas membranas de glicoproteínas em bactérias Gram positivas e do β -glucano, em fungos (TORTORA et al., 2000)

Para explicar as divergências entre a sensibilidade de células Gram positivas e Gram negativas, têm-se sugerido como fatores contribuintes, os graus de hidrofobicidade das superfícies celulares (HELANDER et al. 1998; CHAO et al., 2000). Entretanto as diferenças de hidrofobicidade das superfícies das membranas celulares bacterianas podem ser compensadas pela presença de proteínas, porinas, em células Gram negativas. Estas porinas criam canais que permitem a passagem de componentes com pequena massa celular, permitindo seu acesso no espaço periplasmático.

Segundo Thomas et al. (1994), o mecanismo de ação do efeito espasmolítico das riparinas provavelmente envolve inibição de liberação de cálcio dos estoques intracelulares, entretanto, estes efeitos não são dependentes da geração de AMP

cíclico. Enquanto que, segundo Seixas (1996), os mecanismos específicos de ligação das riparinas assim como as mudanças conformacionais induzidas por elas em nível de receptores, ainda não são conhecidas e estudos posteriores serão necessários para investigar a relação da sua estrutura - atividade sobre receptores.

- **Toxicidade**

Castelo-Branco et al. (2000), estudando os efeitos de três benzoilamidas, riparinas, constituintes de *A. riparia* (Nees) Mez (Laureaceae), verificaram que as riparinas I e II quando administradas por via oral (v.o.) ou via intraperitoneal (v.i.) em doses de até 1g/kg não causaram morte nos ratos. No entanto, a riparina III, quando administrada pela v.i., apresentou toxicidade ($DL_{50}=104,2$ mg/kg) e relaxamento da traquéia em ratos ($CI_{50} = 1,9$ mg/mL).

Devido à toxicidade ser um fator limitante no uso terapêutico de substâncias, Silveira et al. (2006), investigaram o potencial citotóxico das riparinas I, II e III em fibroblastos L929 e observaram uma significativa diminuição da viabilidade celular nestes fibroblastos, sendo a riparina I, considerada a mais tóxica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas nos Laboratórios de Tecnologia Farmacêutica (LTF), Micologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) e Genética de Microrganismos do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba (CCBS/LAC/UEPB), onde funciona o Laboratório de Pesquisas em Atividades Antimicrobianas do Programa de Qualificação Institucional – PQI/UEPB/UFPB.

4.2 Material

4.2.1 Obtenção dos produtos sintéticos

Os produtos, riparinas I, II e III, foram sintetizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a partir da *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), de acordo com as técnicas desenvolvidas e padronizadas por este Laboratório (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA-FILHO et al., 1990; CASTELO-BRANCO, 1992; SEIXAS, 1996; CASTELO-BRANCO et al., 2000).

4.2.2 Linhagens microbianas

Foram utilizadas neste trabalho, amostras de *Staphylococcus aureus*, meticilina-sensíveis (MSSA) e *S. aureus* meticilina-resistentes (MRSA), *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, além de cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação e origem das cepas microbianas testadas

Cepas / Identificação	Origem
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 – (MSSA)	Cefar
<i>S. aureus</i> (122 U, 146 U, 223 U, 312 U, 319 U, 129 FN, 233 FN, 322 FN)	Animal ¹
<i>S. aureus</i> (8, 18, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50)	Humana*
<i>S. aureus</i> (171c – MRSA)	Humana ¹
<i>S. aureus</i> (1A, 2A)	Ambiental**
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Cefar
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Cefar
<i>E. coli</i> (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)	Humana***
<i>C. albicans</i> ATCC 76643	Cefar
<i>C. albicans</i> (1, 2, 3, 4, 5, 6)	Humana ²

Legenda: U = úbere; FN = fossas nasais; * Isolados de secreção de orofaringe de pacientes ambulatoriais do Lab. DIAGNOSE; ** Isolados de ambiente hospitalar (Centro Cirúrgico); ***Isolados de pacientes ambulatoriais com infecção urinária atendidos no Lab. DIAGNOSE; 1= Lab. de Genética de Microrganismos da UFPB; 2 = Lab. de Micologia da UFPB.

4.2.3 Meios de cultura

- **Para Bactérias**

- Blood Agar Base (BAB), Agar Sangue (AS), Agar Manitol Salgado (AMS), Agar Mueller-Hinton (AMH), Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Caldo Mueller-Hinton (CMH), todos de marca Difco.

- **Para Fungos**

- Agar Sabouraud Dextrose – ASD (Difco).
- Caldo Sabouraud – CS (Difco).

4.2.4 Substâncias

- Tween 80 (Sigma Chemical)
- DMSO – Dimetil-sulfóxido (Merck)
- Água Destilada
- Solução salina (NaCl 0,85%)
- Resazurina (Sigma-Aldrich)
- Antibióticos
 - Tetraciclina (Lote: 1112, Fornecedor DGE. Origem: China)
 - Penicilina G (Lab. de Genética de Microrganismos da UFPB)

- Estolato de eritromicina (Lote: 200.592, Fornecedor: AMT do Brasil. Origem: Índia)
- Sulfato de estreptomicina (Lote: 826.545, Fornecedor: INLAB – Brasil)
- Discos de Antibióticos (Cefar)
- E-Test – Benzilpenicilina (Penicilina G) (AB BIODISK, Sweden - Article Number: 5100028; Lot Number: BF2933)
- E-Test – Eritromicina (AB BIODISK, Sweden - Article Number: 51001058; Lot Number: BE2833)

4.3 Métodos

As riparinas foram sintetizadas de acordo com os protocolos de Castelo-Branco (1992) e Seixas (1996), descritos abaixo.

4.3.1 Obtenção da *O*-metil-*N*-(benzoil)-tiramina (riparina I)

Foram dissolvidos 2,0 mL de éter metílico de tiramina em 20 mL de éter etílico. A esta solução, adicionou-se 1,0 mL de cloreto de metila (gota a gota, sob agitação magnética e a temperatura ambiente, durante 15 minutos) dissolvido em 20 mL de éter etílico. Após a adição de todos os reagentes, a mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, concentrou-se o produto da reação em rotaevaporador. O resíduo obtido foi lavado várias vezes com solução de HCl a 1% (v/v) e água destilada e filtrado posteriormente. O filtrado foi solubilizado em clorofórmio e seco com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi submetido à recristalização com benzeno-hexano, fornecendo cristais incolores com ponto de fusão em 120°C. O rendimento do produto final foi de 64% (Figura 3).

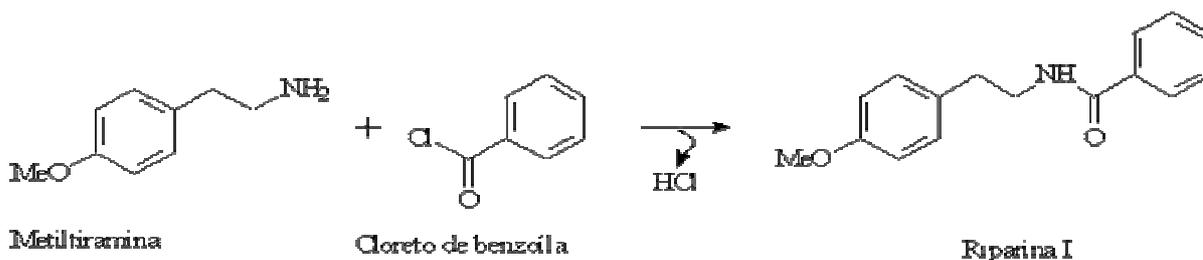


Figura 3. Reação geral para síntese de riparina I - Acoplamento do éster metílico da tiramina com o cloreto de benzoila

4.3.2 Obtenção da *O*-metil-*N*-(2-hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II)

Misturou-se 2,0 mL de éter metílico da tiramina com 1,0 mL de salicilato de metila. Esta solução foi mantida sob refluxo em 15 mL de benzeno durante 24 horas. Após resfriamento, o produto da reação foi lavado três vezes com solução de ácido clorídrico a 5% (v/v) e repetidas vezes com água destilada, sendo posteriormente filtrado. Após secagem da fase orgânica, com sulfato de sódio anidro e filtração, o solvente foi destilado obtendo-se assim um óleo cuja purificação foi realizada por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com hexano e clorofórmio (1:1). Na primeira fração separou-se o composto desejado, o qual foi cristalizado em hexano-éter, fornecendo cristais esbranquiçados com ponto de fusão em 112°C. O rendimento do produto final foi de 15% (Figura 4).

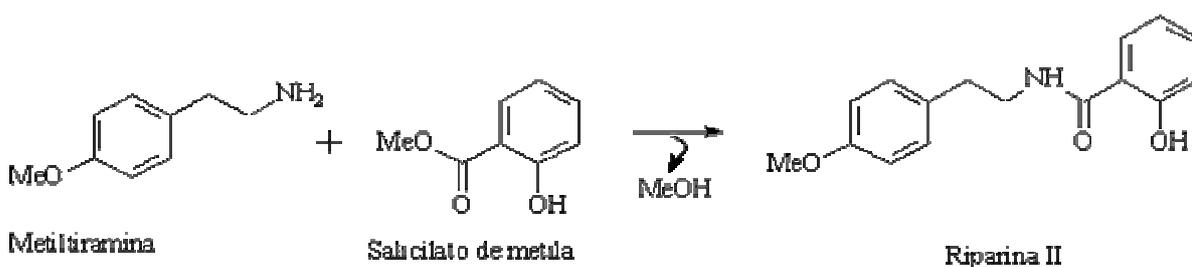


Figura 4. Reação geral para síntese de riparina II - Acoplamento de éster metílico da tiramina com o salicilato de metila

4.3.3 Obtenção da *O*-metil-*N*-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina III)

Misturou-se 2,0 mL de éter metílico de tiramina com 2,0g de ácido 2,6 dihidroxibenzoico dissolvido em 20,0 mL de tetrahidrofurano na presença de 2,0g de *N,N'* – diciclohexilcarbodiimida. A mistura permaneceu sob agitação magnética por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo dissolvido em água e extraído com acetato de etila. A fase acetato foi concentrada e o resíduo purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel e cristalizado por várias vezes com clorofórmio-hexano, fornecendo um material amorfo esbranquiçado, com ponto de fusão em 130°C. O rendimento do produto final foi de 30% (Figura 5).

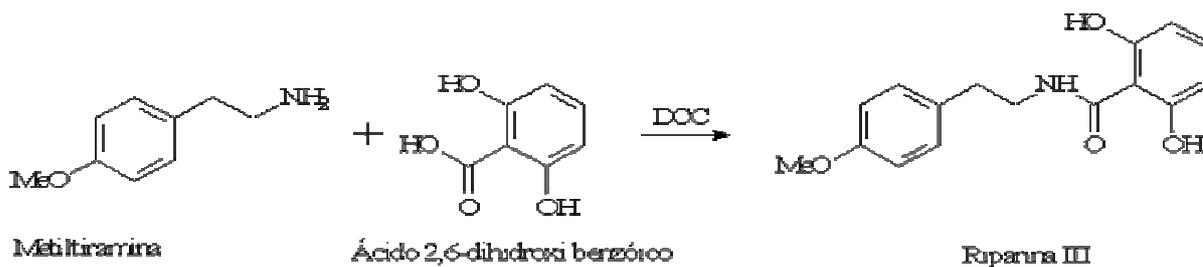


Figura 5. Reação geral para síntese de riparina III - Acoplamento de éster metílico da tiramina com os ácidos 2,6 dihidroxibenzoico

O Quadro 2 apresenta de forma simplificada, algumas informações importantes referentes às riparinas I, II e III, utilizadas neste estudo.

Quadro 2. Características gerais das riparinas obtidas a partir da *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae)

Nomenclaturas	Fórmula	PM
Riparina I ou O-metil-N-benzoiltiramina ou N-8'-4'-metoxifeniletil benzoilamida	$C_{16}H_{17}NO_2$	255
Riparina II ou O-metil-N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina ou N-[8'-4'-metoxifeniletil]-2-hidroxibenzoilamida	$C_{16}H_{17}NO_3$	271
Riparina III ou O-metil-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina ou N-[8'-4'-metoxifeniletil]-2,6-dihidroxibenzoilamida	$C_{16}H_{17}NO_4$	287

4.3.4 Obtenção das soluções de riparinas

As soluções apresentando diferentes concentrações de riparinas foram obtidas, para cada uma delas da seguinte forma: Em um tubo de ensaio (15 x 75 mm) estéril, colocou-se 12 mg de riparina; 0,04 mL de Tween 80; 50 µl de DMSO e 3,0 mL de água destilada estéril. Essa mistura foi homogeneizada por aproximadamente 5 minutos. A partir de tal procedimento, obteve-se uma solução com concentração de 400 µg/mL (solução padrão). Seguindo-se o processo de diluições seriadas, preparou-se uma série de 6 tubos de ensaio onde cada continha

2,5 mL de água destilada estéril. A partir da solução padrão, 400 µg/mL, diluições seriadas foram realizadas, transferindo-se 2,5 mL dessa diluição para o primeiro tubo de ensaio da série, homogeneizou-se por 5 vezes e transferiu-se 2,5 mL para o tubo seguinte e assim sucessivamente até o último tubo da série, obtendo-se soluções com concentrações decrescentes de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL de riparina. A adição de Tween 80 e de DMSO permitiu uma melhor solubilização no preparo das soluções de riparinas (HADACEK; GREGER, 2000).

4.3.5 Isolamento e identificação de bactérias

Para os ensaios foram utilizados os seguintes meios de cultura (Difco): Agar Sangue (AS) para verificar a pureza e a capacidade hemolítica das cepas bacterianas, Agar Manitol Salgado (AMS) para verificação da capacidade de utilização do manitol pelas cepas de *S. aureus* e Agar Müeller-Hinton (AMH) para a realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos -TSA por ser o meio de cultura padrão recomendado para esse procedimento de acordo com Bauer et al. (1966) e com o NCCLS (2004).

As cepas de *S. aureus* de origem humana e ambiental, utilizadas nesse trabalho foram adquiridas, isoladas e identificadas fenotipicamente por métodos microbiológicos tradicionais, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB e no Setor de Bacteriologia da DIAGNOSE-Clínica de Análises Especializadas – LTDA, Campina Grande-PB. As cepas de origem animal foram doadas da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPB e as cepas ATCC foram fornecidas pela Cefar (Tabela 1).

Para identificação fenotípica das cepas de *S. aureus*, foram realizados testes bioquímicos rotineiros para detectar a produção de alguns fatores de virulência tais como, as enzimas catalase, coagulase e DNase além de observar a utilização do manitol (fermentação e oxidação) e a produção de hemólise em placas de Agar Sangue.

4.3.6 Suspensão bacteriana

Durante a realização do ensaio, as cepas foram mantidas em meio Agar Müeller-Hinton (Difco) e repicadas para caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (Difco) e

incubadas a 37°C/24 horas. Após este período, procedeu-se o semeio pela técnica de estrias (para obtenção de colônias isoladas) em placas de Agar Sangue, que foram incubadas a 37°C/24 horas.

Para a obtenção do inóculo bacteriano, foram selecionadas 3 a 5 colônias semelhantes as quais foram transferidas para 5,0 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C/24 horas, para atingir a fase exponencial de crescimento. Após este período, realizou-se o subcultivo, transferindo 50 µL do inóculo inicial para 50 mL de caldo Müller-Hinton, e incubando-o à 37°C/1h de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, obtendo-se assim um inóculo de concentração final de 10^6 UFC/mL. Essa suspensão, inóculo bacteriano, foi semeada aproximadamente 15 a 20 minutos após sua preparação (BAUER et al., 1966; DRUTZ, 1987; CLEELAND; SQUIRES, 1991; SANTOS FILHO, 2003; NCCLS, 2004).

4.3.7 Isolamento e identificação de leveduras

Foram selecionadas cepas de *C. albicans*, isoladas de amostras clínicas de pacientes portadores de infecções superficiais e/ou profundas. Os cultivos foram realizados em Agar Sabouraud Dextrose (ASD), incubados a 35°C e observados por um período de 2 a 3 dias, a fim de evidenciar o crescimento fúngico. As características macromorfológicas, microscópicas e bioquímicas dos cultivos foram estudadas segundo a chave de identificação proposta por GUÉHO et al., 1994.

4.3.8 Suspensão de leveduras

A partir das culturas mantidas em ASD, a 35°C/24-72 horas, foi realizado o preparo e padronização do inóculo, em solução salina de cloreto de sódio a 0,85%, estéril obtendo-se assim uma suspensão com turvação comparativa com a do tubo 0,5 da escala de McFarland. A mesma foi ajustada no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para 90%T (530nm), correspondendo aproximadamente uma concentração final de 10^6 UFC/mL (CASALS, 1979; FROMTLING, 1983; ODDS, 1989; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

4.3.9 Determinação da atividade antimicrobiana – Triagem

- **Método de difusão em meio sólido para bactérias**

Para a determinação da atividade das riparinas sobre microrganismos, foi realizada, inicialmente, uma triagem da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa (BAUER et al., 1966; COURVALIN, et al., 1985; CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; NCCLS, 2004; CLSI, 2005).

Para realização do teste de difusão, foram utilizadas placas de Petri (90 x 15 mm) descartáveis, estéreis, contendo 20 mL do meio de cultura Agar Müller-Hinton, que foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície (NCCLS, 2004; CLSI, 2005), com auxílio de *swabs* estéreis mergulhados na suspensão contendo o inóculo, eliminando-se o excesso de líquido por pressão nas paredes do tubo. O inóculo foi semeado sobre toda a superfície do agar de modo a se obter um crescimento uniforme e semi-confluente.

As placas foram colocadas para secar, durante 3 a 5 minutos. Em seguida, foram realizadas as perfurações das cavidades com 6 mm de diâmetro, com o auxílio de perfuradores descartáveis estéreis. Em cada cavidade, foi adicionado 50 µL da solução do produto testado, para verificar a presença ou não de atividade antimicrobiana. Os produtos foram previamente solubilizados com dimetil-sulfóxido (DMSO a 2%) e utilizados inicialmente na concentração de 400 µg/mL. Foi utilizado, como controle, em uma das cavidades, 50 µL da solução de DMSO a 2% usada como solvente. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após este período de incubação os resultados foram notificados e foram considerados positivos aqueles produtos que inibiram o crescimento microbiano, produzindo halos de inibição igual ou superior a 8 mm de diâmetro (WONG-LEUG, 1988; SAKAR et al., 1988; NAQVI et al., 1991). Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição.

- **Determinações da CIM e da CBM**
 - **Técnica de microdiluição em placas**

A CIM das riparinas frente às cepas ensaiadas foi determinada pela técnica de microdiluição em placa (NCCLS, 2004). Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 cavidades de fundo chato e tampa da marca CRALPLAST Ltda. (Figura 6), nas quais foram distribuídos assepticamente, 100 μ L de Caldo Müller-Hinton. Na cavidade da linha A da placa, adicionou-se 100 μ L da solução aquosa de riparina em estudo, pré-solubilizada com DMSO a 2%, na concentração de 400 μ g/mL. Em seguida foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 μ L da linha A até a linha G da placa. Após as diluições, adicionou-se 10 μ L do inóculo bacteriano, nas linhas horizontais (numeradas de 1 a 12), em todas as cavidades até a linha G. Cada uma das linhas numeradas correspondeu a uma cepa bacteriana. A linha H foi utilizada como controle positivo do crescimento bacteriano (viabilidade de cada cepa ensaiada). As placas foram tampadas, seladas e incubadas por 37°C/24h.

