

Márcia de Souza Nogueira

**Pesquisa da Atividade de Produtos de
Origem Vegetal, de Grande Uso Popular,
sobre o Crescimento Bacteriano e a
Transferência, por Conjugação, de
Plasmídios R.**

Orientador: Edmar Chartone de Souza
Co-orientadora: Andréa Maria Amaral Nascimento

Dissertação apresentada ao curso
de Mestrado do Departamento de
Biologia Geral do Instituto de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Genética

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas

2000

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

043 Nogueira, Márcia de Souza
N774p Pesquisa da atividade de produtos de origem
T vegetal, de grande uso popular, sobre o
crescimento bacteriano e a transferência, por
conjugação, de plasmídios R. / Márcia de
Souza Nogueira . _ Belo Horizonte : UFMG / ICB,
2000.

131 f. : il. graf. ; tab.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal
de Minas Gerais , Departamento de Biologia Geral.

1. Drogas - Resistência em microorganismos -
Teses . 2. Produtos naturais - Bacteriologia - Teses .
3. Recombinação (Genética) - Teses . I . Título.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação defendida e aprovada, em 07 de abril de 2000, pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Edmar Chartone de Souza

Prof^o Edmar Chartone de Souza

Mônica Bucciarelli Rodríguez

Prof^a Mônica Bucciarelli Rodríguez

Prof^o Jacques Robert Nicoli

JR

Dedico a conquista de mais esta etapa,

**À minha mãe Graça, ao meu pai Onézimo (*in
memorian*) e meu irmão Marcos pelo amor, incentivo e
apoio.**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é só o resultado do meu esforço, mas também daqueles que muito me ajudaram durante este percurso. Para todos, meu sincero reconhecimento.

A Deus, pois tenho certeza, sempre está comigo.

Ao Prof. Edmar Chartone de Souza, toda a minha gratidão, pela acolhida, confiança, simpatia, paciência e pela experiente orientação durante todo nosso convívio.

À Prof^ª. Andréa Maria Amaral Nascimento pela co-orientação e valiosa colaboração durante a realização desse trabalho, principalmente na elaboração de experimentos, discussão dos resultados e redação final da dissertação.

Aos professores do Setor de Genética pelo inestimável apoio e amizade, disponibilidade e ensinamentos. E a Marina Cândida, secretária do Curso de Pós-graduação em Genética, por sempre ter sido atenciosa e prestativa para com todos.

Aos amigos e colegas de laboratório, Luciana Cursino, pela inestimável cooperação em todos os momentos, Melissa Ang, pelo grande apoio, Cristina Souza, Fábio P. Knegt e Renata pelo estímulo constante, e à todos pela "forcinha" nos momentos difíceis e pela grande amizade e carinho neste caminho, meu profundo reconhecimento.

À Andréa Reis e Paixão, pelo apoio técnico na realização dos experimentos.

À FAPEMIG-FIEMG pela concessão da bolsa de mestrado e auxílios concedidos.

À Farmácia Homeopática ATMA LTDA, representada pela farmacêutica Adelina Fagundes Morato, pela colaboração e apoio fornecidos, através do preparo e fornecimento de produtos, em especial no estabelecimento do convênio FAPEMIG e FIEMG.

Aos amigos da minha turma de mestrado (a primeira!) em Genética, Isabel, Dulce e Daniela pela grande amizade e presença constante em todos os momentos, Alessandra e Anderson, pela troca de experiências, e a Micheline e Fábio, pelo companheirismo durante todo o curso a mim dedicado.

À prof^a. Maria das Dores Ferreira pelas sugestões e disponibilidade.

Aos amigos do departamento de bacteriologia (IOC-FIOCRUZ), José C. A. R. Dias e Luzia Filgueiras, pelo incentivo à minha entrada neste curso. E a Sheila Duque, pela amizade e auxílio, sempre que necessário.

À Valéria L. Freitas, Lucinha e ao Paulo M. Novaes pela cessão de algumas das fotos utilizadas na dissertação. À Luciana Lara pelo auxílio na digitação das referências bibliográficas.

E finalmente, à minha querida mãe, Graça, por sempre apoiar (de todas as formas possíveis) minhas decisões, e respeitá-las, e ao meu irmão, Marcos, pelo grande incentivo moral e financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Considerações gerais</i>	15
1.2 <i>A origem da resistência bacteriana a drogas</i>	18
1.3 <i>Os mecanismos geradores de resistência</i>	20
<i>Mutação</i>	22
<i>Conjugação</i>	24
1.4 <i>O Problema do aumento da resistência antimicrobiana</i>	35
1.5 <i>As plantas e a resistência bacteriana a drogas</i>	37
1.6 <i>Objetivos</i>	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 <i>Linhagens bacterianas</i>	48
2.2 <i>Plantas e produtos derivados</i>	51
2.3 <i>Manutenção e preparação das culturas bacterianas</i>	55
2.4 <i>Métodos de preparação dos extratos vegetais</i>	55
2.5 <i>Presença de inibição e estabelecimento da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	56
2.6 <i>Determinação do crescimento bacteriano em concentrações sub-inibitórias de alguns produtos</i>	57
2.7 <i>Influência do pH sobre a atividade antibacteriana dos produtos</i>	58

2.8	Obtenção de "sobreviventes" bacterianos resistentes em placa gradiente (Bryson & Szybalski, 1952, modificado).....	59
2.9	Pesquisa de reversão fenotípica do perfil de susceptibilidade aos antibióticos.....	61
2.10	Ação de produtos naturais na conjugação.....	61
2.11	Detecção de produção de bacteriocinas (Ozeki et al., 1962).....	63
2.12	Extração plasmidiana (Técnica de Birnboim & Dolly, 1979; com modificações) e eletroforese em gel de agarose.....	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1	Concentração inibitória mínima(CIM).....	67
3.2	Estudo do crescimento em concentrações sub-inibitórias de alguns produtos.....	82
3.3	Atividade dos produtos frente à mudança de pH.....	83
3.4	Detecção de "sobreviventes" bacterianos pela técnica da "placa gradiente".....	83
3.5	Pesquisa da reversão fenotípica da susceptibilidade bacteriana a antibióticos após o crescimento em meio com <u>Allium sativum</u> e <u>Punica granatum</u>	87
3.6	Influência de alguns produtos sobre a freqüência de transferência de plasmídios R, por conjugação.....	95
4	CONCLUSÕES.....	110
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
6	ANEXO.....	125
6.1	Outros materiais.....	125
6.2	Figuras dos produtos testados.....	129

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 A - Mapa genético dos plasmídios F de <i>E. coli</i>	29
FIGURA 1 B - Mapa genético dos plasmídios R-100 de <i>E. coli</i>	29
FIGURA 2 - Representação esquemática dos dois estágios do processamento do DNA durante a transferência de plasmídios IncP e Inc1	33
FIGURA 3 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	43
FIGURA 4 - Preparação da placa gradiente	60
FIGURA 5 - Placa gradiente de própolis da linhagem de <i>E. coli</i> K12 Nx	86
FIGURA 6 - Perfil plasmidiano de <i>P. aeruginosa</i> 1 cultivada em TSB, na presença e na ausência de <i>P. granatum</i> e própolis	107
FIGURA 7 - Foto de alho	129
FIGURA 8 - Foto de café	129
FIGURA 9 - Foto de candeia	130
FIGURA 10 - Foto de <i>Ginkgo biloba</i>	130
FIGURA 11 - Desenho de mate	130
FIGURA 12 - Foto de romã	131
FIGURA 13 - Foto de sumá roxo	131
FIGURA 14 - Foto de própolis	131