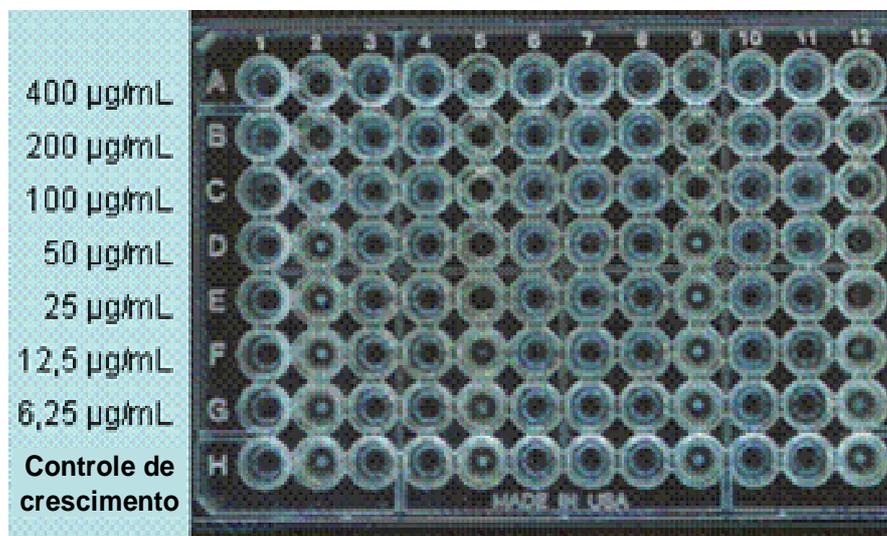


Figura 6. Placa de microdiluição

Após esse período de incubação, adicionou-se 20 μ L da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% em cada cavidade, como indicador colorimétrico de óxido-redução para caracterizar a viabilidade celular. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 2 h e lidas após esse tempo.

A leitura realizada de forma visual foi caracterizada pela mudança de cor nas cavidades. Onde houve mudança da cor azul da solução de resazurina, para rosa, caracterizou a redução deste corante indicando viabilidade bacteriana, ou seja, nessa cavidade a concentração do produto não foi capaz de matar as bactérias. Nas cavidades em que não houve mudança de cor, ou seja, permaneceu azul, significou que a resazurina não foi reduzida indicando, portanto, inviabilidade das células bacterianas. A resazurina atua como substrato cromogênico de enzimas da cadeia de transporte de oxigênio, desidrogenases, agindo como indicadora de oxi-redução, sendo reduzidas (ganho de elétrons) por flavinas ligadas a enzimas da cadeia de transporte de oxigênio durante o metabolismo celular (KOMEMAN, 2001).

Considerou-se como CIM a menor concentração de riparina capaz de inibir o crescimento da cepa bacteriana ensaiada e como CBM, a primeira concentração anterior a CIM (MANN; MARKHAN, 1998; SALVAT et al., 2001; BURT; REINDERS, 2003; ALVES, 2006).

- **Método de difusão em agar para leveduras e determinação da CFM**

Este método foi empregado para avaliar a atividade antifúngica das riparinas I, II e III, sobre cepas de *C. albicans* e simultaneamente determinar a possível CFM destas substâncias (McGINNIS, 1980; SHADOMY et al., 1985; PLEMPEL et al., 1986; CLEELAND; SQUIRES, 1991; CANTÓN; PEMÁN, 1999; HADACEK; GREGER, 2000).

Em placas estéreis, descartáveis, depositou-se 1mL da suspensão fúngica, padronizada pelo tubo 0,5 da escala de McFarland correspondendo aproximadamente a 10^6 UFC/mL. Em seguida, adicionou-se 20 mL de ASD fundido a 50°C. Após solidificação do agar, foram feitas cavidades de 6 mm de diâmetro com o auxílio de perfuradores descartáveis estéreis, onde se depositou 50 µl de cada solução de riparina solubilizada em DMSO a 2%, nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. Controles foram realizados com cetoconazol (50 µg/mL). A incubação foi a 35°C/24-48 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética do tamanho dos halos de inibição de crescimento (mm) dos valores obtidos nos ensaios. Foi considerada como CFM àquela concentração de riparina que quando em interação com a cepa microbiana ensaiada, foi capaz de desenvolver um halo de inibição do

crescimento igual ou superior a 10 mm (NAQVI et al., 1991; COLE, 1994; LIMA et al., 1993; ALVES et al., 2000; SOUZA et al., 2005).

4.3.10 Estudo do efeito das riparinas sobre a cinética bacteriana

A cinética bacteriana é um método experimental que pode determinar a viabilidade dos microrganismos testados após exposição destes às substâncias de interesse por um tempo determinado (MAY et al., 2000). A determinação da curva de crescimento e/ou mortalidade em função do tempo de exposição a um determinado produto é uma das inúmeras ferramentas de trabalho utilizadas para determinar os efeitos de antimicrobianos sobre as bactérias (CANTÓN; PEMÁN, 1999).

Três amostras representativas foram selecionadas para a realização da cinética bacteriana, frente às riparinas: *S. aureus* ATCC 25923 - recomendada pelo NCCLS quando se avalia sensibilidade aos antimicrobianos e as linhagens bovinas de *S. aureus* 319U e *S. aureus* 122U, por possuírem plasmídeo penicilinase.

Foram determinadas as curvas bactericidas dos substratos sintéticos, riparina I, II e III, obtidos a partir da *A. riparia* (Nees) Mez, sobre as amostras selecionadas de *S. aureus*, estabelecendo-se a concentração relacionada à CIM (200 µg/mL), em diferentes tempos de incubação, segundo o método proposto por Peyret *et al.*, (1990). As amostras foram inoculadas em caldo nutritivo (BHI), incubadas a 37°C/18-24h.

Após este período, foram cultivadas, transferindo-se 50 µL do inóculo inicial para 50 mL de caldo Mueller-Hinton, e incubando-o à 37°C/1h de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo aproximadamente a 10⁶ UFC/mL. Transferiu-se 9,0 mL, desta cultura bacteriana, para um tubo teste (T), e 9,0 mL para um tubo controle (C). Ao tubo T, adicionou-se 1,0 mL do produto a ser testado e ao tubo C, adicionou-se 1,0 mL de água destilada estéril. Os tubos (T e C) foram mantidos na estufa à 37°C e alíquotas foram retiradas após 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48 horas de incubação e semeadas em agar BAB. As leituras das placas foram efetuadas após incubação por 24 e 48 horas a 37°C, pelo método padrão de contagem em placas (Figura 7). Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado final (UFC/mL) foi determinado pela média aritmética dos valores encontrados.

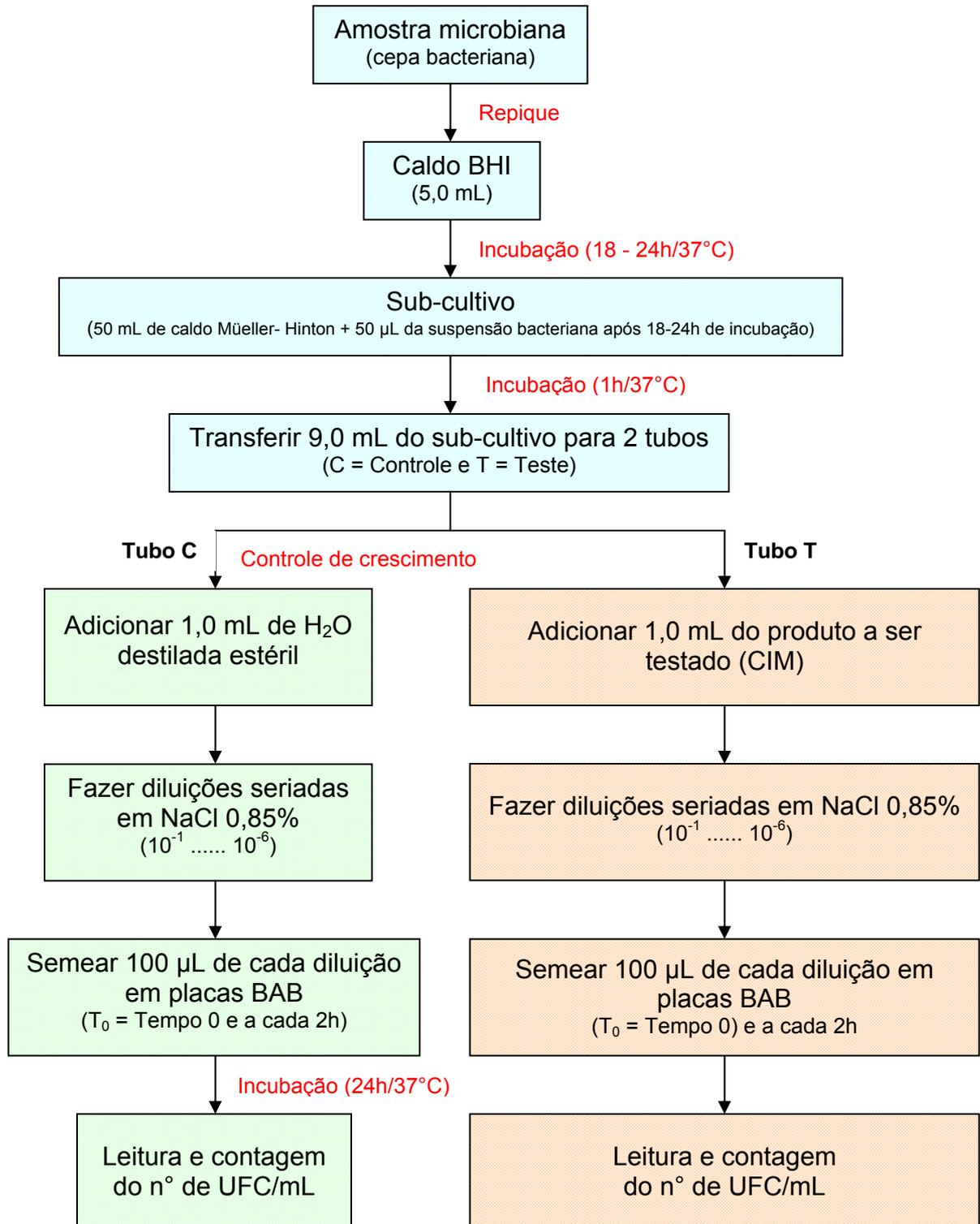


Figura 7. Fluxograma da cinética bacteriana

4.3.11 Estudo do efeito das riparinas sobre a cinética fúngica

As curvas fungicidas foram determinadas através do método de contagem de células viáveis, para realizar o estudo da interferência dos substratos sintéticos, riparinas I, II e III, obtidos a partir da *A. riparia* sobre a amostra selecionada de *C. albicans* ATCC 76643. Estabeleceu-se a concentração de 200 µg/mL, como sendo a CIM desses produtos. O procedimento técnico realizado seguiu os mesmos parâmetros daqueles anteriormente citados na cinética bacteriana, em diferentes tempos de incubação (PEYRET et al., 1990; CANTÓN; PEMÁN, 1999; HADACEK; GREGER, 2000) (Figura 8).

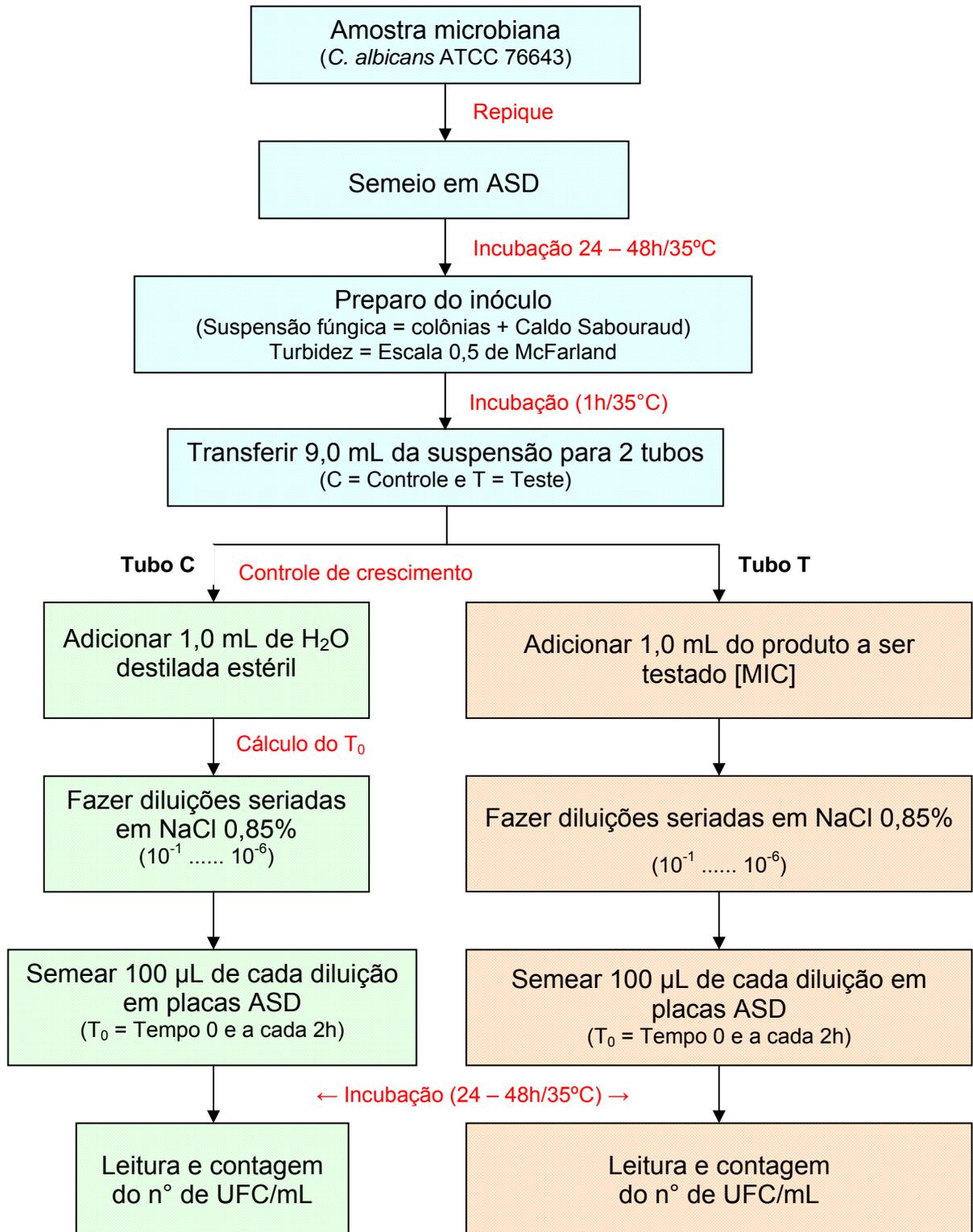


Figura 8. Fluxograma da cinética fúngica

4.3.12 Determinação da caracterização fenotípica dos padrões de resistência aos antimicrobianos – Perfil de sensibilidade

A determinação do perfil de sensibilidade ou teste de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiograma) foi realizada pelos métodos de disco-difusão (BAUER et al., 1966) usando-se discos de antibióticos da Cefar, seguindo-se as recomendações do fabricante e a padronização do NCCLS (2004) e CLSI (2005), para todas as cepas de *S. aureus* ensaiadas e pelo E-test, método de gradiente predefinido de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), seguindo-se as recomendações do fabricante (BROWN; BROWN, 1991). Apenas duas cepas, *S. aureus* 319U e 122U, foram selecionadas para esta etapa, por terem seu perfil plasmidial, de resistência aos antimicrobianos, penicilina e eritromicina, previamente determinados por Pereira; Siqueira (1995) através CIM pelo método da diluição em placas.

4.3.13 Tratamento por riparinas I, II e III, obtidas a partir da *A. riparia* – Avaliação da atividade curagênica

A avaliação da atividade curagênica das riparinas I, II e III, sobre *S. aureus* resistentes a drogas, foi determinada, utilizando-se o valor médio da concentração subinibitória ($1/2 \text{ CIM} = 100 \mu\text{L/mL}$). Todas as amostras bacterianas foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI a 37°C por 18-24 horas e diluídas 100 vezes no mesmo meio, adicionado da concentração subinibitória de cada produto ensaiado. Após incubação a 37°C/24 horas, sob agitação, as culturas foram convenientemente diluídas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em BAB (Difco) para determinação do título (número de colônias/mL). A perda da resistência a drogas foi determinada por réplica para meios de cultura, acrescidos de cada droga estudada (LEDEBERG; LEDEBERG, 1952; PEREIRA, 2000). As confirmações da ocorrência de eliminação de plasmídeos nas variantes possivelmente curadas foram realizadas em placas com meio sólido (BAB) contendo os antibióticos pré-selecionados, penicilina e eritromicina (Figura 9).

Experimentos controle para a determinação de eliminação espontânea de plasmídeos, foram realizados anteriormente, utilizando-se os métodos de diluição em placas e eletroforese em gel de agarose após lise com lisostafina (GOERING; RUFF, 1983; PEREIRA; SIQUEIRA, 1995).

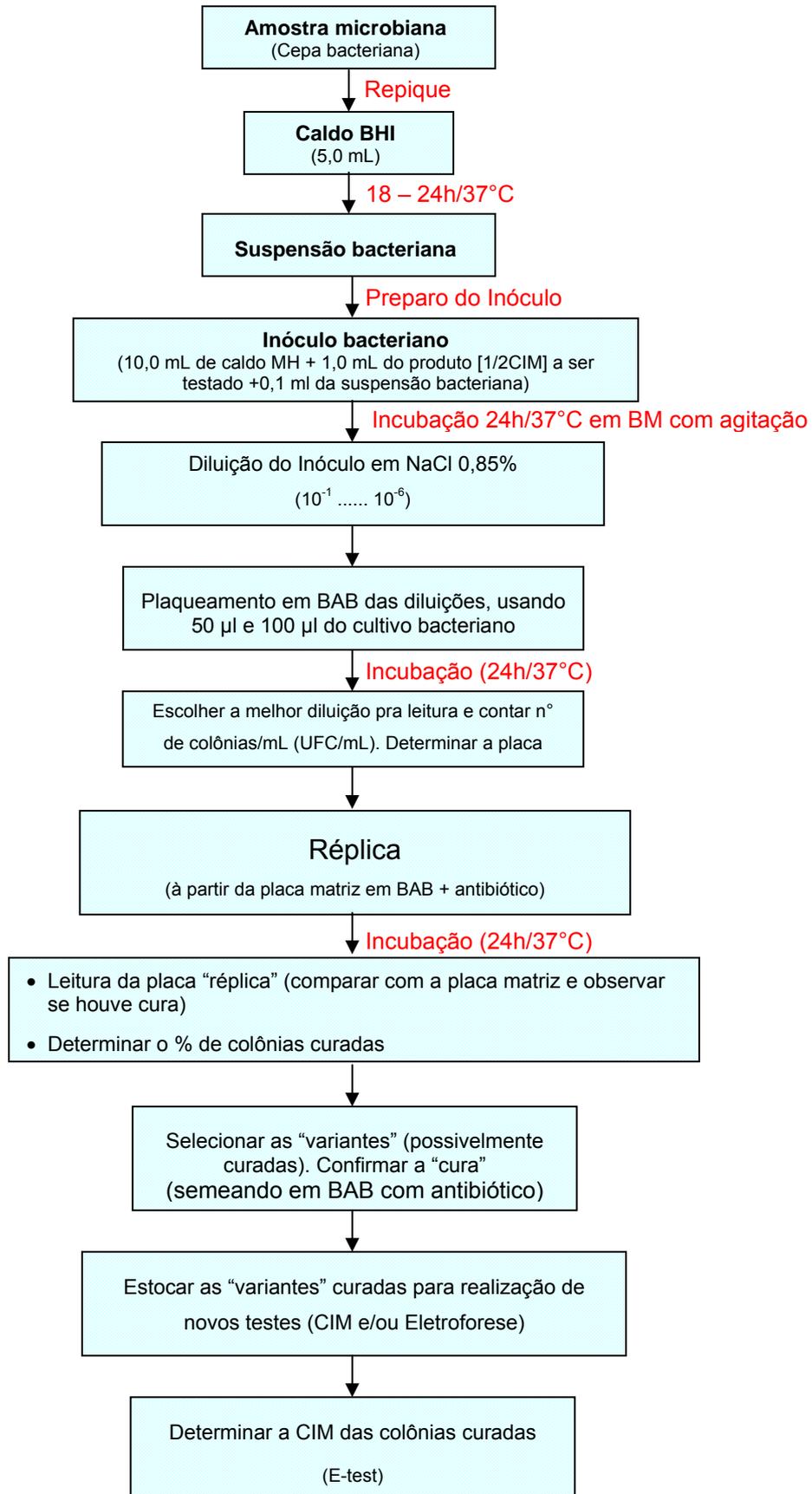


Figura 9. Fluxograma para avaliação da atividade curagênica

4.3.14 Estudo da relação estrutura/atividade antimicrobiana das riparinas

O estudo da relação estrutura/atividade antimicrobiana das riparinas I, II e III foi determinado em função da observação e comparação dos efeitos dessas substâncias frente às cepas escolhidas para esse estudo; através da avaliação do perfil de sensibilidade, visualizado através da presença de halos de inibição de crescimento, com diâmetros iguais ou superiores a 8 mm, da cinética microbiana e da atividade curagênica.

4.3.15 Análise estatística

Foram realizadas análises de estatística descritiva básica determinando-se valores médios, mínimos, máximos e desvio padrão das cinéticas bacterianas. Esses parâmetros foram avaliados separadamente para cada uma das riparinas testadas usando-se utilitários de computador, Microsoft Office Excel 2003, e considerado como aceitável o a relação percentual entre o desvio padrão e a média aritmética dos ensaios, inferior a 10%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um dos principais problemas de saúde pública mundial, despertando preocupação na busca contínua por novos antimicrobianos, uma vez que, a potência efetiva dos antimicrobianos existentes, vem sendo gradativamente reduzida ou mesmo anulada pelo desenvolvimento de cepas que se apresentam resistentes aos mesmos. Essas cepas são freqüentemente indicadas como os principais agentes etiológicos de infecções humanas e animais, além de serem também comumente encontradas em infecções hospitalares (XU; LEE, 2001).

A versatilidade genética das bactérias são fatores que contribuem para eficiência do fenômeno de resistência que tem se disseminado entre diferentes gêneros e espécies bacterianas (PONTES et al., 2004). É sobre essa variabilidade genética que o homem vem, paradoxalmente, exercendo alta pressão seletiva (hospital, comunidade, agropecuária, meio ambiente) favorecendo os genótipos resistentes (CHARTONE-SOUZA, 2004).

Os estudos de produtos naturais e sintéticos bioativos têm-se mostrado como uma alternativa terapêutica frente a crescente resistência aos antimicrobianos sintéticos e semi-sintéticos e várias pesquisas estão sendo realizadas no intuito de avaliar as propriedades de atividade antimicrobianas de substâncias de origem vegetal. Dentro dessa perspectiva, o interesse em plantas com propriedades medicamentosas tem evoluído bastante em todo o mundo. Vários trabalhos descritos na literatura buscam avaliar produtos de plantas que possuam atividade antimicrobiana (LIMA et al., 1993; THUILLE et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2003; PETRONE et al., 2004; GONTIJO et al., 2004; BRAGA et al., 2005; SOUZA et al., 2005; ALVES, 2006).

A Tabela 2 apresenta o comportamento das amostras de *S. aureus* com o intuito de conhecer o perfil de sensibilidade frente a 15 antimicrobianos usados rotineiramente na clínica médica humana e veterinária. Observou-se nesse estudo que a maioria (15/22) das cepas apresentou resistência a penicilina G e a ampicilina e que as cepas 129FN, 233FN, 322FN (origem animal) e as cepas 8 e 18 (origem humana) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Apenas duas cepas

171c (humana) e 2A (ambiental) apresentaram resistência a oxacilina, sendo classificadas como MRSA. Todas as cepas foram sensíveis a vancomicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e ampicilina/sulbactan.

Esse estudo prévio de avaliação do perfil de sensibilidade permitiu classificar as cepas pelo seu antibiograma, mostrando que a diversidade fenotípica observada em relação aos antimicrobianos, independe da sua origem.

Das 22 cepas ensaiadas, 7 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, as demais apresentaram multirresistência que variou de 2 a 7 antimicrobianos, sendo 6 cepas resistentes apenas à penicilina G e à ampicilina. As cepas mais resistentes foram 171c, 46c e 2A, respectivamente, resistentes a 7, 6 e 5 tipos de antimicrobianos. As cepas resistentes à penicilina foram consideradas como produtoras de plasmídeo penicilinase.

Tabela 2. Comportamento das cepas de *S. aureus* frente aos antimicrobianos

Cepas	ANTIMICROBIANOS TESTADOS (concentração do disco)															RM
	Penicilina G (10 µg)	Eritromicina (15 µg)	Tetraciclina (30 µg)	Ampicilina (10 µg)	Vancomicina (30 µg)	Oxacilina (1 µg)	Amicacina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Sulfametoxazol + Trimetoprima (25 µg)*	Ampicilina + Sulbactam (20 µg)**	Ciprofloxacino (5 µg)	Clindamicina (2 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Azitromicina (15 µg)	Estreptomina (10 µg)	n° Antibióticos
122 U	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3
146 U	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
223 U	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
312 U	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
319 U	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
129 FN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
233 FN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
322 FN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
171c	R	R	R	R	S	R	I	S	R	S	S	S	S	R	S	7
8c	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
18c	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
43c	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
44c	R	I	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	4
45c	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	4
46c	R	I	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	6
47c	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3
48c	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
49c	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	4
50c	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	4
ATCC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
1 ^a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
2 A	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5

Legenda: S = sensível, I = intermediário, R = resistente, U = úbere, FN = fossas nasais, c = clínica, A = ambiental, ATCC = *American Type Culture Collection*; RM = Resistência Múltipla; * Sulfametoxazol 23,75 µg + Trimetoprima 1,25 µg; ** Ampicilina 10 µg + Sulbactam 10 µg.

5.2 Atividade antimicrobiana *in vitro* de riparinas

5.2.1 Frente às cepas padrões ATCC

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana, pelo método de diluição em agar, das soluções aquosas de riparinas I, II e III, na concentração inicial de 200 µg/mL, sobre cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* ATCC 76643. As riparinas I e II não apresentaram halos de inibição de crescimento para nenhuma das cepas ATCC ensaiadas. Apenas a riparina III, apresentou atividade antimicrobiana, frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923, apresentando halo de inibição de crescimento de 18 mm de diâmetro. O método de difusão em ágar é amplamente utilizado, reconhecido como preciso e seguro, ainda que produza resultados semi-quantitativos (JANSSEN et al., 1987) ou apenas qualitativos (KALODERA et al., 1997).

A solução de DMSO a 2% foi também testada, isoladamente, para observar se esta substância apresentava alguma atividade antimicrobiana que pudesse interferir nos resultados das riparinas analisadas. Entretanto, não foi observada nenhuma ação do DMSO frente às cepas ensaiadas, de modo que essa solução foi usada como controle negativo, ou seja, controle de um produto sem atividade antimicrobiana (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de riparinas frente às cepas padrões ATCC

Produtos Testados (Concentração)	Microrganismos ensaiados			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 76643
Diâmetro dos halos de inibição (mm)				
Riparina I (200 µg/mL)	0	0	0	0
Riparina II (200 µg/mL)	0	0	0	0
Riparina III (200 µg/mL)	18	0	0	0
DMSO a 2%	0	0	0	0

Legenda: 0 = Ausência de halo.

5.2.2 Frente às Cepas de *S. aureus*

A Tabela 4 apresenta o comportamento de 22 cepas de *S. aureus* de diferentes origens (animal, humana e ambiental), caracterizadas fenotipicamente

como sensíveis (MSSA) e resistentes a meticilina (MSRA) frente às riparinas I, II e III. A avaliação da atividade antimicrobiana, desses produtos foi determinada em função dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento que variaram de 8 a 18 mm, sendo o maior deles apresentado pela cepa *S. aureus* ATCC 25923, frente à riparina III. Esses halos estão de acordo com os diâmetros pré-estabelecidos por Wong-Leung (1988); Sakar et al. (1988), que consideraram com atividade antimicrobiana todos os produtos que apresentaram halo ≥ 8 mm.

A determinação da atividade antimicrobiana pela mensuração dos diâmetros dos halos de inibição, deve ser estudada caso a caso, principalmente quando se trata de estudos preliminares em novos produtos naturais ou sintéticos.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade *in vitro* das cepas de *S. aureus* frente às riparinas

Origem das cepas	Cepas testadas (n=22)	Riparinas (200 µg/mL)		
		I	II	III
		Diâmetro dos halos de inibição (mm)		
Padrão n = 1	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0	0	18
Animal n = 8	122 U (MSSA)	0	0	10
	146 U (MSSA)	10	12	14
	223 U (MSSA)	0	0	9
	312 U (MSSA)	0	0	9
	319 U (MSSA)	0	0	14
	129 FN (MSSA)	9	9	13
	233 FN (MSSA)	9	9	11
	322 FN (MSSA)	13	13	13
Humana n = 11	171c (MRSA)	0	0	0
	8c (MSSA)	0	0	8
	18c (MSSA)	0	0	8
	43c (MSSA)	0	0	8
	44c (MSSA)	0	0	8
	45 (MSSA)	0	0	11
	46c (MSSA)	0	0	12
	47c (MSSA)	0	0	9
	48c (MSSA)	0	0	9
	49c (MSSA)	0	0	8
50c (MSSA)	0	0	13	
Ambiental n = 2	1A (MSSA)	12	9	14
	2A (MRSA)	0	0	0
Total de cepas/Sensíveis (% de sensibilidade)		22/5 (22,7%)	22/6 (27,3%)	22/20 (90,9%)

Legenda: U = úbere; FN = fossas nasais; c = clínica humana; A = ambiental; MSSA = sensível à meticilina; MRSA = resistente à meticilina; 0 = Ausência de halo.

É interessante observar, considerando o padrão de resistência dessas linhagens, que as cepas MRSA, apresentaram resistência a todas as riparinas, enquanto que as cepas MSSA mostraram-se mais susceptíveis. Esse comportamento pode ser explicado, em parte, pela presença do gene *mecA*, nas cepas MRSA, responsável por diferentes mecanismos de resistência capazes de interagirem entre si (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Analisando o resultado do comportamento das 22 cepas de *S.aureus* ensaiadas nesse experimento, observou-se que as riparinas I e II apresentaram atividades semelhantes, inibindo 5 (22,7%) e 6 (27,3%) das cepas. A riparina III foi o produto que inibiu o maior número de cepas 20 (90,9%). Estes resultados estão em concordância com relatos anteriores de Catão et al (2005), que registraram 11(91,7%) cepas de *S. aureus* sensíveis a essa riparina.

Em função da origem das cepas, se observou que as linhagens de origem animal mostraram-se mais susceptíveis que as de origem humana e ambiental.

Das 8 cepas de *S. aureus* de origem animal, 4 (50%) apresentaram sensibilidade para as riparinas I, e II, com halos de inibição de crescimento, variando de 9 a 13 mm. O total de 8 (100%) das cepas apresentou sensibilidade para a riparina III com halos que variaram de 9 a 14 mm. Nenhuma das cepas de *S. aureus* de origem humana, 11 (100%), apresentou sensibilidade para as riparinas I e II, enquanto que 10 (90,9%) foram sensíveis para riparina III. As 2 cepas ambientais, 1A (MSSA) e 2A (MRSA), apresentaram comportamentos opostos frente as riparinas; a linhagem 1A, sensível à todas as riparinas, apresentou halos de inibição de crescimento de 12, 9 e 14 mm, respectivamente para as riparinas I, II e III, enquanto que para a linhagem 2A esses produtos foram ineficazes.

Todas as cepas MSSA, independente da sua origem (animal, humana ou ambiental), apresentaram sensibilidade para a riparina III, no entanto as cepas MRSA (171c e 2A) mostraram-se resistentes a todas as riparinas testadas. É provável que essa diferença de comportamento esteja relacionada a peculiaridades intrínsecas de cada cepa tais como esse fato esteja relacionado à heterogeneidade dos mecanismos de resistência plasmidial e cromossomial desenvolvidos pelas linhagens MRSA (KURODA et al., 2001; YAMADA et al., 2006; COELHO et al., 2007), como também pelos mecanismos de ação, ainda não elucidados, pelos quais as riparinas atuam nessas linhagens.

5.2.3 Frente às cepas de *E. coli*

A Tabela 5 mostra o resultado do comportamento das cepas de *E. coli* testadas frente às riparinas. Foi constatada a ausência de halos de inibição de crescimento para todas as cepas ensaiadas, sugerindo ineficácia destes produtos sobre o crescimento da referida bactéria.

Tabela 5. Comportamento das cepas de *E. coli* frente às riparinas

Cepas ensaiadas	Riparinas (200 µg/mL)		
	I	II	III
	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0	0	0
1c	0	0	0
2c	0	0	0
3c	0	0	0
4c	0	0	0
5c	0	0	0
6c	0	0	0
7c	0	0	0
8c	0	0	0
9c	0	0	0
Total de cepas (% de Sensibilidade)	10 (0%)	10 (0%)	10 (0%)

Legenda: c = amostra clínica de origem humana; 0 = Ausência de halo.

Estes resultados, em parte, estão de acordo com os citados anteriormente por Catão et al., (2005), que relataram a presença de pequenos halos de inibição de crescimento (7 mm) para 3 (21,4%) cepas de *E. coli*. Segundo Wong-Leung (1988), substâncias que produzam halos de inibição de crescimento entre 6,5 e 7,75 mm podem ser consideradas com baixa atividade antimicrobiana. De modo que a diferença encontrada entre a ausência e presença pequenos halos, pode está relacionada não só a pouca atividade das riparinas nessas linhagens, como também a particularidades relacionadas aos diferentes mecanismos de resistência, das linhagens em estudo, fator determinante do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

5.3 Determinação da CIM e da CBM

A determinação da CIM foi realizada simultaneamente pelos métodos de cavidade-placa (difusão em meio sólido) e microdiluição em placa de polietileno de 96 cavidades. O uso de dois ou mais métodos para o estudo da atividade

antimicrobiana, permite obter resultados mais seguros. Foram escolhidas para esse ensaio, as cepas padrão (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923) e dentre as 22 cepas de *S. aureus* avaliadas frente às riparinas I, II e III, foram incluídas àquelas com perfil plasmidial conhecido (122U e 319U) e as que apresentaram suscetibilidade simultânea a todas as riparinas (146U, 122FN, 233FN, 322FN e 1A).

A Tabela 6 contém os resultados encontrados para essas cepas quando testadas frente a diferentes concentrações (400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL) para cada uma das riparinas ensaiadas, para determinação da CIM pelo método cavidade-placa, ou seja, difusão em meio sólido. Os halos de inibição de crescimento variaram de 19 a 8 mm, decaindo em função da concentração. Na maioria das cepas observou-se a presença de halos nas duas primeiras concentrações. Apenas as cepas ATCC 25923, 233FN e 1A apresentaram halos na concentração de 100 µg/mL para a riparina III, de modo que foi determinado 200 µg/mL como sendo a CIM e 400 µg/mL como sendo a CBM, para esses produtos.

Tabela 6. Determinação da CIM e da CBM das riparinas frente às cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* por difusão em meio sólido

Riparinas [µg/mL]	Microrganismos testados										
	Diâmetro dos halos de inibição (mm)										
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i>								
			ATCC 25923	122U	319U	146FN	129FN	233FN	322FN	1A	
I	400	0	0	9	0	0	12	10	10	14	13
	200	0	0	0	0	0	10	9	9	13	12
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	400	0	0	9	0	0	13	10	10	14	10
	200	0	0	0	0	0	12	9	9	13	9
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	400	0	0	19	11	15	15	14	12	14	15
	200	0	0	18	10	14	14	13	11	13	14
	100	0	0	10	0	0	0	0	8	0	8
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: 0 = Ausência de halo

Em ambas as metodologias, determinou-se como CIM 200 $\mu\text{g/mL}$, visto que foi a concentração que, seguramente, conseguiu apresentar halo de inibição em um maior número de cepas, no método cavidade-placa, bem como de inibir o crescimento da maioria das cepas ensaiadas pelo método de microdiluição em placa. Nas linhagens de *S. aureus* ensaiadas, não se observou grandes diferenças entre os tamanhos dos halos de inibição de crescimento, em relação à CIM e a CBM, visto que na CIM para as riparinas I e II os halos variaram entre 13 a 9 mm de diâmetro enquanto que na CBM, os halos variaram entre 14 a 9 mm de diâmetro.

A riparina III foi a que demonstrou melhor atividade antimicrobiana para as cepas de *S. aureus*, em especial a ATCC 25923, apresentando halos de inibição de crescimento, que variam de 19 a 10 mm, em função das diferentes concentrações utilizadas, 400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. As riparinas I e II só apresentaram halo de 9 mm na mais alta concentração (Figura 10).