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** - CIM dos diversos produtos testados frente à *P. aeruginosa* 27853 e *P. aeruginosa* 1.....78
- GRÁFICO 2** - CIM dos diversos produtos testados frente à *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* 50.....79
- GRÁFICO 3** - CIM dos produtos testados frente *S. sonnei* ATCC 11060 e *S. flexneri* 4.....80
- GRÁFICO 4** - CIM da linhagem de *S. typhimurium* e seus transconjugantes, curadas ou não81
- GRÁFICO 5** - Frequências de transconjugantes do cruzamento entre *S. typhimurium* ED 040 e *E. coli* K12 em meio TSB, em ausência ou presença de 5% de própolis98
- GRÁFICO 6** - Frequências de transconjugantes do cruzamento entre *S. typhimurium* ED 040 e *E. coli* K12 em meio TSB, em ausência ou presença de produtos naturais101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Valores do Phs das preparações dos diversos produtos.....	68
TABELA 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos testados em caldo TSB (%v/V) frente a diversas bactérias.....	70
TABELA 3 - CIM das linhagens determinadas em meio Müller-Hinton	88
TABELA 4 - Bactérias crescidas em caldo Müller-Hinton com extrato de <i>A. sativum</i> 2% v/v por 24 horas a 37°C, semeadas em meio agar müller-hinton contendo determinadas concentrações de antibiótico para as quais eram originalmente sensíveis (s) ou resistentes (r).....	89
TABELA 5 - Bactérias crescidas em caldo Müller-Hinton com antibiótico e extrato de <i>A. sativum</i> (2%v/v) semeado em ágar Müller-Hinton não suplementado com antibióticos.....	90
TABELA 6 - Bactérias crescidas em caldo Müller-Hinton com antibiótico e extrato de <i>P. granatum</i> (5%v/v) semeado em ágar Müller-Hinton não suplementado com antibióticos.....	91
TABELA 7 - Bactérias crescidas em caldo Müller-Hinton com antibiótico e extrato de <i>P. granatum</i> (5%v/v) semeado em ágar Müller-Hinton não suplementado com antibióticos.....	92
TABELA 8 - Concentrações sub inibitória dos produtos, em TSB*, usadas nos cruzamentos entre <i>S. typhimurium</i> ED 040 e <i>E. coli</i> K12 Nx, e entre <i>E. coli</i> BH100 e <i>E. coli</i> K12 Sm.....	96
TABELA 9 - Conjugação de <i>S. typhimurium</i> ED040 e <i>E. coli</i> k12 Nx em presença de 5% de própolis.....	97
TABELA 10 - Conjugação de <i>E. coli</i> BH100 e <i>E. coli</i> K12 Sm em presença de 5% de própolis.. ..	99
TABELA 11 - Conjugação de <i>S. typhimurium</i> ED040 e <i>E. coli</i> K12 Nx em presença de 20% de <i>A. salutaris</i>	102
TABELA 12 - Conjugação de <i>E. coli</i> BH100 e <i>E. coli</i> K12 Sm em presença de 20% de <i>A. salutaris</i>	102

- TABELA 13** - Conjugação de S. typhimurium ED040 e e E. coli K12 Nx em presença de 70% de G. biloba.....103
- TABELA 14** - Conjugação de S. typhimurium ED040 e E. coli K12 Nx em presença de 10% de Y. paraguayensis.....104
- TABELA 15** - Conjugação de S. typhimurium ED040 e E. coli K12 Nx em presença de 2,5% de P. granatum.....105
- TABELA 16** - Conjugação de S. typhimurium ED040 e E. coli K12 Nx em presença de 20% de V. erythropappa.....106

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - <i>Patógenos que apresentam aumento da frequência de isolamento de linhagens resistentes</i>	16
QUADRO 2 - <i>Funções dos gens da região tra do plasmídio F</i>	30
QUADRO 3 - <i>Partes das plantas utilizadas e épocas de colheita, conforme recomendações de EMATER-DF (1988)</i>	46
QUADRO 4 - <i>Exemplos de solventes, em ordem crescente de polaridade e respectivos grupos de metabólitos majoritariamente extraídos</i>	46
QUADRO 5 - <i>Linhagens bacterianas usadas nos experimentos.</i>	49
QUADRO 6 - <i>Linhagens bacterianas manipuladas transconjugantes (T) e curadas (C)</i>	50
QUADRO 7 - <i>Linhagens bacterianas com plasmídios de peso molecular conhecidos</i>	50
QUADRO 8 - <i>Plantas ou produtos, sua preparação e indicações terapêuticas populares ou homeopáticas</i>	53
QUADRO 9 - <i>Combinação da utilização dos produtos sobre bactérias doadoras e receptoras e sobre a cultura mista</i>	63
QUADRO 10 - <i>Obtenção de "sobreviventes" bacterianos resistentes em placa gradiente frente a diversos produtos</i>	85

RESUMO

O surgimento de resistência aos antimicrobianos, e sua disseminação dentre populações bacteriana, vem criando dificuldades para o tratamento das infecções pois, a cada dia, dispõe-se de um número menor de drogas que possam ser eficazmente utilizadas. Por outro lado, observa-se o aumento de linhagens multirresistentes, ou em decorrência de mutações ou de aquisição de novos genes por meio de transferência intra ou inter-específica e a enorme pressão seletiva devido ao uso abusivo dessas drogas. Como a obtenção de novos medicamentos requer elevados custos e um longo tempo de pesquisa, é relevante o estudo de produtos alternativos, de uso comum e de baixa toxicidade para o homem, quanto aos seus efeitos sobre populações bacterianas, seja inibidor do crescimento ou do fluxo gênico. Assim, este trabalho investigou os efeitos de alguns produtos de origem vegetal, de grande uso popular sobre populações bacterianas, seja alterando a sua viabilidade ou interferindo na transferência de genes, via conjugação, bem como o isolamento de possíveis mutantes resistentes a esses produtos e reversão do fenótipo de resistência/sensibilidade. Foram utilizadas linhagens selvagens e padrão, com modelos de resistência conhecidos, dentre as quais: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sp.*, e *Yersinia enterocolitica*. Os produtos ensaiados foram: *Allium sativum* (alho), *Coffea arabica* (café-com e sem cafeína), *Anchietea salutaris* (sumá roxo), *Vanillomoropsis erythropappa* (candeia), *Punica granatum* (romã), *Ylex paraguayensis* (mate) e própolis, dentre outros. Após verificação de esterilidade e de pH, seguiu-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em TSB. Observou-se que o *A. sativum* possui grande capacidade bactericida, em caldo Müeller-Hinton, frente à todas as bactérias testadas. Os valores obtidos para CIM em caldo variaram de 1 a 40% (v/v), sendo que, ao contrário de *A. sativum* *G. biloba* não apresentou efeito inibidor nas concentrações testadas. Os experimentos de reversão fenotípica da resistência de algumas linhagens frente a certas drogas, mostraram que *A. sativum* e *P. granatum* reverteram o perfil de susceptibilidade, citando-se como exemplo o *S. aureus* 37. Os testes de conjugação utilizando-se os produtos acima citados apresentaram resultados que revelam um surpreendente poder inibitório da transferência genética: o extrato alcoólico de própolis, dentre outros, inibiu totalmente a transferência gênica. Obtiveram-se variantes resistentes à *P. granatum*, *C. arabica*, *A. salutaris* e própolis. Os resultados obtidos, além da originalidade e relevância, abrem perspectivas para aplicações biotecnológicas futuras.

SUMMARY

The appearance of antimicrobial resistance and its dissemination among bacterial populations has been creating difficulties for the treatment of infectious diseases since the number of available drugs that can be used efficiently has been decreasing. On the other hand an increase in the number of multiresistant strains has been observed. This could be either because of mutation or acquisition of new genes by intra or interspecific gene transfer and also because of the great selective pressure due to the abusive use of these drugs. Development of new drugs is costly and involves a long research period. Thus the study of alternative products of popular use and low toxicity for humans in relation to their effect on bacterial populations either as growth or gene flow inhibitors is relevant. In this work the effects of a few products of plant origin and of great popular use on bacterial populations were studied. These products can act by alteration of bacterial viability, interference on gene transfer, via conjugation. Isolation of possible mutants resistant to these products were also attempted as well as reversion of the resistance/sensitivity phenotype. Wild-type and reference strains were used which have well-known resistance models: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sp.*, and *Yersinia enterocolytica*. The products assayed were *Allium sativum* (garlic), *Coffea arabica* (coffee – decaffeinated and regular), *Anchietea salutaris* (sumá roxo), *Vanillomorpsis erythropappa* (candeia), *Punica granatum* (granatin), *Ylex paraguayensis* (mate tea) and propolis, among others. After verification of sterility and pH of the material the minimum inhibitory concentration was determined (MIC) in TSB medium. It was observed that *A. sativum* exhibits a great bactericidal capacity to all tested bacteria in Müller-Hinton broth. The MIC values varied from 1 to 40% (w/w) in broth and, unlike *A. sativum*, *G. biloba* did not show any inhibiting effect in the concentrations tested. *A. sativum* and *P. granatum* reversed the susceptibility profile of some strains, such as *S. aureus* 37. Conjugation tests showed a surprising inhibitory power over gene transfer: propolis alcoholic extract, among others, totally inhibited gene transfer. Variants were obtained which were resistant to *P. granatum*, *C. arabica*, *A. salutaris* and propolis. The results obtained here, besides being original and relevant also open perspectives for future biotechnological applications.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais