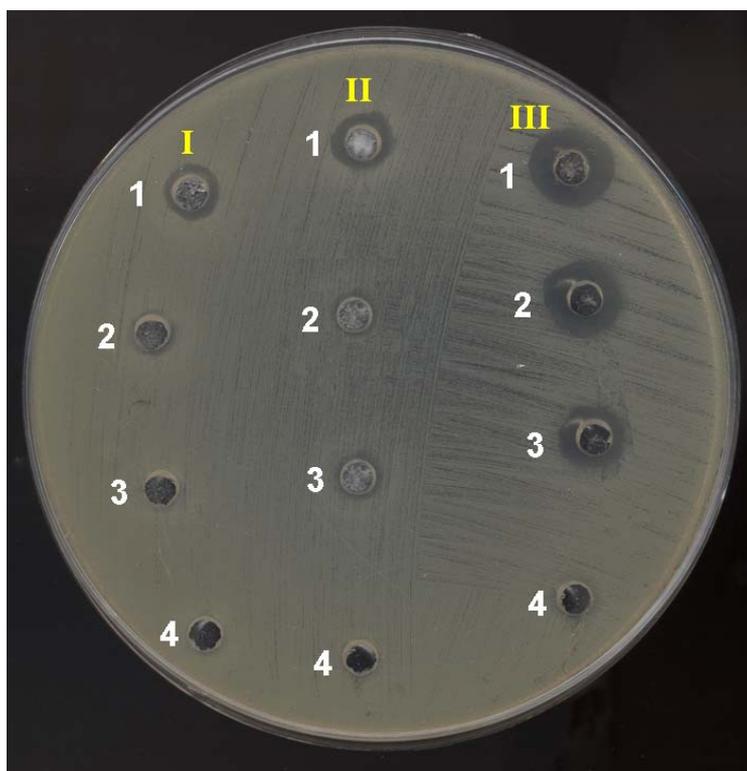


Figura 10. Perfil de suscetibilidade por difusão em meio sólido, da cepa de *S. aureus* ATCC 25923 frente às riparinas I, II e III nas concentrações de 400(1), 200(2), 100(3) e 50(4) $\mu\text{g/mL}$

Esses resultados estão em concordância com May et al. (2000), que relataram a atividade antimicrobiana *in vitro*, avaliada pela mensuração da CIM, pode ser realizada pela técnica de medição de halos ou pela determinação dos níveis de resistência. Entretanto estes procedimentos não determinam o tempo de ação do agente sobre os microrganismos, o que permite que outros parâmetros farmacodinâmicos possam ser usados para determinar a eficácia dessas substâncias.

A Figura 11 apresenta o comportamento de 12 cepas de *S. aureus* utilizadas nas determinações da CIM e da CBM para a riparina III, pelo método da microdiluição em placas, complementado com o auxílio da resazurina. Destas cepas, 8 (75%) apresentaram CIM = 200 µg/mL, apenas as cepas ATCC 25923, 233FN e 1A, foram mais sensíveis, apresentando CIM = 100 µg/mL. Esse comportamento também foi observado na determinação da CIM o pelo método de difusão em meio sólido apresentado na Tabela 6.

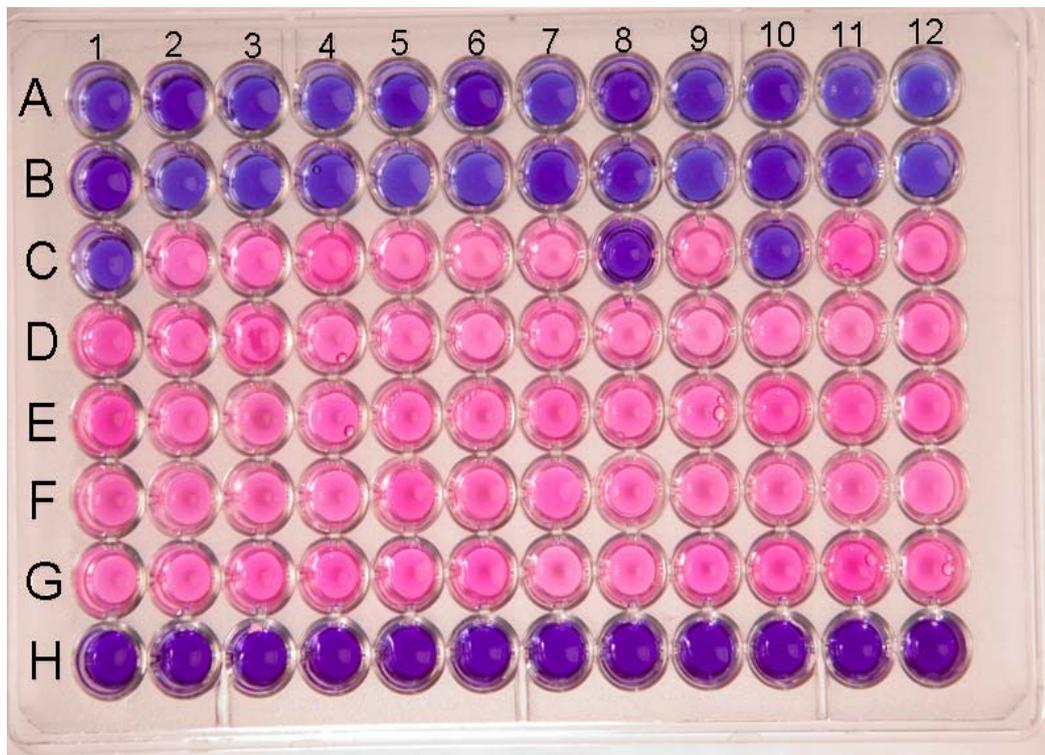


Figura 11. Determinação da CIM e CBM da riparina III frente a linhagens de *S. aureus* ATCC 25923 (1), 122U (2), 146U (3), 223U (4), 312U (5), 319U (6), 129FN (7), 233FN (8), 322FN (9), 1A (10), 46c (11), 50c (12) nas concentrações de 400(A), 200 (B), 100 (C), 50 (D), 25 (E) e 12,5 (F) µg/mL

Legenda: G = Controle Positivo (crescimento bacteriano); H = Controle Negativo (riparina III)

De acordo com os resultados obtidos, considerou-se que houve similaridade entre os dois métodos utilizados para determinação da CIM, quanto à sua sensibilidade. No entanto, de acordo com diversos pesquisadores (HADACEK; GREGER, 2000; TELLES; MOSCA, 2000; KALEMBA; KUNICKA, 2003; HOOD et al., 2003), o método de microdiluição em placas é apontado por como mais preciso inclusive, podendo também, ser utilizado para determinação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e fitoconstituintes (ALVES, 2006); é uma metodologia bastante prática e pode ser utilizada, para testar a sensibilidade microbiana, simultaneamente, a diferentes fármacos. Essas metodologias, aqui citadas, podem ser facilmente ser utilizadas, em larga escala, por laboratórios com poucos recursos tecnológicos.

É relevante registrar, que a determinação do tamanho dos halos de inibição de crescimento, sofre várias interferências, entre elas, a difusibilidade dos novos fármacos ainda em estudo, no meio de cultura. No entanto, vários autores relatam boa correlação entre os diversos métodos fenotípicos de identificação e avaliação de resistência antimicrobiana (DEVIA et al., 1988; SAKOULAS, et al.; 2001; PÉREZ-ROTH et al., 2002; BRAOIOS, 2005; PACKER; LUZ, 2007).

5.4 Classificação do perfil fenotípico das cepas de *S. aureus*

A Tabela 7 mostra que todas as amostras de *S. aureus* estudadas apresentaram as mesmas características fenotípicas, em relação à produção das enzimas catalase e coagulase, fermentação do manitol e produção de hemólise em Agar sangue.

A variação fenotípica ocorreu apenas em função do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, onde o fenótipo ou antibiograma mais encontrado foi chamado de F1, no qual se detectou resistência à penicilina e ampicilina, comum na maioria das amostras de *S. aureus*. Este comportamento também foi observado por Zavadinack-Netto et al. (2001) os quais comprovaram que a penicilina assim como a ampicilina são eficazes apenas para 8,5% das cepas de *S. aureus* isolados de infecções comunitárias, fato que restringe o uso destes antimicrobianos. De modo que, o conhecimento do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, associado à avaliação da relação genética existente entre as cepas pode fornecer valiosos dados na alternativa da profilaxia ou tratamento destas infecções (BRAOIOS, 2005).

Tabela 7. Classificação dos perfis fenotípicos das cepas de *S. aureus*

Cepas	Características fenotípicas									
	Fenótipos de resistência - Antibiotipo						Coagulase	Catalase	Fermentação do Manitol	Hemólise em Agar Sangue
	F1	F2	F3	F4	F5	F6				
122 U	PEN-AMP	ERI					+	+	+	+
146 U	PEN-AMP						+	+	+	+
223 U	PEN-AMP						+	+	+	+
312 U	PEN-AMP						+	+	+	+
319 U	PEN-AMP						+	+	+	+
129FN	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
233FN	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
322FN	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
171c	PEN-AMP			ERI-TET- OXA- AZI-SFT			+	+	+	+
8c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
18c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
43c	PEN-AMP						+	+	+	+
44c	PEN-AMP		TET				+	+	+	+
45c	PEN-AMP		TET*				+	+	+	+
46c	PEN-AMP		TET*			ERI- AMI- GEN-EST	+	+	+	+
47c	PEN-AMP		TET				+	+	+	+
48c	PEN-AMP						+	+	+	+
49c	PEN-AMP				ERI- SUF		+	+	+	+
50c	PEN-AMP				ERI- SUF		+	+	+	+
ATCC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
1 ^a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2 ^a	PEN-AMP		TET*	ERI- OXA-AZI			+	+	+	+

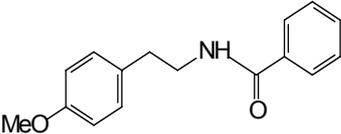
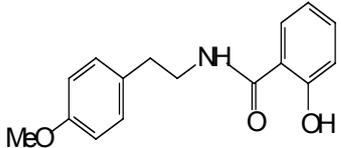
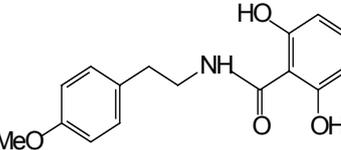
Legenda: U = úbere; FN = fossas nasais; c = clínica; A= ambiental; (+) = positivo; (-) = cepas sensíveis a todos os antimicrobianos testados; * resistente a clindamicina; PEN = penicilina G; AMP = apicilina; TET = tetraciclina; ERI = eritromicina; OXA = oxacilina; AZI = azitromicina; SFT = sulfametoxazol-trimetoprima; GEN = gentamicina; AMI = amicacina; EST = estreptomicina.

A resistência à penicilina G tem sido observada na maioria das cepas de *S. aureus*, essa ocorrência também foi observada nesse estudo, tanto nas linhagens de origem humana quanto nas de origens animal e ambiental. Esse fato, preocupante, é provavelmente reflexo do uso indiscriminado desse antimicrobiano, tão discutido nos últimos anos por diversos pesquisadores (ZAVADINACK-NETTO et al., 2001; BRAIOS, 2005; FERREIRA et al., 2006; COELHO et al., 2007).

5.5 Avaliação da relação estrutura-atividade antimicrobiana das riparinas

Na Tabela 8 estão registradas as nomenclaturas químicas das riparinas I, II e III e a relação estrutura-atividade antimicrobiana em função do número e percentual de cepas de *S. aureus* sensíveis a essas substâncias.

Tabela 8. Apresentação da relação estrutura–atividade antimicrobiana de riparinas frente a *S. aureus* (n = 22)

Riparinas (200 µg/mL)	Nomenclatura química	Estrutura química	Cepas sensíveis nº (%)
I	O–Metil– <i>N</i> – (benzoil)–tiramina ou <i>N</i> –[8'–(4'–metoxifeniletíl)]–benzoilamida		5 (22,7%)
II	O–Metil– <i>N</i> –(2– hidroxibenzoil) – tiramina ou <i>N</i> –[8'–(4'–metoxifeniletíl)]–2–hidroxi– benzoilamida		6 (27,3%)
III	O–Metil– <i>N</i> –(2,6–dihidroxibenzoil) – tiramina ou <i>N</i> –[8'–(4'–metoxipfeniletíl)]–2,6–dihidroxi– benzoilamida		20 (90,9%)

Foi observado, nesse experimento que apesar da semelhança estrutural, as riparinas possuem atividades antimicrobianas distintas. A diferença entre as riparinas I e II, reside no fato da segunda apresentar um grupo OH no C₂. Provavelmente, essa hidroxila é responsável pelo discreto aumento da ação antimicrobiana desse produto frente às cepas de *S. aureus* ensaiadas. Em relação à riparina III, o acréscimo de mais um grupo OH no C₆, foi capaz de potencializar a ação desse produto que apresentou atividade para 20 (90,9%) das cepas de *S. aureus* ensaiadas. Para essas cepas a relação estrutura-atividade antimicrobiana pode ser demonstrada como riparina III > riparina II > riparina I.

A estrutura química e a atividade biológica de compostos biologicamente ativos, estão intimamente relacionadas, porém o grande impulso em estudos nessa área ocorreu quando Hansch; Fujita (1964) propuseram um método voltado para o estudo de relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (MASUNARI; TAVARES, 2006). Os avanços dos estudos preditivos da atividade biológica de compostos análogos ainda desconhecidos, constitui, sem dúvida, uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana. Porém, ainda não são auto-suficientes a ponto de se dispensar dados experimentais (MASUNARI; TAVARES, 2006).

A Tabela 9 e o Gráfico 1 contêm os resultados diferenciais da relação estrutura-atividade antimicrobiana das riparinas I, II e III frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli* pelo método de cavidade-placa, avaliada em função da presença ou ausência de halos de inibição de crescimento. As riparinas apresentaram diferentes percentuais de atividade antimicrobiana para as cepas de *S. aureus* ensaiadas, que foram respectivamente de 22,7%, 27,3% e 90,9% para as riparinas I, II e III; enquanto que para as cepas de *E. coli*, todas as riparinas foram consideradas ineficazes, nas concentrações ensaiadas, por não apresentarem halos de inibição de crescimento. Essa diferença de ação das riparinas sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, provavelmente está relacionada às diferenças estruturais de suas membranas celulares.

Tabela 9. Avaliação do efeito das riparinas frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*

Riparinas [200 µg/mL]	Microrganismos ensaiados (nº e % de Cepas sensíveis)	
	<i>S. aureus</i> (22/100%)	<i>E. coli</i> (10/100%)
I	5 (22,7%)	0 (0%)
II	6 (27,3%)	0 (0%)
III	20 (90,9%)	0 (0%)

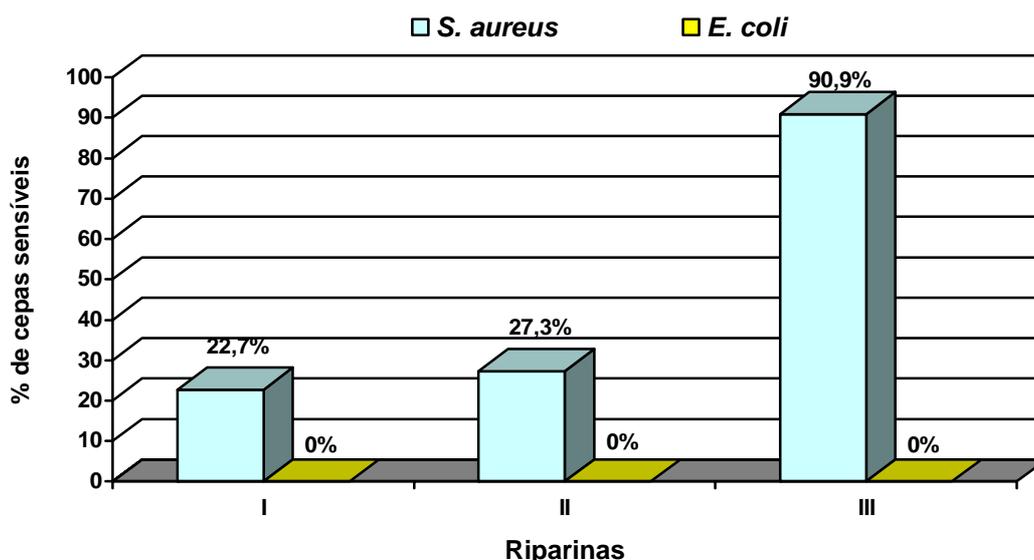


Gráfico 1. Comparação do efeito das riparinas frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*

Esses resultados estão em concordância com os relatados anteriormente por Catão et al. (2005), que além das riparinas I e III, também pesquisaram a atividade antimicrobiana da riparina XIII (O-metil-N-(3,4,5-trimetoxibenzoil-tiramina)) e consideraram a riparina III como o produto mais ativo da série, frente a linhagens de *S. aureus* multirresistentes, de origem humana, apresentando atividade para 11(91,7%) das cepas ensaiadas. Com relação à atividade antimicrobiana dessas riparinas frente às cepas de *E. coli*, esses autores verificaram a presença de discretos halos de inibição de crescimento, apresentando 7 mm. É provável que essa diferença comportamental encontrada em *E. coli*, esteja relacionada às características fenotípicas de resistência das linhagens nos dois experimentos.

5.6 Avaliação da cinética bacteriana

As tabelas 10, 11 e 12 a seguir, apresentam respectivamente, os resultados dos valores médios dos efeitos das riparinas I, II e III sobre as linhagens de *S. aureus* ATCC 25923, 319U e 122U, determinando-se o número de células viáveis através do número de Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL, em função do tempo de exposição desses microrganismos às riparinas.

Foi observado, na linhagem ATCC 25923, que as riparinas I e II mantiveram lentidão na taxa de multiplicação celular nas primeiras 4 horas de exposição, em relação ao que inóculo inicial de $2,17 \times 10^6$ UFC/mL, quando comparado com o controle de crescimento sem adição de riparinas. Observou-se nesse controle de crescimento, que a viabilidade celular, atingiu o valor máximo de 10^{12} UFC/mL após 10 horas de incubação, apresentando relação percentual entre o desvio padrão (DP) e a média aritmética (M) dos ensaios (DP/M) de 5,59% (Apêndice A). No entanto, quando em contato com as riparinas, houve uma redução na taxa de crescimento bacteriano, representada por $2,70 \times 10^8$ UFC/mL, $4,10 \times 10^7$ UFC/mL e $1,32 \times 10^3$ UFC/mL, respectivamente, para as riparinas I, II e III. Observou-se ainda que a riparina III, conseguiu gradativamente diminuir ainda mais, o número de células viáveis, passando para valores médios de $2,50 \times 10^2$ UFC/mL e 0 UFC/mL, após exposição por 24 e 48h/37°C, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* ATCC 25923, frente às riparinas

Tempo de exposição ao produto (Horas/37°C)	Controle de crescimento (UFC/mL)	Riparinas (200 µg/mL)		
		I (UFC/mL)	II (UFC/mL)	III (UFC/mL)
0h	2,17E+06	2,17E+06	2,17E+06	2,17E+06
2h	6,00E+06	2,47E+06	6,20E+06	7,90E+05
4h	2,10E+07	2,57E+06	3,90E+06	8,24E+05
6h	4,00E+08	3,70E+07	2,30E+07	9,72E+04
8h	2,00E+10	4,60E+07	8,60E+07	3,22E+04
10h	1,00E+12	2,70E+08	4,10E+07	1,32E+03
24h	2,40E+10	3,10E+08	7,20E+08	2,50E+02
48h	2,80E+09	1,00E+08	1,00E+08	0,00

Os resultados apresentados no Gráfico 2 constataram que as riparinas I e II apresentaram comportamentos semelhantes e compatíveis com ação bacteriostática, enquanto que a riparina III apresentou ação considerada como bactericida, para a linhagem em estudo (ATCC 25923).