Um dos maiores problemas de Saúde Pública enfrentados nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (Fidler, 1998; Huovinen & Cars, 1998; Okeke *et al.*, 1999). Atualmente, registra-se um aumento significativo na frequência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de rotina usadas na clínica, mas que se apresentam agora resistentes a todos ou quase todos fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com várias bactérias multirresistentes (Quadro 1) (Huycke *et al.*, 1998; Rattan *et al.*, 1998; Piddock *et al.*, 1998). Muitas linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* - MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), por exemplo, reconhecido patógeno associado à infecção hospitalar ou adquirida na comunidade, já eram sensíveis apenas ao tratamento com vancomicina, mostrando-se resistentes aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas e outros quimioterápicos (Salysers & Amábile-Cuevas, 1997, Chartone-Souza, 1998). Recentemente, entretanto, se isolaram tanto em laboratório (Di Sálvio, 1998) como na clínica (Domin, 1998) linhagens mutantes com sensibilidade reduzida à vancomicina. Obteve-se, inclusive, a transferência em laboratório de plasmídeo

QUADRO 1

Patógenos que apresentam aumento da frequência de isolamento de linhagens resistentes.

Patógeno	Drogas	País (Ano)
<i>Campylobacter</i> *	Fluoroquinolonas	Tailândia (1981-1995)
<i>E. coli</i> enterotoxigênica *	Cotrimetoxazol	Tailândia (1981-1995)
<i>Enterococcus faecium</i> ****	Vancomicina	França (1986) EUA (1989)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	isoniazida, estreptomicina, rifampicina	Quênia (1981-1990) Marrocos (1992-1994)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ***	Sulfonamidas, penicilinas, tetraciclina	Mundial (década de 90)
<i>Neisseria meningitidis</i> **	Penicilina	Europa (desde 1995)
<i>Salmonella</i> (não tifóide) *	Cotrimetoxazol	Tailândia (1981-1995)
<i>Salmonella typhi</i> *	ampicilina, cloranfenicol, cotrimetoxazol	Bangladesh (1989-1993)
<i>Shigella flexneri</i> , <i>S. dysenteriae</i> *	Ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas, ácido nalidíxico	Bangladesh (1983-1990) Brasil (1988-1993) Ruanda (1988-1993) Tailândia (1981-1995)
<i>Staphylococcus aureus</i> *****	Penicilina, ampicilina, meticilina (MRSA) vancomicina (VISA)	EUA (1960; 1980); Japão (1996) EUA (1997)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> **	penicilina, cefotaxime, ceftriaxome, macrolídeos	Austrália e Nova Guiné (década de 60) África do Sul (1977) Europa e EUA (desde 1991)
<i>Vibrio cholerae</i> *	Cotrimetoxazol, ampicilina, ácido nalidíxico	Guiné-Bissau (1987-1995) Índia (1993-1995)
<i>Yersinia pestis</i> ***	ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, espectinomicina, canamicina, tetraciclina, sulfonamidas	Madagascar (1997)

* Okeke *et al.*, 1999

** Goossens & Sprenger, 1998

*** Hart & Kariuki, 1998

**** Wegener *et al.*, 1999

***** Rubin *et al.*, 1999

R de enterococos, com determinante de resistência à vancomicina, para *S. aureus*, no qual felizmente o plasmídeo não se estabilizou. Esses dados antecipam os gravíssimos problemas que poderão trazer essas linhagens multirresistentes, caso não surjam novos antimicrobianos ou terapias alternativas para combatê-los (Labischinski *et al.*, 1998).

Atualmente, o problema da resistência se tornou mais grave devido às dificuldades para se descobrirem e se lançarem novos antimicrobianos no mercado com o uso da metodologia tradicional de triagens, a partir de fungos e bactérias, o que vem tornando esses produtos cada vez mais escassos e mais caros. Estima-se que são necessários mais de 10 anos, a um custo superior a 200 milhões de dólares, para que um antimicrobiano esteja à disposição da medicina. Uma das alternativas usadas pelas indústrias farmacêuticas tem sido a modificação química da estrutura do antimicrobianos já existentes na tentativa de torná-las mais eficientes ou de recuperar a atividade prejudicada pelos mecanismos bacterianos de resistência. A mudança de paradigma pode ser uma das saídas futuras para o impasse, ao se pesquisar em primeiro lugar o alvo e só depois preparar o princípio ativo (a bala) contra ele, por técnicas de biologia molecular. Entretanto, as alternativas ecológicas, que enfatizam o respeito pelo meio ambiente, devem ser mais efetivas e de menor custo, uma vez que se baseiam no uso mais cuidadoso, e apenas quando necessário, levando à queda de pressão dos antimicrobianos de alguns ambientes. Por outro lado, torna-se relevante a pesquisa da ação inibitória do crescimento bacteriano ou do fluxo gênico de genes de resistência ou mesmo de reversão da resistência por produtos naturais. Deve-se enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vem sendo vastamente usadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro. A maior parte da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase que exclusivamente de medicamentos de origem natural (Stangarlin *et al.*, 1999). Para isso, antes da determinação das frações ativas por métodos bioquímicos sofisticados, agora disponíveis, torna-se necessário e útil o uso preliminar de métodos de triagem

de domínio popular ou das farmácias homeopáticas como macerados, chás, extratos aquosos, alcoólicos e outros. Deve-se lembrar que os princípios ativos podem estar presentes em diferentes frações de um composto ou mesmo que um princípio ativo seja liberado só após a ação metabólica do animal.

A relevância de tais problemas, o de resistência a drogas e a exploração de recursos fitoterápicos (Moreira *et al.*, 1997; Stangarlin *et al.*, 1999), é demonstrada pelos incentivos dados por agências internacionais, tal qual a Organização Mundial da Saúde, e nacionais, como o Ministério da Saúde, e pelo Ministério da Educação, cujo tema do último "Prêmio Jovem Cientista", foi o controle da resistência bacteriana, e o "Prêmio FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ GRUPO EMS-SIGMA PHARMA DE C&T EM SAÚDE", que neste ano de 2000 premia pesquisadores na categoria júnior que atuem na área de produtos naturais.

1.2- A origem da resistência bacteriana a drogas

A resistência a drogas surgiu junto, ou até mesmo antes, do uso de antimicrobianos na prática médica, como pode ser atestado, por exemplo, pela enzima bacteriana β -lactamase que catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico da penicilina, eliminando sua atividade antimicrobiana, descoberta em 1940 por Abraham & Chain.

O desenvolvimento de drogas antimicrobianas foi um dos maiores feitos da ciência nos últimos 60 anos, mas, conforme foi dito, sempre esteve acompanhado do isolamento crescente de linhagens resistentes (Okeke *et al.*, 1999), o que não é de se surpreender, haja visto que o processo evolutivo de qualquer organismo depende da presença de variabilidade genética e de adaptação ao ambiente e as bactérias não são exceção a esta regra. O primeiro relato de resistência a uma droga antimicrobiana data de 1907, e foi

feito por Paul Ehrlich, que registrou o aparecimento de tripanossomatídeos resistentes ao quimioterápico "rosanilina" tão logo este foi desenvolvido. O mesmo se deu com a resistência bacteriana que acompanhou a utilização pelas medicinas humana e veterinária da sulfonamida e penicilina a partir da década de 40 (Franklin & Snow, 1981; Johnston, 1998) e todas as outras drogas comercializadas até agora.