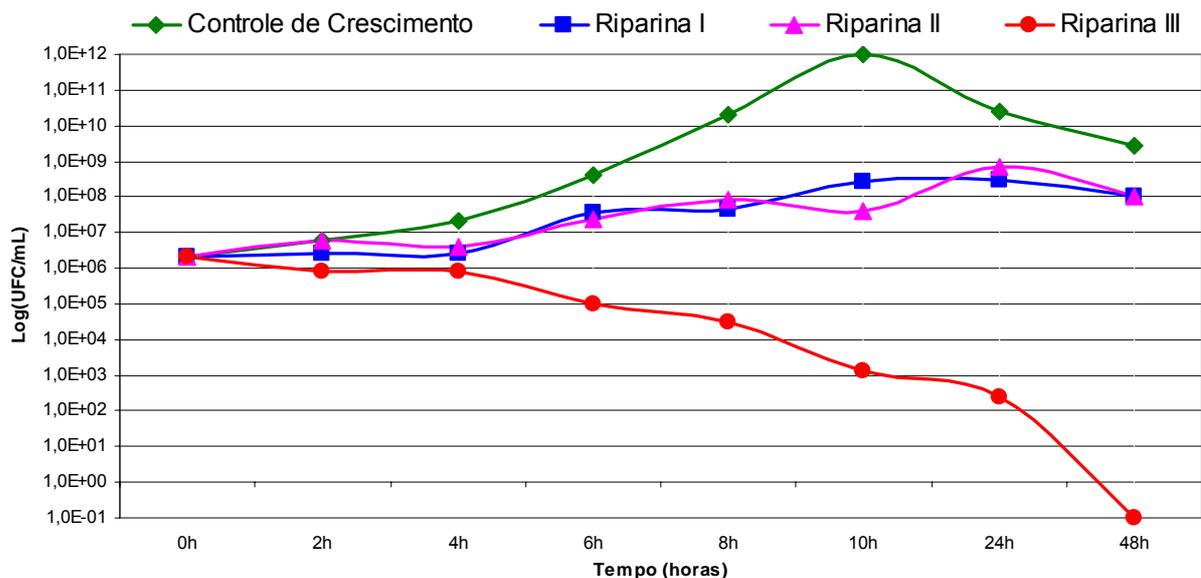


Gráfico 2. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* ATCC 25923 frente às riparinas

Em relação às linhagens de *S. aureus* 319U e 122U, também foram observados comportamentos semelhantes aos da cepa ATCC 25923; no entanto, o tempo considerado como ponto máximo de viabilidade dessas linhagens sem adição das riparinas foi de 8h de exposição, onde a linhagem 319U atingiu um crescimento populacional com valor médio de $3,3 \times 10^{12}$ UFC/mL, com relação percentual do

DP/M de 3,03% (Apêndice B) e quando exposta às riparinas I, II e III essa taxa de contagem passou, respectivamente para $5,24 \times 10^7$ UFC/mL, $2,03 \times 10^7$ UFC/mL e $3,01 \times 10^5$ UFC/mL. Após incubação por 48h/37°C, apenas a riparina III reduziu a zero o número de UFC/mL, as riparinas I e II, mantiveram basicamente o mesmo valor de UFC/mL do inóculo inicial (Tabela 11 e Gráfico 3).

Tabela 11. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* 319U frente às riparinas

Tempo de exposição ao produto (Horas/37°C)	Controle de crescimento (UFC/mL)	Riparinas (200 µg/mL)		
		I (UFC/mL)	II (UFC/mL)	III (UFC/mL)
0h	2,27E+06	2,27E+06	2,27E+06	2,27E+06
2h	6,62E+07	5,13E+06	1,62E+07	2,85E+06
4h	3,30E+08	2,39E+06	1,26E+08	3,27E+06
6h	2,50E+09	3,85E+07	7,93E+07	7,54E+05
8h	3,30E+12	5,24E+07	2,03E+07	3,01E+05
10h	1,00E+11	4,73E+07	1,52E+07	2,94E+04
24h	1,00E+10	5,57E+06	1,88E+06	1,24E+03
48h	2,28E+09	4,67E+06	3,97E+06	0,00

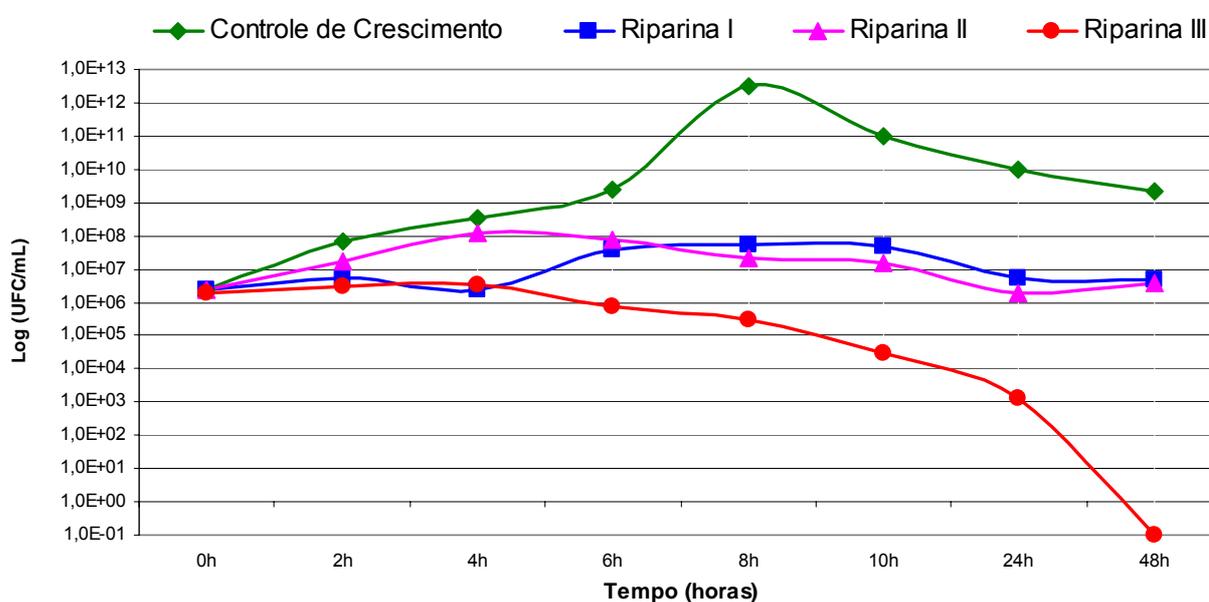


Gráfico 3. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* 319U frente às riparinas

A linhagem 122U, atingiu o ponto máximo de viabilidade, $3,2 \times 10^{11}$ UFC/mL, também após 8 horas de inoculação, com relação percentual do DP/M de 3,13% (Apêndice C) e quando exposta às riparinas I, II e III essa contagem passou, respectivamente para $1,67 \times 10^7$ UFC/mL, $3,80 \times 10^7$ UFC/mL e $2,26 \times 10^4$ UFC/mL. Os efeitos apresentados pelas riparinas, foram de interferência no crescimento

bacteriano, impedindo ou retardando a multiplicação celular (riparina I e II) e morte celular (riparina III) após 48h de inoculação (Tabela 12 e Gráfico 4).

Tabela 12. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* 122U frente às riparinas

Tempo de exposição do produto (Horas/37°C)	Controle de crescimento (UFC/ml)	Riparinas (200 µg/mL)		
		I (UFC/mL)	II (UFC/mL)	III (UFC/mL)
0h	3,60E+06	3,60E+06	3,60E+06	3,60E+06
2h	1,74E+07	5,33E+06	7,77E+06	4,60E+06
4h	2,60E+09	6,67E+06	8,49E+06	2,47E+05
6h	4,80E+09	6,17E+06	1,24E+07	3,70E+04
8h	3,20E+11	1,67E+07	3,80E+06	2,26E+04
10h	4,67E+10	4,53E+07	4,50E+07	4,80E+03
24h	1,00E+10	5,71E+07	8,40E+05	3,97E+02
48h	1,87E+09	3,37E+07	9,23E+06	0,00

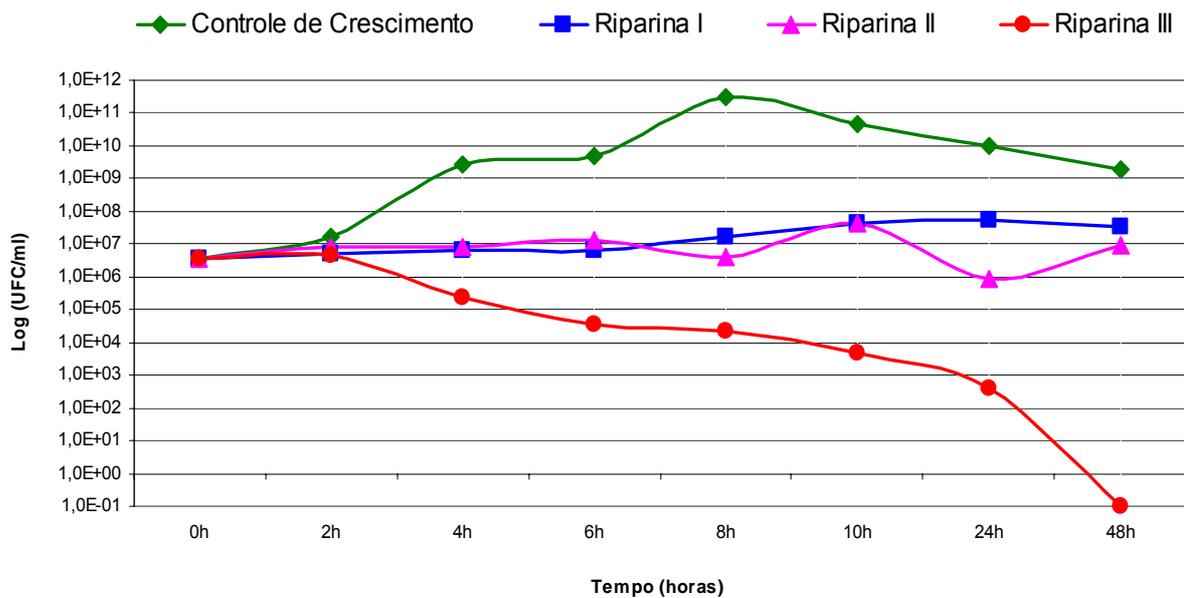


Gráfico 4. Cinética bacteriana da cepa de *S. aureus* 122U frente às riparinas

Os resultados apresentados são bastante significativos, visto que a atividade bactericida da CIM da riparina III sobre as cepas de *S. aureus* ensaiadas, ficaram bem caracterizados após 6h, 8h e 10h de incubação, quando se observou redução de 2 log₁₀ UFC/mL do inóculo inicial, atingindo a redução de 4 log₁₀ UFC/mL em 24h, respectivamente para as cepas ATCC 25923 e 122U; e 3 log₁₀ UFC/mL para a cepa 319U. As riparinas I e II mantiveram o inóculo bacteriano, sempre próximo ao valor do inóculo inicial, por todo o período de tempo avaliado, mostrando graus

menores de interferência na morte celular. De alguma forma as riparinas I e II impediram a multiplicação celular, apresentando efeito bacteriostático sobre linhagens de *S. aureus*. Porém, o modo como atuam ainda precisa ser esclarecido.

Segundo May et al. (2000), o efeito bactericida pode ser observado pela diminuição de 3 log 10 UFC/mL ou 99% de morte celular, à partir do inóculo inicial, sobre um tempo determinado, enquanto que, Jones et al. (2002) e Shelburne et al. (2004), consideram significativamente satisfatória, a cinética bactericida de um produto, quando este é capaz de reduzir o inóculo inicial, respectivamente, para valores iguais ou superiores a 2 log 10 UFC/mL e 3 log 10 UFC/mL, em um tempo menor ou igual a 24 horas de incubação e consideram graus menores de morte celular como efeito bacteriostático. De acordo com estas definições, pode-se considerar que as riparinas I e II apresentam efeito bacteriostático e a riparina III, efeito bactericida para as linhagens de *S. aureus* ensaiadas.

O efeito bactericida da riparina III está apresentado nas Figuras 12 e 13 sob dois aspectos: visualização da redução gradual do número de microrganismos (UFC/mL) e ausência de viabilidade celular. A Figura 12 mostra de forma comparativa a evolução do crescimento bacteriano, da linhagem 319U inoculada com e sem adição da riparina III, comprovando o efeito bactericida dessa riparina após exposição por diferentes intervalos de tempo de incubação a 37°C, pela redução do número de microrganismos. A Figura 13 apresenta a leitura colorimétrica desse efeito, bactericida, produzido pela riparina III, sobre as linhagens 319U e 122U utilizadas na cinética, visualizado após adição de 0,5 mL de resazurina (0,1%) às suspensões bacterianas, incubadas por 24/37°C, indicando inviabilidade celular.

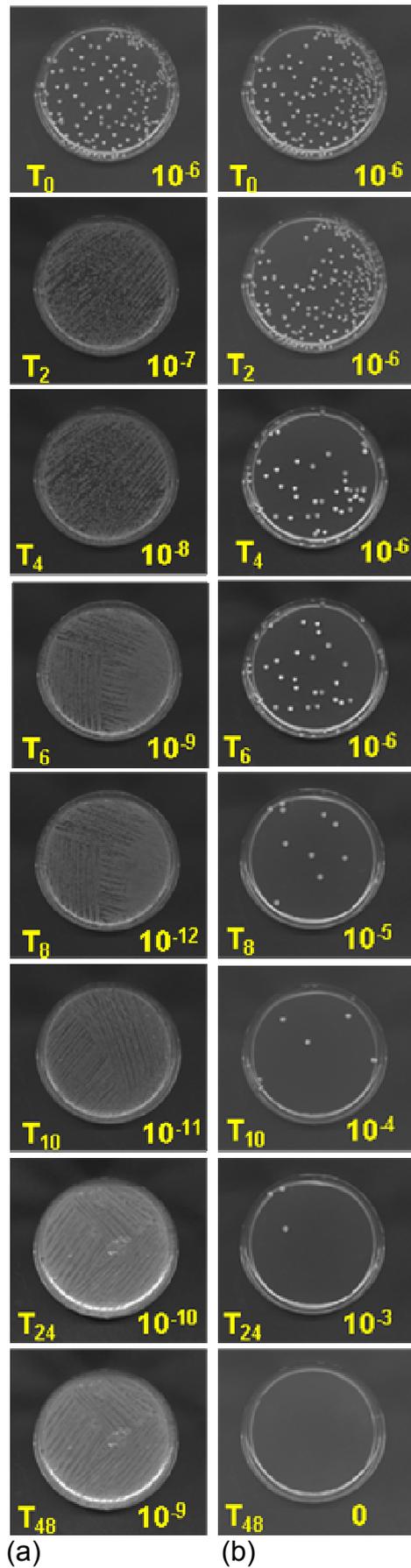


Figura 12. Demonstração do crescimento bacteriano (a) e do efeito da riparina III sobre a cepa de *S. aureus* 319U (b) em diferentes espaços de tempo

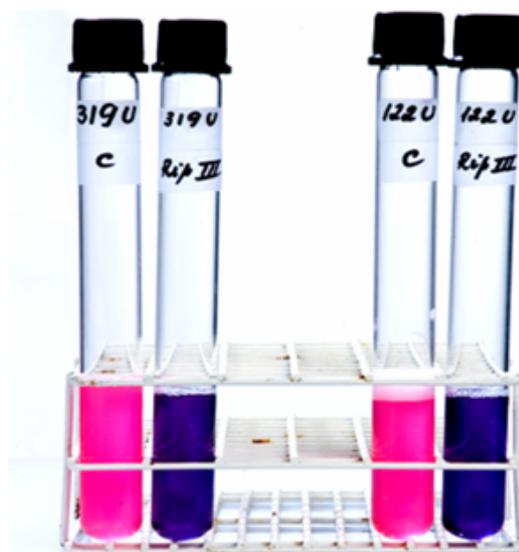


Figura 13. Efeito bactericida da riparina III sobre *S. aureus* após exposição por 24h/37°C

Legenda: Tubos C (319U e 122U) = Controle de crescimento (suspensão bacteriana sem riparina = Presença de células viáveis); Tubos Rip III (319U e 122U) = Inóculo bacteriano (suspensão bacteriana contendo riparina III = Morte bacteriana).

Diante do problema da resistência aos antimicrobianos, várias pesquisas sobre a cinética bacteriana têm sido realizadas buscando-se novos produtos que apresentem eficácia sobre os microrganismos, oportunistas, emergentes ou re-emergentes. Produtos naturais tais como, extrato de *Punica granatum* Linn. (romã) (SILVA, 2004a; CATÃO et al., 2006; PACKER; LUZ, 2007), *Anacardium occidentale* Linn. (cajueiro) (SILVA, 2004b), própolis (ADELMANN, 2005), *Rosmarinus officinalis* Linn. (MARTINS, 2005), *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (jurema-preta) (PADILHA, 2006), *Ocotea duckei* (ANTUNES et al., 2006), *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes (barbatimão) (SANTOS et al., 2007), e óleos essenciais de *Mentha x villosa* (ARRUDA et al., 2006) e *Baccharis dracunculifolia* D.C. (óleo de vassoura) (FERRONATTO et al., 2007), também apresentam atividade bactericida sobre *S. aureus* e podem se tornar possíveis campos de desenvolvimento de novas estratégias no tratamento de infecções promovidas por esses microrganismos, incluindo amostras multirresistentes (BRITO, 2003). A maioria desses extratos e óleos essenciais apresenta efeitos bactericidas sobre cepas de *S. aureus* num menor espaço de tempo, em média, entre as oito primeiras horas de contato com as amostras. No entanto, essa diferença de tempo, para a redução do número de

microrganismos não diminui a eficácia da riparina III, sobre esses microrganismos, que conseguiu reduzir a 0 UFC/ml após 48 horas de contato.

É relevante ressaltar que o efeito bactericida ou bacteriostático que esses produtos possam causar está relacionado não só ao tempo de exposição, a concentração de cada produto como também, as características fenotípicas das linhagens em estudo.

5.7 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de riparinas sobre linhagens de *Candida albicans*

As riparinas I, II e III, não apresentaram halo de inibição sobre o crescimento fúngico, pelo método de cavidade-placa, para nenhuma das 6 cepas de *C. albicans* ensaiadas neste estudo (Tabela 13).

A ausência de atividade antifúngica encontrada neste estudo contradiz os resultados citados por Marques (2001) que mostrou atividade antibiótica, *in vitro*, de um extrato dos frutos e dos cálices persistentes de *A. riparia* contra *C. albicans*. É provável que a divergência entre esses resultados, esteja relacionada ao fato de que nos extratos encontram-se várias substâncias e que juntas, atuem interagindo entre si, podendo potencializar a ação antimicrobiana; não se podendo afirmar, no entanto, qual delas, isoladamente, realmente apresenta tal atividade.

Tabela 13. Perfil de suscetibilidade das cepas de *C. albicans* frente às riparinas

Cepas ensaiadas	Diâmetros dos halos de inibição (mm)		
	Riparinas (200µg/mL)		
	I	II	III
<i>C.albicans</i> ATCC 76643	0	0	0
<i>C.albicans</i> 01	0	0	0
<i>C.albicans</i> 02	0	0	0
<i>C.albicans</i> 03	0	0	0
<i>C.albicans</i> 04	0	0	0
<i>C.albicans</i> 05	0	0	0
Total de cepas testadas/ % de sensibilidade	6 (0%)	6 (0%)	6 (0%)

Legenda: (0) = Ausência de halo de inibição de crescimento fúngico.

5.8 Avaliação da cinética fúngica

Mesmo não tendo apresentado atividade antifúngica *in vitro*, observada através da ausência de halos de inibição de crescimento, realizou-se a avaliação do efeito da riparina III frente à cepa e *C. albicans* ATCC 76643, em diferentes tempos de incubação por até 72 horas de exposição, para avaliação da cinética fúngica estabelecendo-se a concentração de 200 µg/mL igual a usada nos ensaios bacterianos como sendo a concentração padrão para esse ensaio, visto que segundo Cantón; Pemán (1999), as curvas de crescimento/morte tanto para as leveduras quanto para as bactérias, são determinadas do mesmo modo, ainda que nem todas as definições usadas em bacteriologia sirvam para a micologia.

Foi observado que as riparinas não influenciaram na multiplicação fúngica nos tempos pré-estabelecidos. Esse resultado está baseado no comportamento da cepa de *C. albicans* ATCC 76643, que se manteve viável por todo o período de exposição ao produto, apresentando a mesma taxa de crescimento do teste controle, sem adição da riparina (Tabela 14)

Tabela 14. Cinética fúngica e efeito *in vitro* da riparina III sobre *C. albicans* ATCC 76643

Tempo de exposição ao produto (Horas/35°C)	Controle de crescimento (UFC/mL)	Riparina III (200 µg/mL)
0	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$
2	$8,5 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$
4	$9,2 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$
6	$3,2 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$
8	$5,9 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
10	$7,3 \times 10^9$	$6,2 \times 10^9$
24	$2,8 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{10}$
48	$2,3 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$
72	$>10^{10}$	$>10^{10}$

O Gráfico 5 apresenta comparativamente o comportamento da multiplicação celular da cepa de *C. albicans* ATCC 76643, após inoculação em caldo Sabouraud contendo riparina III. O resultado da cinética fúngica mostra que a riparina III não foi capaz de causar nenhum efeito inibitório sobre o crescimento populacional nessa linhagem visto que não houve decaimento em nenhum dos tempos de exposição.

Esse resultado coincide com o resultado da atividade antifúngica por difusão em meio sólido (cavidade-placa).

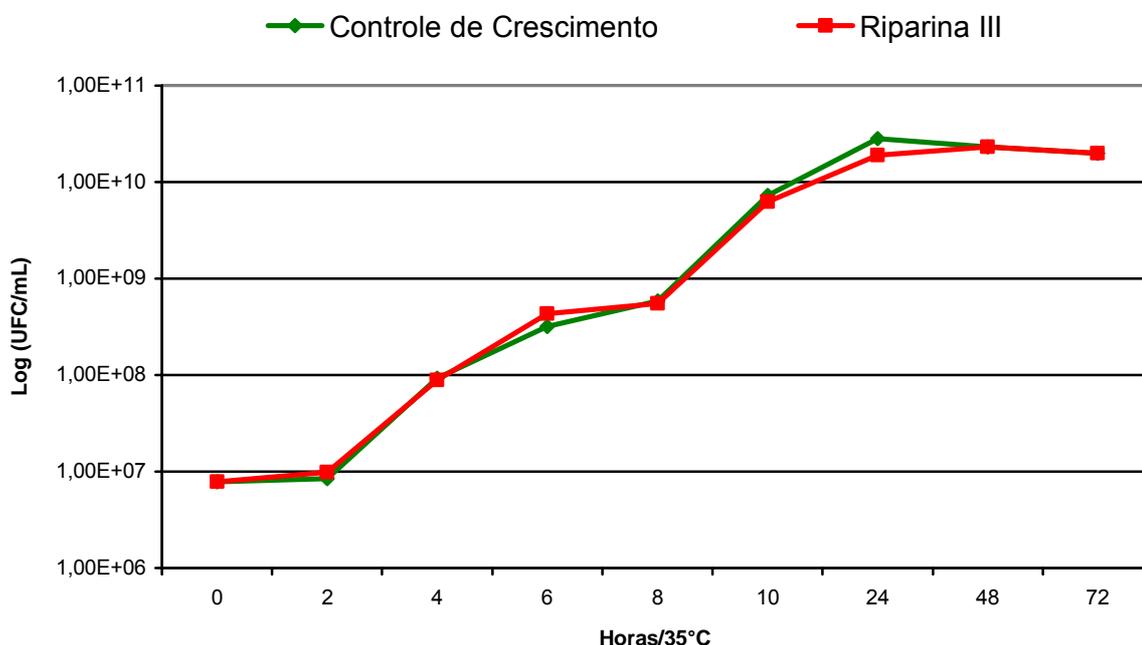


Gráfico 5. Cinética fúngica da cepa de *C. albicans* ATCC 76643 frente à riparina III

Apesar do mecanismo de ação da atividade antimicrobiana das riparinas ainda não ter sido elucidado, é provável que essas substâncias atuem de forma semelhante à maioria dos fármacos que apresentam atividade antimicrobiana de forma seletiva, ou seja, quando apresentam atividade antibacteriana, geralmente não apresentam atividade antifúngica. Esse resultado comprova a grande diferença de ação existente entre substâncias antibacterianas e antifúngicas que está relacionada não só à estrutura molecular desses compostos como também, e principalmente, as diferenças celulares existentes entre os dois grupos microbianos estudados.

5.9 Avaliação da atividade curagênica

As duas amostras representativas de *S. aureus* (linhagens 319U e 122U), com marcas de resistência para penicilina (plasmídeos penicilinase) e para eritromicina selecionadas para esse estudo, apresentaram, respectivamente, CIM de 16 µg/mL e 128 µg/mL para penicilina e 16 µg/mL e 512 µg/mL para eritromicina indicativo de resistência a esses antibióticos.

Após 24 horas de exposição às riparinas I, II e III, em concentrações sub-inibitórias (1/2 CIM = 100 µg/mL), tiveram seu comportamento mais uma vez avaliados e observou-se que as riparinas I e II não causaram nenhum efeito sobre a eliminação da marca de resistência a penicilina nessas linhagens, mantendo a CIM desses antimicrobianos inalterada. No entanto a riparina III, foi capaz de produzir reversão fenotípica em uma das linhagens (319U), que teve sua marca de resistência à penicilina eliminada ou inexpressada, passando a apresentar CIM de 0,064 µg/mL, indicando sensibilidade a esse antibiótico. De acordo com o NCCLS (2004), é considerado como resistente cepas de *S. aureus* que apresentem CIM $\geq 0,25$ µg/mL. As riparinas não causaram efeitos sobre a eliminação da marca de resistência à eritromicina nessas linhagens.

A reversão fenotípica pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles a ação de substâncias capazes de eliminar e/ou impedir a expressão de um determinado gene (PEREIRA, 2000). Esse resultado indica que ocorreu alguma modificação relacionada ao gene da resistência à penicilina. A linhagem 122U não foi afetada pela ação das riparinas, em relação à eliminação das marcas de resistência à penicilina nem a eritromicina, indicando nesse caso, que não foram eficazes para promover cura de plasmídeos (Tabela 15).

Tabela 15. Linhagens de *S. aureus* com marcas de resistência para penicilina e eritromicina

Linhagens	Marca de resistência	CIM (µg/mL)	CIM* (µg/mL)			Resistência** (µg/mL)
			Riparinas (200µg/mL)			
			I	II	III	
319U	Pen	16	16	16	0,064	$\geq 0,25$
	Eri	8	8	8	8	≥ 8
122U	Pen	128	128	128	128	$\geq 0,25$
	Eri	16	16	16	16	≥ 8

Legenda: Pen = penicilina G; Eri = eritromicina * CIM após tratamento por riparinas; ** Referência = NCCLS, 2004.

Na Tabela 16 e no Gráfico 6 encontram-se os resultados da ação das riparinas na frequência de eliminação da marca de resistência à penicilina (plasmídeos penicilinase). Observou-se após tratamento com as riparinas I, II e III, que a amostra 122U não apresentou nenhuma variante sensível, indicando ausência de cura de plasmídeos com esses produtos, nessa linhagem. Também não foi

observada nenhuma variante sensível após tratamento com as riparinas I e II para a linhagem 319U. No entanto após tratamento com riparina III, que mostrou ser a mais eficiente do grupo estudado, foi observada a eliminação de resistência para penicilina na amostra 319U, numa frequência de 61,7%. Essa frequência foi calculada como a percentagem de colônias sensíveis a esse antimicrobiano sobre o total de colônias ensaiadas (no mínimo, 200 colônias em cada experimento). A elevada frequência encontrada nesse estudo, pela riparina III é superior à encontrada nos produtos tidos como padrão curagênico como é o caso do brometo de etídio e de outras substâncias como rifampicina, novobiocina e coumermicina (PEREIRA et al., 2004).

Diferentes percentuais de frequência de cura podem ser encontrados em substâncias de um mesmo grupo farmacológico, de modo que esses resultados estão em concordância com os relatados por Pereira et al. (2004), que encontraram diferentes percentuais de frequência de cura de plasmídeos por fluorquinolonas e observaram que a ciprofloxacina eliminou resistência para a penicilina na amostra 319U numa frequência de 0,88% não eliminando para outras linhagens de *S. aureus* (223U e 233FN). Observaram também, que a norfloxacina eliminou resistência para penicilina numa frequência de 0,49% para a linhagem 223U, não eliminando para a 319U, indicando que a eliminação de resistência por fluorquinolonas sofre variações; fato semelhante ao encontrado nesse estudo, em relação ao comportamento das riparinas frente às linhagens 122U e 319U. Entretanto, a flutuação na eliminação de plasmídeos é uma característica que pode refletir peculiaridades genóticas das linhagens em estudo (LACEY; CHOPRA, 1974).

Tabela 16. Frequência da eliminação da marca de resistência à penicilina por riparinas em linhagens de *S. aureus*

Riparinas [100µg/mL]	nº de colônias ensaiadas / nº de variantes sensíveis		Frequência de cura (%)	
	319U	122U	319U	122U
I	520/0	218/0	0,00	0,00
II	491/0	293/0	0,00	0,00
III	311/192	392/0	61,7	0,00

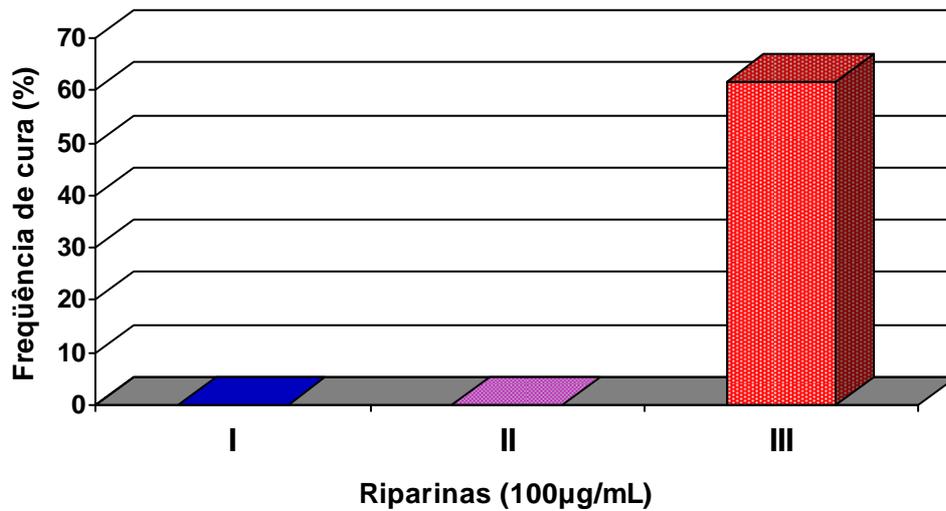


Gráfico 6. Frequência da eliminação da marca de resistência à penicilina por riparinas em *S. aureus* linhagem 319U

A confirmação fenotípica da eliminação da resistência à penicilina na linhagem 319U, após tratamento com riparina III, foi observada por três metodologias diferentes: por “imprint” ou réplica em placa de BAB com adição de penicilina, onde se observou ausência de crescimento de algumas colônias, sensíveis à penicilina (Figura 14), pelo antibiograma para caracterização do perfil de sensibilidade dessas variantes sensíveis (Figura 15), e em seguida pelo E-test para determinação da CIM à penicilina (Figura 16).

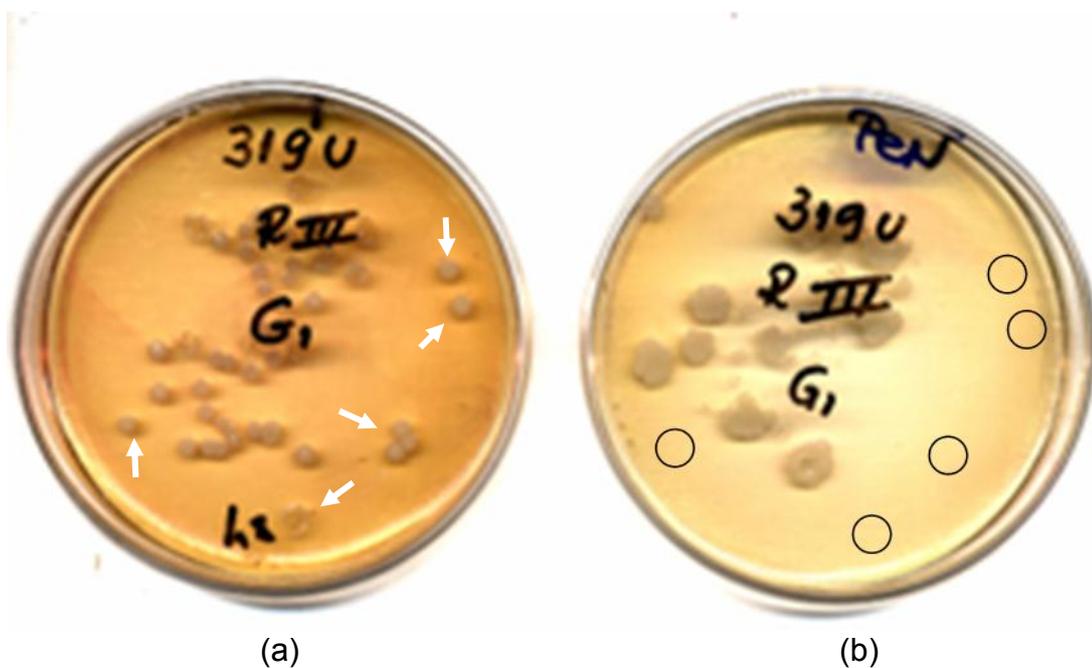


Figura 14. Variantes da linhagem 319U após tratamento com riparina III, placa matriz – BAB (a) e placa “imprint” - BAB-penicilina (b)

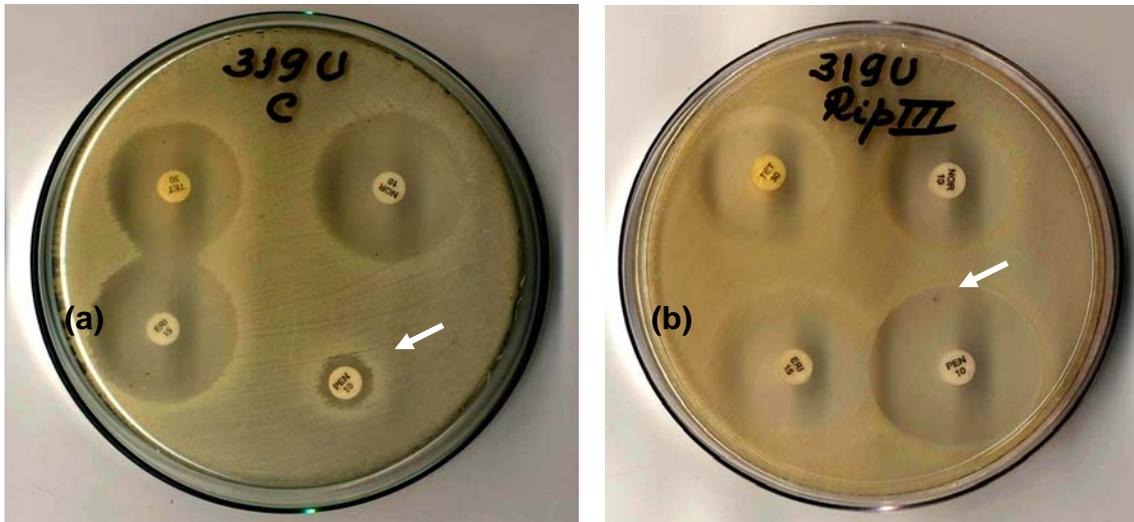


Figura 15. Antibiograma da linhagem 319U antes do tratamento de cura pela exposição à riparina III (a) e de sua “variante” sensível à penicilina após o tratamento (b)

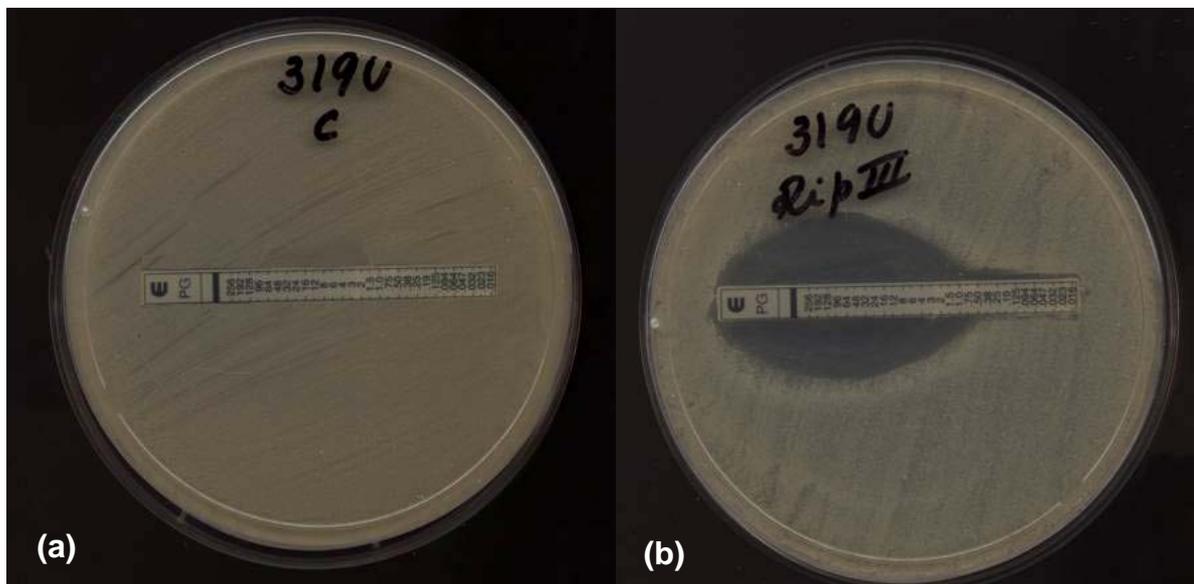


Figura 16. E-test para penicilina da linhagem de *S. aureus* 319U antes (a) e após exposição à riparina III – confirmação de cura (b)

A Figura 17 apresenta o resultado do E-test realizado para algumas variantes da linhagem 319U obtidas após tratamento com a riparina III, as quais passaram a ser penicilina-sensíveis apresentando CIM de 0,064 $\mu\text{g/mL}$.