O relato das primeiras linhagens resistentes logo trouxe discussão quanto à sua origem, tendo sido aventadas duas teorias: a primeira que os microrganismos teriam se adaptado ao meio, sem qualquer variação no seu genótipo, e ficou conhecida como "adaptação fenotípica"; a segunda levantava a hipótese de que dentro de uma grande população sensível haveria algumas células com genótipo para resistência e a droga agiria selecionando estes mutantes. Com o passar do tempo evidências de que esta última hipótese era a correta foram se acumulando. Recentemente, entretanto, a "adaptação fenotípica" tem sido usada como argumento, embora polêmico, para explicar a origem de alguns mutantes metabólicos ou resistentes (Franklin & Snow, 1981; Radicella *et al.*, 1995; Cairns, 1988). Por outro lado, a descoberta dos mecanismos de transferência genética bactérias e seus elementos responsáveis (plasmídios, transposons, integrons, genes cassetes e fagos), mostrou que eles, com ênfase na conjugação, são os principais responsáveis pelo surgimento e disseminação de resistência (Mazodier & Davies, 1991; Hall, 1997).

Analisando-se o problema da resistência surgem várias questões, tais como: qual a sua origem, como se dissemina e como controlá-la. Quanto às duas primeiras já se detém razoável conhecimento, mas é em relação à última que se encontram as maiores dificuldades (Miller, 1998), por depender de uma ação educativa e política das classes médica, veterinária, farmacêutica, do próprio governo e colaboração da comunidade em geral contra o uso abusivo dos antimicrobianos.

1.3 - Os mecanismos geradores de resistência

A resistência bacteriana pode ser intrínseca, quando resulta de uma característica natural e inata do organismo, como por exemplo barreira de permeabilidade (envoltório) dos esporos, mixobactérias e bactérias Gram negativas ou falta de alvos adequados para os antimicrobianos e anti-sépticos (biocidas). Por outro lado pode ser adquirida, quando surge a partir dos mecanismos de mutação, que se caracteriza por ser uma alteração herdável em uma seqüência de bases no DNA, que pode ser traduzida em alterações fenotípicas, e o de recombinação genética, que é a troca de material genético entre dois indivíduos, que se dá por três processos parassexuais: conjugação - passagem de informação genética através de contato físico entre células, transformação - captura de DNA do meio extracelular e transdução - aquisição de material genético bacteriano por meio de infecção viral (Jones, 1999). Em decorrência da descoberta e estudo de tais mecanismos se deu um extraordinário avanço na ciência, culminando com o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitem o estudo e o seqüenciamento de genomas e a subsequente manipulação de genes, aplicáveis tanto em eucariotos quanto em procariotos (Madigan, 1997; Chartone-Souza, 1998).

A identificação inicial da transformação deve-se aos estudos de Frederick Griffith, em 1928, ao observar que linhagens avirulentas de pneumococos adquiriam virulência quando injetadas junto com linhagens virulentas da mesma espécie mortas, em ratos (Yin & Stotzky, 1997). Entretanto, cabe ressaltar que Cantacuzene & Bonciú, em 1926, embora não citados em revisões, já tinham descoberto a transformação, também em estreptococos, com a transferência de genes envolvidos com a virulência da escalartina (Chartone-Souza, 1987). Sabe-se hoje, que elas adquiriram DNA do meio, proveniente das células mortas e que o incorporaram ao seu cromossomo. Para que realmente ocorra uma transformação natural é necessário que o DNA do meio não seja degradado e que a célula receptora esteja competente, ou seja, que haja proteínas de superfície especializadas na

membrana, responsáveis pela ligação ao DNA e sua internalização (Miller, 1998). Apesar de muito estudado pouco se sabe a respeito dos detalhes moleculares envolvidos no desenvolvimento da competência. São poucas as espécies capazes de se tornarem competentes naturalmente, tais como *Streptococcus*, *Bacillus* e *Haemophilus* sp (Lorenz & Wackernagel, 1994; Yin & Stotzky, 1997). Outras são facilmente tornadas transformáveis em laboratório, como *Escherichia coli*, através de artifícios tais como o uso de sais, como o cloreto de cálcio, eletroporação, ou da obtenção de protoplastos. Após a entrada do DNA na célula dá-se a integração ao cromossomo, graças a mecanismos de recombinação codificados pela célula hospedeira, e sua subsequente expressão. A transformação é também utilizada para introdução de vetores (plasmídios, fagos) para a clonagem gênica (Miller, 1998).

A transdução é um mecanismo de transferência que começa com a infecção de uma bactéria fago-sensível por bacteriófagos, que injetam DNA viral na célula, levando ou a integração do genoma viral no cromossomo bacteriano (ciclo lisogênico), ou a uma intensa replicação do mesmo (ciclo lítico), ao fim do qual ocorre o empacotamento deste material genético na forma de novos vírus, que irão infectar novas células (Yin & Stotzky, 1997; Waldor, 1998). Entretanto, muitas vezes ocorre o empacotamento de partes da molécula de DNA do hospedeiro, possibilitando, a transferência de grandes regiões de DNA cromossômico ou até de plasmídios inteiros para outras bactérias. O poder de disseminação da informação é diretamente proporcional à diversidade de hospedeiros do vírus, podendo alguns deles infectar várias espécies dentro de um gênero, e alguns podem até mesmo parasitar gêneros diferentes. Entretanto, é o mecanismo mais limitado de todos em relação à disseminação dos genes entre grupos diferentes de bactérias, devido à tendência de serem os bacteriófagos hospedeiro-específicos, e nenhum bacteriófago de amplo espectro de hospedeiros tenha sido identificado (Yin & Stotzky, 1997; Miller, 1998).

A conjugação, por ser o mecanismo mais eficiente na transferência de genes de resistência, será descrita num item especial, após a descrição da mutação.

1.3.1 - Mutação

A mutação, causa primária de variabilidade genética, pode ser **espontânea**, resultante de causas endógenas, tais como erro de replicação, ação de radicais livres, hidrólise, com uma frequência, em média, de cerca de uma mutação por 10^5 a 10^7 células por divisão celular, ou **induzida**, sendo neste caso provocada por meio de agentes mutagênicos, cuja frequência é bem maior e varia com o mutagênico utilizado (Venitt & Parry, 1984). Ambas levam a uma alteração de genes estruturais ou de seqüências regulatórias, podendo ter um efeito deletério e causar morte celular, ou alterar a função do produto gênico, como por exemplo: reduzir a afinidade de uma proteína alvo por uma droga, o que se traduziria em resistência à mesma, como ocorre com as PBPs (Penicillin Biding Proteins) e as penicilinas e outros β -lactâmicos; as RNA polimerases e as rifampicinas; as proteínas ribossômicas e aminoglicosídeos, tetraciclinas e cloranfenicol; DNA girase e topoisomerase IV e quinolonas; DNA e metromidazol. A alteração de proteínas envolvidas com a permeabilidade da membrana, como as porinas e outras, pode também levar à resistência bacteriana para algumas drogas (Hawkey, 1998).

Os agentes mutagênicos podem ser de natureza diversas: **física** (radiações ionizantes e não-ionizantes), que levam à quebra do DNA (raios-X) ou à formação de radicais livres e subseqüente alterações nos nucleotídeos; **química** (agentes alquilantes e desaminantes, análogos de bases, proflavina, acridina laranja, etc.), agentes que se ligam covalentemente (ou não) ao DNA, de preferência às bases nitrogenadas podendo, por exemplo, levar à alteração no pareamento correto das bases, formar ligações inter e intra-fita, se intercalar entre as bases, e outros; **biológica** (seqüências de inserção, transposons, fagos) que exerce seus efeitos de variadas formas, tais como interrompendo, ligando ou desligando genes, conforme o sítio de transposição (Madigan, 1997; Chartone-Souza, 1998; Werner *et al.*, 1995).

Para que uma mutação se estabeleça em uma linhagem celular é necessário que os mecanismos de reparo do DNA não consigam restaurar a seqüência correta, o que raramente ocorre, devido à baixa taxa de erros da replicação, de 10^{-7} a 10^{-11} por ciclo celular, e que a lesão não leve a célula à morte celular, graças à editoração efetuada pela própria DNA polimerase (Venitt & Parry, 1984).