Figura 17. Determinação da CIM para penicilina por E-test em “variantes” 319U

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos estudos de atividades microbiológicas *in vitro*, permitiram concluir que:

- As riparinas I, II e III apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* sobre a maioria das linhagens de *S. aureus* de origem animal.
- As riparinas I, II e III não apresentaram atividade antimicrobiana sobre as cepas: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *C. albicans* ATCC 76643, nem sobre as linhagens ambulatoriais, ensaiadas. Também não apresentaram atividade para as linhagens MRSA
- A riparina III apresenta maior potencial antimicrobiano *in vitro* sobre linhagens de *S. aureus* sensíveis ou resistentes à penicilina, de origem animal, humana e ambiental, quando comparadas com as riparinas I e II.
- Estudos de cinética bacteriana demonstraram que as concentrações inibitórias mínimas das riparinas I e II exercem um efeito bacteriostático e que a riparina III apresenta um efeito bactericida sobre as linhagens de *S. aureus* ensaiadas.
- A avaliação da estrutura-atividade antimicrobiana demonstrou que as riparinas I, II e III apresentam pequenas diferenças estruturais, porém distintos efeitos *in vitro* para as linhagens de *S. aureus* ensaiadas.
- A riparina III apresenta potencialidade sobre cura de plasmídeo penicilinase e/ou alteração no gene da expressão da resistência à penicilina.
- A frequência de cura do plasmídeo penicilinase pela riparina III, foi superior à encontrada na literatura para outros produtos curagênicos, tidos como “padrão ouro”.

7 PERSPECTIVAS

À resistência bacteriana é um sério problema de saúde pública mundial e deve ser abordado sob vários aspectos, entre eles o entendimento dos processos relacionados à ação dos antimicrobianos e ao surgimento da resistência, o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes e sua possível aplicação terapêutica de forma racional. É conveniente ressaltar também a importância da adoção de medidas normativas para o controle de infecções nosocomiais.

Os recentes avanços na identificação e compreensão dos novos mecanismos de ação dos antimicrobianos mostram que diversos fatores podem ser responsáveis pela potência de uma determinada substância, contribuindo de maneira diferenciada para a atividade antimicrobiana.

A compreensão dos mecanismos de defesa microbiana e dos fenômenos associados ao surgimento de resistência a partir de transferência genética ou por mutações espontâneas ou por mutações induzidas, permite o planejamento de estratégias para controlar e debelar linhagens resistentes.

O desenvolvimento de novos agentes bactericidas pode ser alcançado pela elaboração racional de novas gerações de antimicrobianos visando suplantar a resistência, através de programas direcionados ao descobrimento de produtos naturais e sintéticos bioativos.

Considerando o efeito bactericida *in vitro* que a riparina III apresentou sobre linhagens de *S. aureus*, nesse estudo, sugere-se que mais pesquisas sejam realizadas, como a determinação de sinergismo e/ou antagonismo entre agentes antimicrobianos, visando conhecer o mecanismo de ação dessa substância assim como o(s) mecanismo(s) de resistência; e determinação de sua potencialidade terapêutica através de estudos *in vivo*, no sentido de encontrar métodos alternativos de controle de patógenos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Curitiba, 2005. 186p. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

AGUIAR de E. Agentes antimicrobianos com inibidores de betalactamases: associações, mecanismos de resistência, uso adequado. **Brasília Med.** v.40, n.1/4, p. 27-32, 2003,

AL-MASAUDI, S. B.; DAY, M. J.; RUSSEL, A. D. Effect of some antibiotics and biocides on plasmids transfer in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.71, p. 239 – 243,1991.

ALVES, A. J. **Atividade biológica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre espécies de *Mycobacterium***. João Pessoa, Tese de Doutorado. 2006. 143p. Universidade Federal da Paraíba.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E.F.A.; JÚNIOR A. S.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medical plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, 2000.

ANTUNES, R. P. M; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v.16, n.4, p,517-524, 2006.

ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of curcuma longa L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,Rio de Janeiro v.96, p.723-728, 2001.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; SALES, T. P.; LEITE, C. P.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUZA, F. C. F. Estudo da atividade anti-inflamatória de *N*-benzoli-tiramina (riparina I) de *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) em camundongos. In:

XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** Produtos Naturais 44.089, 2006.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. P. M.; CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. P. M.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.3, p.307-311, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre v.13, n.2, p.85-102, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of several new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, São Paulo, v.13, n.4, p. 332-334. 1990.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, Cambridge, v.26, n.9, p.2615-2617, 1987

BAUER, A. N.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BEART, J. E.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Plant polyphenols - secondary metabolism and chemical defense: some observations. **Phytochemistry**, Cambridge v. 24, p.33-38, 1985.

BERNARDES, R. C.; JORGE, A. O. C.; LEÃO, M. V. P. Sensibilidade à oxacilina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. **Revista de Biociências**, Taubaté, v.10, n.1-2, p. 73-78, 2004.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.7, n.6, p.1513-1523, 1979.

BRAGA, L. C.; LEITE, A. A. M; XAVIER, K. G. S.; TAKAHASHI, J. A.; BEMQUERER; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Synergic interation between pomegrate extract in antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.51, n.7, p.541-547, 2005.

BRAOIOS, A. **Estudo de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) por técnicas genótípicas e fenotípicas**. Araraquara – SP, 2005. 103p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**, 21ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.158.

BROWN, D. F. J. BROWN, L. Evaluation of the E-test a novel method of quantifying antimicrobial activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.27, p.185-190, 1991.

BRITO, T. B. M. **Análise fitoquímica e investigação da atividade antibacteriana de plantas medicinais utilizadas popularmente contra infecções**. Rio de Janeiro, 2003. 199p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BURGESS, D. S. Princípios Farmacodinâmicos dos Tratamentos Antimicrobianos na Prevenção da Resistência. In: **PLE CHEST** The Cardiopulmonary and Critical Care Journal (edição em português). Northbrook (Illinois). Suplemento 2, n.1, p.19-23, 2000.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antimicrobial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:h7. **Letters in Applied Microbiology**, Great Brickhill-UK, v.26, n.3, p.162-167, 2003.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação da atividade antimicrobiana de extratos de planta de uso popular como antinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.12, p.132-135, 2002.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Curvas de letalidad em antifúngicos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, v.16, p.82-85, 1999.

CARDOSO, H. F. T. **Caracterização de fatores de virulência e sensibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.** 1998. 80p. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais – Medicina Veterinária.

CARVALHO, J. C. T.; SARTI, S. J. **Produção de extratos vegetais para uso terapêutico e cosmético.** Ribeirão Preto: Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais de Ribeirão Preto, 1995.

CASALS, J. B. Tablet sensibility testing of pathogenic fungi. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 32, p. 719-722, 1979.

CASTELO-BRANCO, U. V. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-hidroxibenzil)-tiramina.** 1992. 133p. Dissertação de Mestrado. João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba.

CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 19, n.3, p.197-202. 2000.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R. P. M. A. Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p.247-249, 2005.

CATÃO, R. M. R.; ANTUNES, R. P. M. A.; ARRUDA, T. A.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S. ALVES, J. A.; PASSOS, M. G. V. M.; SANTOS, V. L. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro v.38, n.2, p.111-114, 2006.

CEBALLOS, B. S. O. **Salmonelose endêmica da criança em São Paulo: Sorotipos, Clones e Origem Nosocomial.** 1984. 73p. São Paulo. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina.

CHAO, S. C.; YOUNG, G. D.; OBERG, C. L. Screening of inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v.12, p. 639-649, 2000.

CHARTONE-SOUZA, E. Genética de Resistência Bacteriana a Drogas. In: **Anais... XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**. Gramado. Rio Grande do Sul: Comunicação Impressa, 2004, p.52.

CHIN LÜ, Y. *In vitro* study of pyrrolnitrin. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.70, n.8, p.19-22, 1971.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 739-788, 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. v. 23, n.1. Substitui a Norma M2-A7, v.20, n.1. 2005.

COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Clínica Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.196-200, jan-dez, 2007.

COLE, M. D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – Critical Review. **Biochemical Systematics and Ecology**, London, v.22, p.837-856, 1994.

COLEMAN, D. C.; RINALDI, M. G.; HAYNES, K. A.; REX, J. H.; SUMMENBELL, R. C.; ANAISSIE, E. J.; LI, A.; SULLVAN, D. J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, London, v.35, n.1, p. 156-165, 1998.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. **L'antibiogramme**, Ed. MPC – Videom, Paris, France. 1985. 343p.

COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade Antimicrobiana de Produtos Naturais. **Conceitos**, p.78-85, 2004.

CRESPO, M. del P. La lectura interpretativa del antibiograma: Uma herramienta para predecir la resistència bacteriana em el laboratorio de microbiología de rutina. **Colombia Medica**, Cali, v.33, p.179-193, 2002.

DÉOUX, S.; DÉOUX, P. **Ecologia é a saúde - o impacto da deteriorização do ambiente na saúde**. Lisboa: Instituto Piaget, 1998.

DEVIA, C. N.; PAPPANO, N. B.; DEBATTISTA, N. B. Structure-biological activity relationship of synthetic trihydroxilated chalcones. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, n.4, p.307-310, 1998.

DIAS, C. M. S. **A linguagem química das plantas**. Disponível em: <http://www.geocities.com/esabio/interacao/principal.htm>> acesso em 05/04/2001.

DI STASI, L. C. Arte, ciência e magia In: DI STASI, L. C. (Org.) **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Unesp, 161-186, 1996.

DRUTZ, D. J. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.9, n.2, p.411-15, 1987.

DYKE, K. G.; RICHMOND, M. H. Occurrence of various types of penicillinase plasmid among 'hospital' staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.20, p.75-79, 1967.

ELLIS, D. H. **Clinical Mycology. The human opportunistic mycosis**. Australia: Pfizer, 1994.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALO, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípicas e genotípicas de estirpes de *Staphylococcus aureus*

isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Clinica Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1228-1234, jul-ago, 2006.

FERRONATTO, R.; MARKCHESAN, 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). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v.17, n.2, p,224-230, 2007.

FILE Jr.,T. M. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. In: **PLE CHEST** The Cardiopulmonary and Critical Care Journal (edição em português). **Suplemento 2**, n.1, p.3-9, 2000.

FORBES, B.A. & SHABERG, D.R. Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.153, p. 627 – 634, 1983.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo:Atheneu, 1996.182p.

FROMTLING, R.A.; PUI-YU, H.; SHADOMY, S. *In vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole derivatives: BAYn 7133 and BAYi 913. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.21, p.179-184, 1983.

FUCHS, F.D. **Princípios gerais do uso de antimicrobianos**. In: Fuchs FD & Wannmacher L. eds. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1096p. 2004.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira:necessidades e oportunidades. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n.1, p,171-185, 2005.

GILLESPIE, S. H.; MCHUGT, T. D. The biological cost of antimicrobil resistance. **Trends in Microbiology**, London, v.56, n.9, p.337-338.

GOERING, R.; RUFF, E. A. Comparative analysis of conjugative plasmids mediating gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.24, p. 450 – 452, 1983.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B.; Micoses Oportunistas e Outras Micoses. In: **Microbiologia**. 3ª ed, cap. 57, p.413-419. Ateneu, 1999.

GONTIJO, F. A.; BALDASSI, L.; BACH, E. E. Efeito do extrato de *Anacardium occidentale* sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo v.71, p.567-569, 2004.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quantitative Chemobiology: A Guide INTO THE Understanding of Plant Bioactivity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.13, n.6, p.772-776, 2002.

GUÉHO, E; IMPROVISI, L.; HOOG, G. S. de; DUPONT, B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, Belfast, v. 37, p. 3-10, 1994.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, Sussex, v.11, p.137-147, 2000.

HANSCH, C; FUJITA, T. RSQ-Analysis: a method for the correlation of biological activity and chemical structure. **Journal of the American Chemical Society**, Columbus, v.86, n.6, p.1616-1626, 1964.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; KALA, K. L. K.; SANDHOLM, T. M.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A.V. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Foods Chemistry**, Washington, v.46, n.9, p.3590-3595, 1998.

HOFER, E. Três décadas de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: **Ciência de Alimentos – avanços e perspectivas**. vol. II Cap. 33: 111-115. São Paulo: UNICAMP. 2001.

HOOPER, D. C; WOLFSON, J. S; McHUGH, G. L.; SWARTZ, M. D.; TUNG, C.; SWARTZ, M. N. Elimination of plasmid pMG110 from *Escherichia coli* by novobiocin and other inhibitors of DNA gyrase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, New York, v.25, p. 586-590, 1984.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v.15, p.428-433, 2003.

JANSSEN, A. A.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils – a 1976-1986 literature review – aspects of the test methods. **Planta Medica**, Stuttgart, v.5, p.395-398, 1987.

JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. AZT2563, a new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicin or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, North Liberty, v.43, n.1, p.87-90, 2002.

KALEMBA, A.; KUNICKA, A. Antimicrobial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Karachi, v.10, p.810-829, 2003.

KALODERA, Z.; PEPELJNJAK, S.; BLAZEVIC, N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil. **Pharmazie**, Berlin, v.11, p.885-886, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr. W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5a. ed. MEDSI, Rio de Janeiro, RJ, p-30 -31, 2001.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MITZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HADASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, London, v.357, p.1225-1240, 2001.

LACEY, R. W.; CHOPRA, I. Genetic studies of multiresistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.7. p.285-297, 1974.

LEDEBERG, J.; LEDEBERG, E. M. Replic plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, London, v.63, p. 399 – 406, 1952.

LEÓN, W. J. H; PERNIA, N. E. Estúdio anatômico del leno de ocho espécies del gênero *Aniba aublet* (Lauraceae). **Revista Forestal Venezolana**, Mérida, v.44, n.1, p.37-46, 2000.

LEITE, P. C.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; VASCONCELOS, S. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Efeitos de *N*-(2-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina II) de *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) nos modelos comportamentais de convulsão induzida por pentilenotetrazol e estricnina em camundongos. In: XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** Produtos Naturais 44.076, 2006.

LIMA, E. O.; GOMPertz, O. F.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. In vitro" antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, Belfast, v.36, n.9-19, p.:333-336, 1993.

LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiology Reviews**, Washington, DC v.51, p. 88-134, 1987.

MACEDO, M. de L.de A. P.; CARTAXO, R. S.; ALMEIDA, T. C. C.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Mecanismos de resistência e detecção de beta-lactamases. **UNOPAR Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.7, n.1, p. 59-63, 2005.

MACHADO, V. L. L.; PALMA, M. S.; COSTA, O. M. Ação repelente das frações de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis*) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* L. (Blatária: Blattidade). **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, Curitiba, v.24, n.1, 1995.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.5, p.538-544, 1998.

MARAGONI, D. V. ***Staphylococcus aureus***. In: **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. Rodrigues, E. A. C.; Mendonça, J. S.; Amarante, J. M. B.; Filho, M. B. A.; Grimbaum, R.S.; Richtmann, R. São Paulo, Sarvier. p.-573-591, 1997.

MARQUES, A. D. S.; ZHENG, S.; LIN, C.T.; TAKAHATA, Y. ; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C. Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III. **Journal of Molecular Structure**, New York, v.753, p.13-21, 2005.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.8, n.1, p.195-206, 2001.

MARTINS, E. R.; SANTOS, R. H. S. Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo. Informe técnico, Universidade Federal de Viçosa, v.73, p.1-26, 1995.

MARTINS, A. B. **Atividade antimicrobiana in vitro e cinética bactericida do extrato de *Rosmarinus officinales* Linn. (Alecrim) sobre amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina**. João Pessoa, Monografia, 2005, 62p.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes (MRSA). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.2, p.203-314, 2006.

MAY, J.; CHAN, C. H.; FRENCH, G. C. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.45, n.5, p.639-643, 2000.

McGINNIS, M. R. **Laboratory handbook of medical mycology**. New York: Academic Press, p.411-416, 1980.

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-Like Effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tiramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.29, n.3, p.451-454, 2006.

MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Plantas Medicinais: A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia**, São Paulo, v.5, p.211-215, 2000.

MIMS, C.; DOCKERLL, H. M.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; ZUCKERMAN, M. **Microbiologia Médica**. 3ª ed. Elsevier: São Paulo. 709p. 2005.

MOELLERING, R. C. Jr. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Practice. **Euromédice**. Ed. Médicas: 5-7, 2000.

MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, México, v.20, p.377-387, 2001.

MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.64, n.3, p.241-248, 1999.

MONTANARI, C. A.; BALZANI, V. da S.; Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais, **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MOREIRA, B. L. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v.48, n.2, p.118-120, 2004.

MORSCHHÄUSER, J. The genetics basic of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochem Biophys Acta**, Amsterdã, v.1587, p.240-248, 2002

NAINI, S. T.; LEDELL, H. K.; COMO-SABETTI, K.; BORCHARDT, S. M.; BOXRUD, D. J.; ETIENNE, J.; JOHNSON, S. K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R. N.; LYNFIELD, R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.290, p. 2976-2984, 2003.

NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelmintic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, São Paulo, v.62, n.3, p. 221-228, 1991.

NASSIS, C. Z.; GIESBRECHT, A. M.; SAITO, M. L.; OLIVEIRA, F. Atividade antibiótica de extratos de espécies de *Annonaceae*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.41, n.7, p. 527 1989.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed. Tentative standard. NCCLS Document M7-T2, V. B. n. B. Villa Nova PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

NOGUEIRA, M.S. **Ação de Produtos Naturais sobre Populações Bacterianas**. Belo Horizonte, 2000. 131p. Dissertação de Mestrado em Genética. Universidade Federal de Minas Gerais.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. Rio de Janeiro, 2000. 107p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ODDS, F. C. Antifungal activity of saperconazole (R. 66905) *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.24, p. 533-537, 1989.

PADILHA, I. Q. M. **Atividade antimicrobiana *in vitro* e cinética bactericida do extrato de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema-preta) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* multirresistentes**. João Pessoa, 2006. 74p. Monografia. Universidade Federal da Paraíba.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, Cambridge, v.46, n.4, p. 597-673, 1997.

PEREIRA, M. S. V. **Alguns aspectos genéticos da resistência a drogas em amostras bovinas de *Staphylococcus aureus* isoladas no estado da Paraíba**. João Pessoa, 1992. 87p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba

PEREIRA, M. S. V. **Atividade *in vitro* de fluorquinolonas e ação sobre plasmídios em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovinas**. Recife, 2000. 135p. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Pernambuco

PEREIRA, M. S. V.; BARRETO, V. P.; SIQUEIRA Jr., J. P. Phage-mediated transfer of tetracycline resistance in *Saphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Microbios**, Cambridge, v.92, p.147-155, 1997.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA Jr., J. P. Antimicrobial drugs resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brasil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.20, p. 391-395, 1995.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; OLIVEIRA, S. S.; PÓVOA, D. C.; NASCIMENTO, J. S.; BASTOS, M. C. F. Antimicrobial substance produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle in Brazil. **Letters In Applied Microbiology**, Oxford, v.27, p. 229-234, 1998.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA Jr., J.P.; TAKAKI, G. M. C. Eliminação de resistência a drogas por flourquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v.24, n.1, p.11-14, 2004.

PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; BATISTA, N. ; MORENO, A.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in a Spanish hospital. Co-apllication of multiplex PCR assay and conventional microbiology methods. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**. Oklahoma, v.43, p.123-128, 2002.

PETRONE, R. R. C. B.; BALDASSI, L.; BIDOIA, E. Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos extratos da *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc. **Arquivo do Instituto de Biologia**. São Paulo, v.71, p.576-578, 2004.