Ocasionalmente, a resistência a drogas de origem cromossômica, ocorre em um só passo, indo da sensibilidade até níveis elevados de resistência de uma só vez (modelo da estreptomicina), mas geralmente ela ocorre em múltiplos passos (modelo da penicilina), cada evento mutacional dando origem a um pequeno aumento no limiar de resistência, só ocorrendo o aparecimento de células altamente resistentes após várias exposições prolongadas à droga (Yan & Demerec, 1965; Franklin & Snow, 1981). Um exemplo bem recente dos efeitos da mutação em relação à resistência a drogas é o surgimento de linhagens do bacilo de Kock (*Mycobacterium tuberculosis*) multirresistentes, que são caracterizadas pela resistência às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose (rifampicina, estreptomicina, isoniazida, etambutol), e que é resultado do acúmulo de mutações nos alvos das drogas. Nos países em desenvolvimento, a freqüência de resistência a pelo menos uma destas drogas pode chegar até a 48% dos afetados, sendo que apenas 0.2% dos bacilos isolados em todo mundo são resistentes a todas as quatro drogas simultaneamente (Hart & Kariuki, 1998; Rattan *et al.*, 1998). Outro exemplo é o decréscimo na susceptibilidade frente a fluoroquinolonas em *Salmonella*, resultante de mutações na região do DNA determinante da enzima alvo - topoisomerase tipo II (Piddock *et al.*, 1998). Este fato é preocupante se for considerado a disseminação na Ásia, de uma linhagem multirresistente, surgida em 1987, portadora de um grande plasmídeo conjugativo que codifica resistência ao cloranfenicol, ampicilina e co-trimoxazol, drogas de primeira linha utilizadas no controle de salmoneloses, que em certas regiões atinge até 69% dos isolados clínicos de amostras de sangue (Hart & Kariuki, 1998).

É importante salientar que, mutações de genes cromossômicos favoráveis podem ser transferidas para plasmídios através de transposons ou seqüências de inserção, e então disseminadas em uma população de bactérias via conjugação e outros processos de transferência gênica (Hawkey, 1998).

1.3.2 - Conjugação

Todos os mecanismos de transferência de resistência em bactérias ocorrem muito freqüentemente na Natureza e em diversos ambientes: terrestre, aquáticos - lagos, rios, oceanos, esgotos, etc., *in vivo* - homem, aves, insetos, plantas, etc. (Lafuente *et al.*, 1996; Miller, 1998). Essa transferência pode ocorrer de forma promíscua, não só entre bactérias estreitamente relacionadas, mas também entre aquelas distantes filogeneticamente, sendo possível a passagem de informação até entre reinos: de bactérias para arquea e eucariotos, e de eucariotos (plantas) para bactérias, levando à hipótese de que estas ocorrências de transferência horizontal de genes devem ser de grande importância na evolução das bactérias e de outros organismos (Scott *et al.*, 1997; Miller, 1998). O processo de conjugação é considerado como o de maior importância em nível epidemiológico, não só no que se refere à transferência de genes de resistência a drogas, mas também de genes que conferem maior virulência às bactérias (por exemplo aderência, invasão e citotoxicidade). São transferidos também genes que codificam processos bioquímicos importantes, como aqueles envolvidos com o metabolismo normal da bactéria, produção de bacteriocinas, inativação de metais pesados e poluentes, dentre outros (Meccas & Strauss, 1998; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999).

Em 1946, partindo de experimentos com *Escherichia coli* K12 auxotróficas, Joshua Lederberg e Edward Tatum descobriram o processo de conjugação (Yin & Stotzky, 1997). Entretanto, as primeiras evidências da passagem de determinantes de resistência múltipla vieram, na década de 50, de estudos com *Shigella* por pesquisadores japoneses (Ochiai *et al.*, 1959, apud Watanabe, 1963), a qual tinha como perfil de resistência: Su^r, Sm^r, Km^r, Tc^r. Logo após, foram isoladas nos mesmos pacientes linhagens de *E. coli* com

o mesmo perfil de marcadores, sugerindo que estes podiam passar de uma bactéria para outra (Franklin & Snow, 1981).

A conjugação é um mecanismo geneticamente muito complexo e ainda pouco entendido em termos moleculares, e ao que parece diferentes gêneros utilizam diferentes mecanismos moleculares, sendo mais estudado nas bactérias Gram negativas, mas também ocorre em bactérias Gram positivas como, por exemplo, estreptococos, estafilococos, bacilos, estreptomices e halobactérias (Lanka & Wilkins, 1995, Cabezón *et al.*, 1997).

O mecanismo de conjugação é unidirecional e envolve a passagem de cópias de fitas simples de plasmídios, que são constituídos de DNA extra-cromossômico dupla fita, de replicação independente. Os plasmídios conjugativos contêm genes *tra* que codificam proteínas responsáveis pela conjugação e a formação de *pilus* sexual, em Gram negativos, promovendo o contato físico entre célula doadora (F^+) e a célula receptora não portadora de plasmídio conjugativo (F^-), proporcionando a transferência de informação genética. Este tipo de plasmídio pode ainda atuar na transferência de genes cromossômicos ou outros plasmídios presentes na célula que não sejam portadores dos genes *tra*, que são denominados mobilizáveis. Os epissomos, plasmídios de replicação autônoma ou capazes de se integrar ao cromossomo, quando excisados podem mobilizar também genes cromossômicos - F' (Yin & Stotzky, 1997). Entretanto, plasmídios não portadores do operon *tra* podem ser mobilizados pelos plasmídios conjugativos, e assim também serem transferidos, sendo necessário para isso que tenham os genes *mob*, responsáveis pelo processamento do DNA, como por exemplo os plasmídios RSF1010, ColE1, ColE3 e CloDF13 (Cabezón *et al.*, 1997). A mobilização pode ser em trans, quando os plasmídios se mantêm separados, ou em cis, quando formam um cointegrado. A integração do plasmídio no cromossomo leva à formação de linhagens Hfr. Nestas o plasmídio conjugativo é capaz de mobilizar parte do cromossomo, ocasionando um aumento na freqüência de recombinação de genes cromossômicos (Yin & Stotzky, 1997). Transposons conjugativos também podem mobilizar parte do cromossomo, como por

exemplo Tn4399, em *Bacteroides fragilis*, e Tn925 em *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (Lanka & Wilkins, 1995, Cabezón *et al.*, 1997). A integração de plasmídios, transposons, seqüências de inserção e integrons se dá através de recombinação com o cromossomo, seja recombinação homóloga, sitio específica, transposicional ou ilegítima. A excisão do plasmídio F pode originar um plasmídio F' (ou R', ColV'), que carrega seqüências de DNA cromossômico (Reimann & Hass, 1993).

Aqueles portadores de genes de resistência a drogas são denominados plasmídios R, podendo ainda conter genes para a degradação de compostos tóxicos ou para transformação de metais pesados em formas menos nocivas, além de outros genes associados com patogenicidade e metabolismo celular (Franklin & Snow, 1981).

O modelo proposto para conjugação em bactérias Gram-positivas não envolve formação de *pilus* sexual. Neste grupo, existem duas categorias de plasmídios conjugativos. Na primeira as células receptoras secretam substâncias (feromônios) que induzem as células doadoras a produzir proteínas (fatores de agregação) que aproximam as células, que ao se associarem formam poros nas membranas, por onde ocorre a transferência de DNA, como ocorre nos enterococos. Estes plasmídios freqüentemente são portadores de genes codificadores de hemolisinas, bacteriocinas ou resistência a antibióticos (Yin & Stotzky, 1997). O segundo sistema de conjugação em Gram-positivos foi observado em estreptococos e estafilococos. Nele não foi identificado resposta a feromônios. Necessita, porém, que tanto a doadora quanto a receptora sejam cultivadas em meio sólido, e geralmente os plasmídios codificam resistência a antimicrobianos (Yin & Stotzky, 1997). Mas em ambos os grupos, a passagem de plasmídios se dá de forma intra ou inter-específica, sendo que na maioria da vezes é restrita aos membros do seu próprio grupo, sendo possível esta transferência em muitos casos apenas dentro de mesma espécie. Entretanto, há plasmídios promíscuos, que podem ser passados de uma bactéria Gram-negativa para uma Gram-positiva, e até mesmo de bactérias para leveduras ou para células vegetais (Wilkins, 1995;

Miller, 1998). Pesquisas indicam que, dentre os mecanismos de transferência gênica, a conjugação parece ser o meio mais eficaz de transferência de genes (Mazodier & Davies, 1991), tornando este mecanismo um dos mais relevantes na criação de plasticidade gênica, e de grande impacto na clínica e no ambiente, além de deter um importante significado evolutivo (Lanka & Wilkins, 1995).

Lederberg e Tatum (1946) foram muito afortunados ao escolher como linhagem doadora a *Escherichia coli* K12, que abriga o fator ou plasmídio F (F de fertilidade), de 100kb, cujo sistema de conjugação se encontra desreprimido, isto é, expressa o sistema de conjugação constitutivamente, um fato raro entre plasmídios conjugativos, levando a uma altíssima frequência de transferência, e como receptora, uma linhagem que tinha espontaneamente perdido o plasmídio F (Willetts, 1993; Anthony *et al.*, 1999). O modelo proposto de conjugação para o plasmídio F começa pela aproximação das células doadora e receptora, através de um *pilus* pela doadora, que reconhece um receptor específico na superfície da célula receptora, o qual ao se retrair coloca as paredes celulares das duas células em contato (Yin & Stotzky, 1997).

Além do plasmídio F (Figura 1A), outros grupos foram descobertos, como os plasmídios colicinogênicos (Col) e os plasmídios R (Figura 1B), que codificam resistência a vários antibióticos (Willetts, 1993), além de plasmídios responsáveis pela degradação de compostos químicos, produção de toxinas e hemolisina (Ippen-Ihler & Skurray, 1993).

Como mencionado anteriormente, todo mecanismo de conjugação é codificado pelo operon *tra* contido nos plasmídios conjugativos, como por exemplo o plasmídio F, R100, P307 e RP4, que consiste de um segmento de DNA com aproximadamente 35kb (Ghetu *et al.*, 1999), onde se localizam cerca de 40 genes, sendo a maioria responsável pelo sistema de acasalamento, isto é, pela formação do *pilus* conjugativo ("sexual") e pelas proteínas que estabilizam a união das duas células (Lanka & Wilkins, 1995). Além disso, contém genes reguladores e determinantes do sistema de exclusão de superfície, como mostrado na Quadro 2 (Ippen-Ihler & Skurray, 1993).

Os plasmídios são classificados de acordo com grupos de incompatibilidade (Inc). Este grupos determinam quais os plasmídios que podem residir em uma mesma célula, cuja classificação é baseada na incompatibilidade dos sistemas reguladores que controlam a replicação plasmidiana. Plasmídios de um mesmo grupo de incompatibilidade geralmente possuem sistemas replicação e de conjugação semelhantes, o que impede a coexistência dos mesmos em uma mesma célula (Lanka & Wilkins, 1995, Willetts, 1993).

Duas proteínas estão relacionadas com o impedimento de redundância de transferência de um determinado plasmídio, TraT, uma proteína de membrana externa que impede a estabilização do agregado (exclusão de superfície), e TraS, uma proteína de membrana interna que bloqueia o sinal para transferência de DNA entre células doadoras - exclusão de entrada (Anthony *et al.*, 1999)

O modelo mais conhecido de conjugação é baseado em enterobactérias, refletindo a descoberta da conjugação como um processo codificado pelo plasmídio F da *E. coli* K12, que começa com o contato do *pilus* sexual com um receptor na célula receptora, seguido da retração do *pilus*, o que faz com que as células se aproximem e entrem em maior contato. A partir de um sinal liberado pelas interações celulares, ainda desconhecido, ocorre uma quebra em uma das fitas do plasmídio, em um sítio conhecido como *nic* na origem de transferência (*ori T*), localizada no fim do "cluster" de genes e independente de *ori V* (origem de replicação vegetativa). Esta é uma quebra altamente específica realizada por um complexo protéico denominado relaxossoma (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999). A ponta da fita livre é desenrolada por uma helicase (produto de *tral*) e então transferida para a célula receptora no sentido 5' para 3' na forma de ssDNA (fita simples), onde é recircularizada. Portanto a replicação ocorre em ambas as células (Figura 2). A reconstituição da dupla fita, tanto na doadora quanto na receptora, é feita por uma DNA polimerase tipo III (Lanka & Wilkins, 1995).

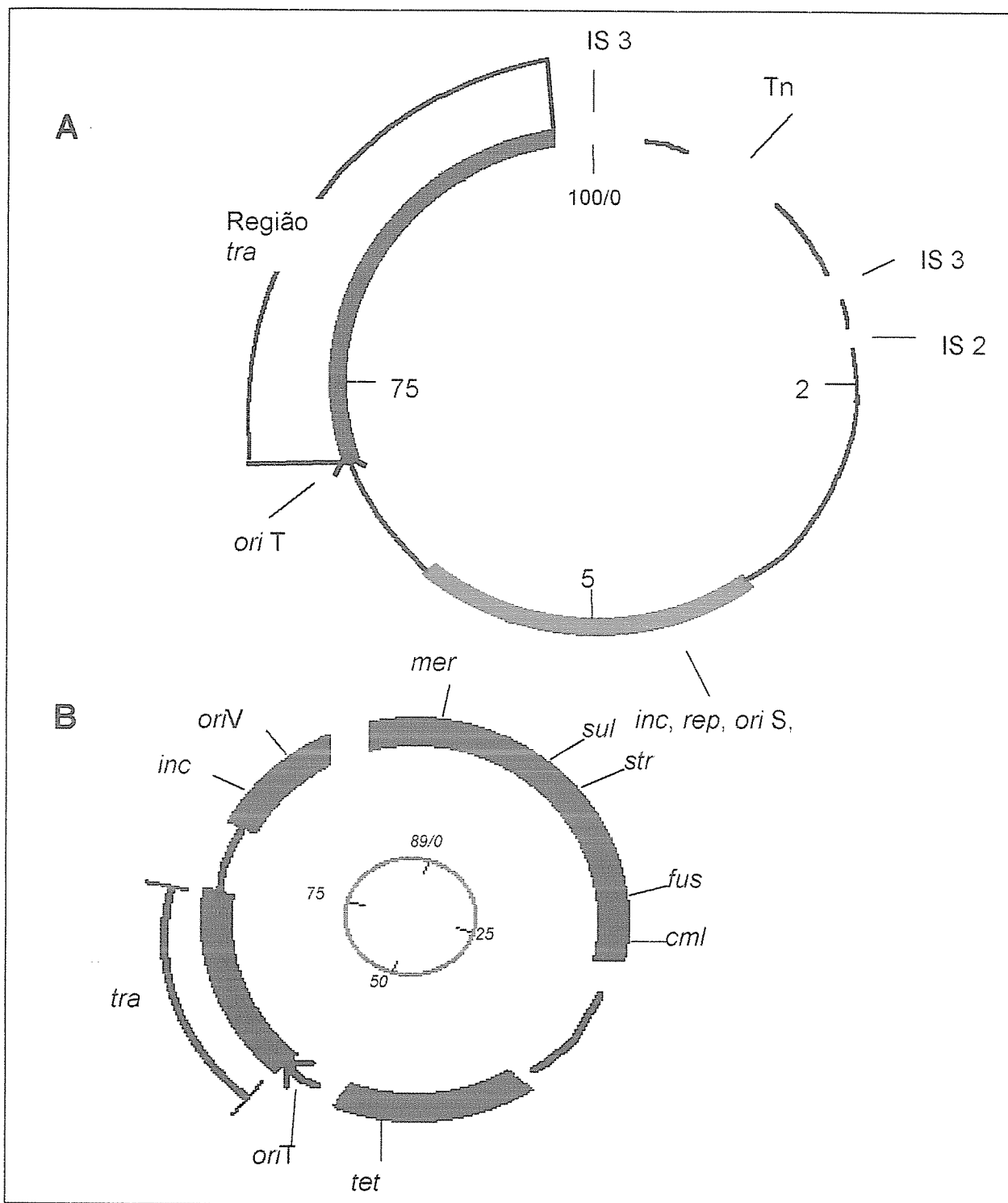


FIGURA 1 - (A) Mapa genético do plasmídeo F: de *E. coli*. Números correspondem ao seu tamanho em kb. Gene: *tra* - de transferência; *oriT* - origem de transferência; *oriS* - origem de replicação; *inc* - grupo de incompatibilidade; *rep* - funções de replicação, regiões em amarelo - elementos transponíveis. (B) Mapa genético do plasmídeo R-100. Círculo rosa - tamanho em kb. Principais genes: *inc* - incompatibilidade, *oriV* - origem de replicação, *oriT* - origem de transferência, *mer* - resistência ao mercúrio, *sul* - resistência a sulfonamida, *tet* - resistência a tetraciclina, *tra* - funções de transferência. Sequências de inserção em amarelo.
FONTE - Madigan *et al.*, 1997