PEYRET, M.; CARRET, G.; CARRE, C.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J.P. Etude mathematique de la curve de mortalite d' *Escherichia coli* expose aux polymixines. **Pathologie Biologie**. Paris, v.38, p. 441-445, 1990.

PLEMPEL, M.; BERG, D.; BUCHEL, D.B.; ABBINK, D. Test methods for antifungal agents – a critical review. **Mykosen**. Berlin, v.30, n.1, p.28-34, 1986.

PONTES, D. S. et al. Perfil de resistência a antibióticos e ao mercúrio no trecho médio da bacia do Rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce). In: **Anais XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**. Gramado. Rio Grande do Sul. Comunicação Impressa, 211p. 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 703p. 2000.

ROCHA, E. M. F. **Mecanismo molecular envolvido na resistência aos derivados de acridina e ao antimicótico fluconazol em *Aspergillus nidulans***. Ribeirão Preto, 2002. 108p. Tese doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

RUHNKE, M.; EIGLER, A.; TENNAGEN, I.; GEISELER, B.; ENGELMANN, E.; TRAUTMANN, M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.9, p.2092-2098, 1994.

RUSSEL, A. D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.82, p.155-165, 1997.

SALLÉ, J. **O totum em fitoterapia - abordagem de fito-bioterapia**. São Paulo: Rose, 1996.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.3, p.293-297, 2001.

SAKAR, M. K.; TAMER, A. V.; TOKOUR, S. Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey. **Fitoterapia**, São Paulo, v.59, n.1, p.49-52, 1988.

SAKOULAS, G.; GOLD, H. S.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P. C.; ELIOPOULOS, G. H.; QIAN, Q.; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.39946-3951, 2001.

SANTOS, C.S.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochiliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v.17, n.2, p.215-219, 2007.

SANTOS FILHO, L. Antibiograma – Prova de Sensibilidade a Antimicrobianos In: **Manual de Microbiologia Clínica**. 3. ed. Universitária: p.101 - 115, 2003.

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

SEIXAS, S. R. S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiodepressora**. João Pessoa, 1996. 103p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROF, A.; GABHAR, R. J. *In vitro* studies with sf 86-327, a new orally active allylamionone derivatives. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, New York, v.23, p.125-132, 1985.

SHELBURNE, S. A.; MUSER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I.; HAMILL, J. R. Community- Associated Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* with drugs combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.48, n.10, p.4016-4019, 2004.

SILVA, J. G. **Atividade antimicrobiana do extrato do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem humana hospitalar e de origem animal.** João Pessoa, 2004a. 42p. Monografia. Universidade Federal da Paraíba.

SILVA, M. A. R. **Atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico da romã (*Punica granatum* Linn.) e ação sobre plasmídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* de origem bovina.** João Pessoa, 2004b. 52. Monografia. Universidade Federal da Paraíba.

SILVA, V. V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Vigilância de la resistencia de leveduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v.19, p. 56-65, 2002.

SILVEIRA, A. L.; MONTENEGRO, F. C.; ARAÚJO, D. A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Citotoxicidade induzida por três alcanidas, isoladas de *Aniba riparia*, em fibroblastos L929. In: XXI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2006, Águas de Lindóia. **Resumos...** Produtos Naturais 44.060, 2006a.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.844-855, 2006b.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. F.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Georgia, v.78, p. 27-33, 2004.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology Tecnology**, São Paulo, v.2, n. 2, p. 245-259, 2005.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista Patologia Tropical**, São Paulo, v.34, n.1, p.27-36, 2005.

STERMITZ, F. R.; LORENZ, P.; TAWARA, J.; ZENEWICZ, L. A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydranthracin, a multidrug pump inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.97, n.4, p.1433-1437, 2000.

SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à Genética**. São Paulo. ed. Guanabara Koogan: 856p. 1998.

TAKENOUCHI, T.; ISCHI, C.; SUGAWARA, M.; TOKUE, Y.; OHYA, S. Incidence of various *gyrA* mutants in 451 *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japan and their susceptibilities to 10 fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.39, p.1414-1418, 1995.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

TEGOS, G.; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKEYA, O. Multidrug pump inhibitor uncovers remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, p.3133-3141, 2002.

TELLES, M. A. S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.59, n.1/2, p.16-19, 2000.

TENOVER, F. C. A melhor época, a pior época: A evolução do problema da resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos. In: Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Practice. **Euromédice**. Ed. Médicas: p.8-13, 2000.

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Wallingford, v.46, n.2, p.103-107, 1994.

TILLOTSON, G. S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.44, p. 320-324, 1996.

TOMAZ, A. Multiple-antibiotic-resistance pathogenic bacteria: a report on Rockefeller – University Workshop. **New England Journal Medicine**, London, v.330, p.1247-1251, 1994.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, p.373-380, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul:235-237. 827p. 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. Atheneu: São Paulo. 718p. 2006.

THUILLE, N.; FILLE, M.; NAGL, M. Bactericidal activity of herbal extracts. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Zurich, v.206, n.3.,p,217-221, 2003.

VASCONCELOS, L. C. S.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; HIGINO, J. S. Use of *Punica granatum* Linn. as an antifungal agent against candidoses associated with denture stomatitis. **Mycoses**. Berlin, v.46, n.6, p.192-196, 2003.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/URFSC, p.66-70, 2000.

VICENTINI, A.; WERFF, H. V. D.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: **Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**, edited by Ribeiro, J. E. L. da S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. da S.; de Brito, J. M.; de Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. da C.; da Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. v.1, p.150-179. Manaus: INPA-DFID.1999.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Fitoterapia - Revista Racine**, São Paulo, v.43, p.50-51, 1998.

YAMADA, Y; SHIOTA, S.; MIZUSHIMA, T.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Functional gene cloning and characterization of mdeA, a multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.29, n.4, p.801-804. 2006.

WONG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, v.69, n.1,p.11-16, 1988.

WEISSER, J.; WIEDEMANN, B. Elimination of plasmids by new 4-quinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v.28, p. 700 – 702, 1985.

XU, H.; LEE, F. Song Activity of plant Flavonoids Against Antibiotic-Resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, London, v.5, p. 39-43, 2001.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, São Paulo, v.63, p.136-146, 2004.

ZAVADINACK-NETTO, M.; HERRERO, F.; BANDEIRA, C. O. P.; ITO, Y.; CIOLIN, E.; SAQUETI, E. E.; ANSILEIRO, I. J.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V. L. D. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, Maringá-PR, v.23, n.3, p.709-712, 2001.

ZUCARELLI, M. **Perfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin spectre d'activité, étude particulière de leur pouvoir bactericide seules et en association sur les streptocoques du group D, persistance et effet post-antibiotique**. Montpellier, 1988. 220p. Tese de Doutorado. Université de Montpellier - Faculté de Pharmacie, France.

APÊNDICES

Apêndice A - Estatística descritiva da cinética bacteriana de *S.aureus* ATCC 25923 frente às riparinas

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	Controle de crescimento					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,17E+06	2,00E+06	2,35E+06	2,17E+06	0,175E+06	8,05
2	6,00E+06	6,50E+06	5,50E+06	6,00E+06	0,500E+06	8,33
4	2,10E+07	2,20E+07	2,00E+07	2,10E+07	0,100E+06	4,76
6	4,00E+08	4,10E+08	3,50E+08	3,87E+08	0,321E+08	8,31
8	2,00E+10	1,90E+10	2,10E+10	2,00E+10	0,100E+10	5,00
10	1,00E+12	1,10E+12	1,00E+12	1,03E+12	0,577E+11	5,59
24	2,40E+10	2,30E+10	2,50E+10	2,40E+10	0,100E+10	4,17
48	2,80E+09	2,90E+09	2,70E+09	2,80E+09	0,100E+09	3,57
Mínimo	2,17E+06	2,00E+06	2,35E+06	2,17E+06	0,175E+06	3,57
Máximo	1,00E+12	1,10E+12	1,00E+12	1,03E+12	0,577E+11	8,33

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA I					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,17E+06	2,34E+06	2,00E+06	2,17E+06	0,170E+06	7,83
2	2,47E+06	2,64E+06	2,30E+06	2,47E+06	0,170E+06	6,88
4	2,57E+06	2,60E+06	2,54E+06	2,57E+06	0,300E+05	1,17
6	3,70E+07	3,90E+07	3,50E+07	3,70E+07	0,200E+07	5,41
8	4,60E+07	4,20E+07	5,00E+07	4,60E+07	0,400E+07	8,70
10	2,70E+08	2,59E+08	2,81E+08	2,70E+08	0,110E+08	4,07
24	3,10E+08	3,00E+08	3,20E+08	3,10E+08	0,100E+08	3,23
48	1,00E+08	1,02E+08	1,00E+08	1,01E+08	0,115E+07	1,15
Mínimo	2,17E+06	2,34E+06	2,00E+06	2,17E+06	0,300E+05	1,17
Máximo	3,10E+08	3,00E+08	3,20E+08	3,10E+08	0,110E+08	8,70

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA II					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,17E+06	2,14E+06	2,20E+06	2,17E+06	0,300E+05	1,38
2	6,20E+06	6,60E+06	5,80E+06	6,20E+06	0,400E+06	6,45
4	3,90E+06	4,00E+06	3,80E+06	3,90E+06	0,100E+06	2,56
6	2,30E+07	2,40E+07	2,20E+07	2,30E+07	0,100E+07	4,35
8	8,60E+07	8,90E+07	8,30E+07	8,60E+07	0,300E+07	3,49
10	4,10E+07	3,90E+07	4,30E+07	4,10E+07	0,200E+07	4,88
24	7,20E+08	6,90E+08	7,50E+08	7,20E+08	0,300E+08	4,17
48	1,00E+08	1,01E+08	1,02E+08	1,01E+08	0,100E+07	0,99
Mínimo	2,17E+06	2,14E+06	2,20E+06	2,17E+06	0,300E+05	0,99
Máximo	7,20E+08	6,90E+08	7,50E+08	7,20E+08	0,300E+08	6,45

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA III					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,17E+06	2,14E+06	2,20E+06	2,17E+06	0,300E+05	1,38
2	7,90E+05	8,10E+05	7,70E+05	7,90E+05	0,200E+05	2,53
4	8,24E+05	8,80E+05	7,68E+05	8,24E+05	0,560E+05	6,80
6	9,72E+04	9,98E+04	9,46E+04	9,72E+04	0,260E+04	2,67
8	3,22E+04	3,30E+04	3,14E+04	3,22E+04	0,800E+03	2,48
10	1,32E+03	1,34E+03	1,30E+03	1,32E+03	0,200E+02	1,52
24	2,50E+02	2,30E+02	2,70E+02	2,50E+02	0,200E+02	8,00
48	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	0,00
Mínimo	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00
Máximo	2,17E+06	2,14E+06	2,20E+06	2,17E+06	0,560E+05	8,00

* DP/M - Relação percentual entre o desvio padrão (DP) e a média aritmética (M) dos ensaios

Apêndice B - Estatística descritiva da cinética bacteriana da linhagem de *S.aureus* 319U frente às riparinas

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	CRESCIMENTO					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,20E+06	2,20E+06	2,40E+06	2,27E+06	0,115E+06	5,09
2	6,77E+07	6,50E+07	6,60E+07	6,62E+07	0,137E+07	2,06
4	3,50E+08	3,00E+08	3,40E+08	3,30E+08	0,265E+08	8,02
6	2,40E+09	2,60E+09	2,50E+09	2,50E+09	0,100E+09	4,00
8	3,40E+12	3,20E+12	3,30E+12	3,30E+12	0,100E+12	3,03
10	1,01E+11	1,02E+11	1,00E+11	1,01E+11	0,100E+10	0,99
24	1,00E+10	1,00E+10	1,03E+10	1,01E+10	0,173E+09	1,71
48	2,18E+09	2,38E+09	2,28E+09	2,28E+09	0,100E+09	4,39
Mínimo	2,20E+06	2,20E+06	2,40E+06	2,27E+06	0,115E+06	0,99
Máximo	3,40E+12	3,20E+12	3,30E+12	3,30E+12	0,100E+12	8,02

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA I					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,20E+06	2,30E+06	2,30E+06	2,27E+06	0,577E+05	2,55
2	5,10E+06	5,10E+06	5,20E+06	5,13E+06	0,577E+05	1,12
4	2,39E+06	2,37E+06	2,40E+06	2,39E+06	0,153E+06	0,64
6	4,00E+07	4,00E+07	3,56E+07	3,85E+07	0,254E+08	6,59
8	5,24E+07	5,48E+07	5,00E+07	5,24E+07	0,240E+08	4,58
10	4,73E+07	4,56E+07	4,90E+07	4,73E+07	0,170E+07	3,59
24	5,57E+06	6,00E+06	5,14E+06	5,57E+06	0,430E+07	7,72
48	4,67E+06	4,69E+06	4,65E+06	4,67E+06	0,200E+05	0,43
Mínimo	2,20E+06	2,30E+06	2,30E+06	2,27E+06	0,153E+05	0,43
Máximo	5,24E+07	5,48E+07	5,00E+07	5,24E+07	0,254E+07	6,59

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA II					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,20E+06	2,34E+06	2,27E+06	2,27E+06	0,700E+05	3,08
2	1,64E+07	1,60E+07	1,62E+07	1,62E+07	0,200E+06	1,23
4	1,20E+08	1,32E+08	1,26E+08	1,26E+08	0,600E+067	4,76
6	7,93E+07	7,90E+07	7,96E+07	7,93E+07	0,300E+06	0,38
8	2,20E+07	2,00E+07	1,88E+07	2,03E+07	0,162E+06	7,98
10	1,52E+07	1,50E+07	1,54E+07	1,52E+07	0,200E+06	1,32
24	1,80E+06	1,96E+06	1,88E+06	1,88E+06	0,800E+05	4,26
48	3,92E+06	4,00E+06	3,99E+06	3,97E+06	0,436E+05	1,10
Mínimo	1,80E+06	1,96E+06	1,88E+06	1,88E+06	0,436E+05	1,10
Máximo	1,20E+08	1,32E+08	1,26E+08	1,26E+08	0,600E+07	7,98

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA III					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	2,20E+06	2,33E+06	2,28E+06	2,27E+06	0,656E+05	2,89
2	2,80E+06	2,85E+06	2,90E+06	2,85E+06	0,500E+05	1,75
4	3,20E+06	3,27E+06	3,34E+06	3,27E+06	0,700E+05	2,14
6	7,58E+05	7,50E+05	7,54E+05	7,54E+05	0,400E+04	0,53
8	3,00E+05	3,02E+05	3,01E+05	3,01E+05	0,100E+04	0,33
10	2,94E+04	2,98E+04	2,90E+04	2,94E+04	0,400E+03	1,36
24	1,20E+03	1,24E+03	1,28E+03	1,24E+03	0,400E+02	3,23
48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000E+00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000E+00	0,00
Máximo	3,20E+06	3,27E+06	3,34E+06	3,27E+06	0,700E+05	3,23

* DP/M - Relação percentual entre o desvio padrão (DP) e a média aritmética (M) dos ensaios

Apêndice C - Estatística descritiva da cinética bacteriana da linhagem de *S.aureus* 122U frente às riparinas

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	CRESCIMENTO					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	3,60E+06	3,58E+06	3,62E+06	3,60E+06	0,200E+05	0,56
2	1,73E+07	1,75E+07	1,75E+07	1,74E+07	0,115E+06	0,66
4	2,60E+09	2,80E+09	2,40E+09	2,60E+09	0,200E+09	7,69
6	4,80E+09	4,70E+09	4,90E+09	4,80E+09	0,100E+09	2,08
8	3,10E+11	3,30E+11	3,20E+11	3,20E+11	0,100E+11	3,13
10	4,80E+10	4,60E+10	4,60E+10	4,67E+10	0,115E+00	2,47
24	1,00E+10	1,01E+10	1,00E+10	1,00E+10	0,577E+08	0,58
48	1,90E+09	1,86E+09	1,84E+09	1,87E+09	0,306E+08	1,64
Mínimo	3,60E+06	3,58E+06	3,62E+06	3,60E+06	0,200E+07	0,56
Máximo	3,10E+11	3,30E+11	3,20E+11	3,20E+11	0,100E+11	7,69

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA I					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	3,60E+06	3,58E+06	3,62E+06	3,60E+06	0,200E+05	0,56
2	5,40E+06	5,40E+06	5,20E+06	5,33E+06	0,115E+06	2,17
4	6,90E+06	6,80E+06	6,30E+06	6,67E+06	0,321E+06	4,82
6	6,17E+06	6,00E+06	6,34E+06	6,17E+06	0,170E+06	2,76
8	1,60E+07	1,80E+07	1,60E+07	1,67E+07	0,115E+07	6,93
10	4,30E+07	4,50E+07	4,80E+07	4,53E+07	0,252E+07	5,55
24	5,74E+07	5,80E+07	5,60E+07	5,71E+07	0,103E+07	1,80
48	3,20E+07	3,30E+07	3,60E+07	3,37E+07	0,208E+07	6,18
Mínimo	3,60E+06	3,58E+06	3,62E+06	3,60E+06	0,200E+05	0,56
Máximo	5,74E+07	5,80E+07	5,60E+07	5,71E+07	0,252E+07	6,93

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA II					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	3,60E+06	3,58E+06	3,62E+06	3,60E+06	0,200E+05	0,56
2	7,90E+06	7,60E+06	7,80E+06	7,77E+06	0,153E+06	1,97
4	8,56E+06	8,30E+06	8,60E+06	8,49E+06	0,163E+06	1,92
6	1,22E+07	1,30E+07	1,20E+07	1,24E+07	0,529E+06	4,27
8	3,80E+06	3,70E+06	3,90E+06	3,80E+06	0,100E+06	2,63
10	4,48E+07	4,50E+07	4,52E+07	4,50E+07	0,200E+06	0,44
24	8,60E+05	8,20E+05	8,40E+05	8,40E+05	0,200E+05	2,38
48	9,20E+06	9,40E+06	9,10E+06	9,23E+06	0,153E+06	1,65
Mínimo	8,60E+05	8,20E+05	8,40E+05	8,40E+05	0,200E+06	0,44
Máximo	4,48E+07	4,50E+07	4,52E+07	4,50E+07	0,529E+06	4,27

Tempo exposição ao produto (Horas/37°C)	RIPARINA III					
	Ensaios			Média (M)	Desvio Padrão (DP)	DP/M* %
	1	2	3			
0	3,60E+06	3,58E+06	3,62E+06	3,60E+06	0,200E+05	0,56
2	4,70E+06	4,50E+06	4,60E+06	4,60E+06	0,100E+06	2,17
4	2,40E+05	2,55E+05	2,45E+05	2,47E+05	0,764E+04	3,10
6	3,70E+04	3,90E+04	3,50E+04	3,70E+04	0,200E+04	5,41
8	2,18E+04	2,20E+04	2,40E+04	2,26E+04	0,122E+04	5,38
10	4,82E+03	4,81E+03	4,77E+03	4,80E+03	0,265E+02	0,55
24	3,96E+02	4,00E+02	3,96E+02	3,97E+02	0,231E+00	0,58
48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000E+00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000E+00	0,00
Máximo	4,70E+06	4,50E+06	4,60E+06	4,60E+06	0,100E+06	5,41

* DP/M - Relação percentual entre o desvio padrão (DP) e a média aritmética (M) dos ensaios

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)