QUADRO 2

Funções dos genes da região *tra* do plasmídeo F

Função	Gene
Regulação	<i>traJ</i> , <i>finP</i> e <i>finO</i>
Síntese do <i>pilus</i>	<i>traA</i> (pilina), <i>traQ</i> , <i>traX</i>
Proteínas de formação de <i>pilus</i>	<i>traL</i> , <i>traE</i> , <i>traK</i> , <i>traB</i> , <i>traV</i> , <i>traC</i> , <i>traW</i> , <i>traU</i> , <i>trbC</i> , <i>traF</i> , <i>traH</i> , <i>traG</i>
Estabilização do agregado	<i>traN</i> , <i>traG</i>
Metabolismo do DNA conjugativo	<i>traM</i> , <i>traY</i> , <i>traD</i> , <i>traI</i>
Exclusão de superfície e de entrada	<i>traS</i> , <i>traT</i>
Desconhecida	<i>traP</i> , <i>trbD</i> , <i>trbG</i> , <i>traR</i> , <i>trbI</i> , <i>trbE</i> , <i>trbA</i> , <i>trbB</i> , <i>trbJ</i> , <i>trbF</i> , <i>trbH</i> , <i>artA</i>

Fonte: Ippen-Ihler & Skurray, 1993

A quebra em *ori T* parece ocorrer a todo momento, no final de cada ciclo de replicação-transferência havendo quebra e religação continuamente pelo relaxoxomo. O sinal responsável pelo início da transferência, ainda desconhecido, interromperia a reconstituição da molécula de DNA (Wilkins & Lanka, 1993).

Todo o processo de conjugação é controlado pelo sistema FinO-P, ou sistema inibidor de fertilidade, onde a regulação da transferência se dá em nível transcricional. Estudos no plasmídeo R-100 sugerem o seguinte modelo: O produto do gene *finO* se liga aos promotores de *traJ*, reprimindo sua expressão. Entretanto, raras moléculas de TraY são expressas; essas se ligam ao DNA alterando sua conformação e deslocando FinO, ativando a transcrição

de *traJ*, um regulador positivo do operon *tra* do sistema F. A região líder não traduzida de *traJ*, ao ser transcrita forma uma estrutura com 3 alças que complementa a fita antisense do RNA de *finP*, formando um complexo de dupla fita FinP-TraJ, impedindo a ligação ao ribossomo e a tradução de TraJ. Consequentemente, há queda do número de moléculas de RNA de *finP* livres, e alguns RNAs de *traJ* acabam por ser traduzidos, que se ligam ao operador *Py*, ativando o gene *traY* e a expressão do restante do operon *tra*. A proteína TraY, associada à TraM, TraI (Helicase I) e IHF em *ori T* iniciam a transferência do plasmídio. A alta frequência de transferência apresentada pelo plasmídio F é decorrência de uma inserção de um IS3 no gene *finO*, levando à quebra do controle da conjugação (Dempsey, 1993; Ghetu *et al.*, 1999).

A primeira porção de fita de ssDNA transferida carrega genes responsáveis pela instalação do plasmídio na receptora, tais como *flm* (da família *hok*, com função de manutenção), *psiB* (inibição do sistema SOS), *ssb* (proteínas que se ligam a ssDNA), *ard* (escape do sistema de restrição) que começariam a ser expressos tão logo entrassem na receptora, talvez ainda na forma de ssDNA. (Wilkins & Lanka, 1993). Os últimos genes a entrarem na célula receptora seriam os do operon *tra*, talvez porque sua expressão iniba a transferência (Dempsey, 1993).

Dois grupos de proteínas dos plasmídios conjugativos estão relacionadas a passos específicos da conjugação: proteínas PIL (ou Mfp) e as proteínas MOB (ou Dtr). As proteínas PIL ou Mfp estão relacionadas à síntese e formação do *pilus* sexual e formação do complexo de transferência de DNA entre doadora e receptora. O *pilus* é formado por pilina, uma proteína de 70 aminoácidos, codificada pelo gene *traA*, inicialmente expresso na forma de propilina. A propilina é inserida na membrana pela chaperone TraQ, onde é clivada por uma peptidase cromossômica e acetilada na sua porção N terminal por TraX. Moléculas de pilina são estocadas na membrana interna e são polimerizadas para formar um *pilus* quando em conjunto com TraL, TraE, TraK, TraB, TraV, TraC, TraW, TraU e TraH, além de TrbC e da porção amino-

terminal de TraG. As proteínas necessária para retração do *pilus* ainda não foram encontradas (Anthony *et al.*, 1999).

As proteínas MOB ou Dtr mobilizam o DNA na conjugação, isto é, o DNA a ser transferido é quebrado em *ori T*, onde há formação do relaxossoma, e o DNA fita simples é transferido. Este grupo de proteínas é constituído de uma helicase e proteínas acessórias, que formam o relaxossoma, e de acoplamento, conhecidas genericamente como família TraG (Anthony *et al.*, 1999).

Apesar das diferenças envolvidas entre os mecanismos de conjugação de bactérias Gram positivas e Gram negativas, estudos comparativos de seqüências de aminoácidos e nucleotídeos revelam evidências de que sejam relacionados. Como, por exemplo, a homologia existente entre o sistema de conjugação dos plasmídios IncP e sistema Vir do plasmídio Ti, um grande plasmídio (200~kb) do fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*, que induz tumores em plantas através de introdução de um porção determinada do plasmídio Ti, chamada T-DNA (20-30 kb), no genoma da planta. Todo o processo é mediado pelo genes plasmidiano de virulência (genes *vir*) de cerca de 30 kb. No plasmídio Ti também se encontram genes que codificam um sistema de conjugação denominado Tra, que é responsável pela transferência do pTi entre agrobactérias (Lanka & Wilkins, 1995, Bravo-Angel *et al.*, 1999). Comparações de seqüências entre diversos plasmídios mostram similaridades significantes entre os componentes do sistema de transferência, o que sugere a existência de um mecanismo bem conservado de transporte de DNA entre células (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999).

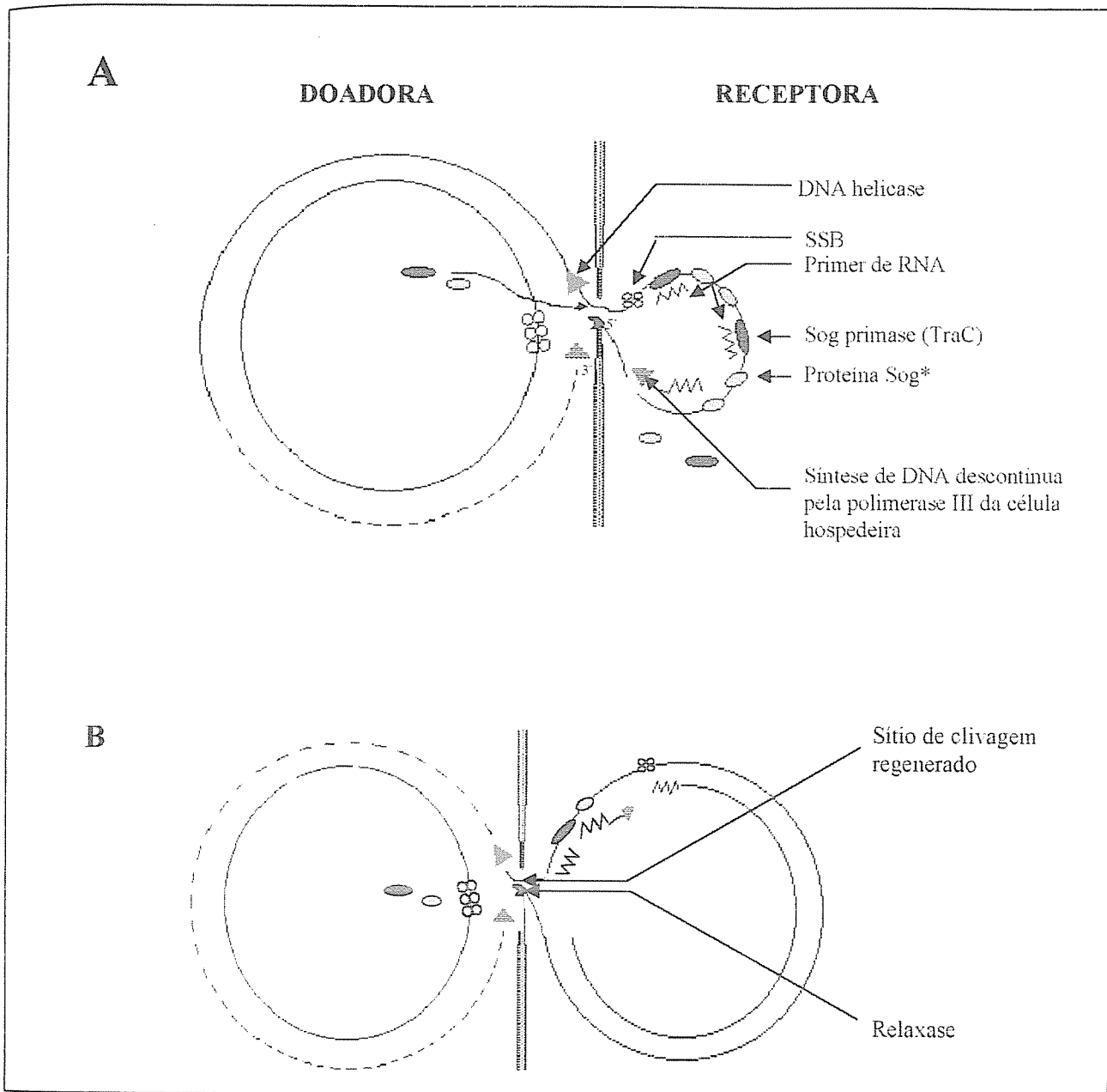


FIGURA 2 – Representação esquemática dos dois estágios do processamento do DNA durante a transferência de plasmídios IncP e IncI1.

(A) A extremidade 5' permanece associada a uma relaxase (Tral) que fica ancorada à luz do poro. A fita simples de DNA (ssDNA) a ser transferida forma uma alça para dentro da célula receptora, associada a proteínas SSB, Sog e uma primase (TraC). A replicação é realizada pela DNA polimerase III. (B) Quando a ori T do plasmídio na célula doadora é reconstituído no final do processo, ocorre uma segunda quebra por Tral.

Fonte - Wilkins & Lanka, 1993.

Porém, muitas vezes, genes (de resistência, degradativos, de virulência, etc.) estão localizados em transposons, que são segmentos de DNA capazes de se transpor independentemente (codificando sua própria transposase) dentro do genoma. Podem apresentar uma interessante e perigosa combinação: além da transposição de genes para outros replicons ou outros sítios do próprio replicon onde se localizam, podem realizar o mecanismo de conjugação, isto é, alguns são transposons conjugativos, e até mesmo mobilizar plasmídios presentes na célula doadora (Yin & Stotzky, 1997). Como por exemplo cita-se a aquisição de multirresistência pelos enterococos, que desde 1979 vem se apresentando sucessivamente resistentes à gentamicina, penicilina e finalmente à vancomicina (Huycke *et al.*, 1998), e Tn1545, um transposon conjugativo que codifica resistência à tetraciclina, macrolídeos, lincosamida, estreptogramina, cloranfenicol e canamicina, encontrado em linhagens multirresistentes de *Streptococcus pneumoniae* na década de 70 (Luna & Roberts, 1998). Possivelmente, a transposição seja o principal mecanismo pelo qual os plasmídios e cromossomos adquirem genes de resistência (Scott *et al.*, 1997).

Existem ainda os integrons, também segmentos de DNA dupla fita, que codificam uma recombinase e possuem um sítio de recombinação, e próximo dele um promotor, que podem integrar ou excisar genes cassetes (elementos móveis portadores de um gene, de resistência a antimicrobianos, na maioria das vezes, e de um sítio de recombinação) por meio de recombinação sítio-específica. Os integrons preferencialmente localizam-se sobre transposons e plasmídios, podendo ser úteis como sistemas de clonagem e vetores de expressão naturais por serem portadores de um promotor forte para a expressão de um ou mais genes cassetes. (Hall & Collins, 1995; Labrador & Corces, 1997; Chartone-Souza, 1998). Os super-integrons podem conter mais de 60 genes cassetes, incluindo a codificação de resistência, virulência e outras propriedades (Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

Recentemente foi identificada uma região no cromossomo de *E. coli* que codifica resistência a múltiplos antibióticos, tais como tetraciclina, cloranfenicol,

penicilina, cefalosporinas, ácido nalidixíco, fluoroquinolonas, entre outros, além de resistência a agentes causadores de estresse oxidativo e solventes orgânicos, localizada no *locus mar* (multiple antibiotic resistance). Esta resistência apresenta como característica marcante ser indutível com resposta amplificável, isto é, o crescimento contínuo na mesma ou em maiores concentrações de droga leva a um aumento no limiar de resistência (Alekhshun & Levy, 1997).

O conhecimento atual dos mecanismos que dão origem à resistência e de certa promiscuidade na transferência gênica lança dúvidas acerca da segurança do uso de microrganismos geneticamente modificados no meio ambiente, isto é, poderiam os genes inseridos nestes organismos se disseminar nas populações autóctones, trazendo maiores problemas no futuro? Para responder a essa pergunta é necessária a investigação dos processos moleculares envolvidos nesses mecanismos de transferência, assim aumentar as pesquisas em nível do meio ambiente e suas variáveis (Yin & Stotzky, 1997; Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999).

1.3- O Problema do aumento da resistência antimicrobiana

Cada vez mais registra-se o isolamento de linhagens resistentes de microrganismos especialmente perigosos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter* sp., e multirresistente de *Yersinia pestis* e *Bacteroides fragilis* (Quadro 1), ressaltando-se a necessidade de alternativas para o controle rigoroso do surgimento e disseminação de resistência nestes microrganismos (Hart & Kariuki, 1998, Goossens & Sprenger, 1998; Okeke *et al.*, 1999).

Tanto a mutação quanto a recombinação são processos importantes do ponto de vista evolutivo, pois fornecem substrato para que a "Seleção Natural" possa atuar, isto é, aumentam a variabilidade genética, favorecendo a seleção

dos mais aptos em detrimento dos menos adaptados ao ambiente (Jones, 1999). Entretanto, e infelizmente, o homem tomou para si o papel de Natureza, influenciando na sobrevivência de populações bacterianas ao utilizar drogas indiscriminadamente para o seu controle, selecionando, assim, as bactérias resistentes (Petrosino *et al.*, 1998; Hart & Kariuki, 1998). Esta intervenção não se dá só no uso descontrolado de antimicrobianos pelos hospitais e comunidades no tratamento de doenças humanas (Okeke *et al.*, 1999), mas também pela utilização exagerada destas substâncias na agropecuária, onde são usadas não só com finalidade profilática, mas também objetivando a maior rapidez de crescimento com o ganho de peso dos animais (Wegener *et al.*, 1999). O mesmo vem acontecendo na agricultura, onde é usado na profilaxia de contaminação de culturas de tecidos vegetais na micropropagação e no cultivo de espécies frutíferas (Chartone-Souza, 1998; Falkiner, 1998; Johnston, 1998; Jones, 1999). O aumento da poluição do meio ambiente também é um fator decisivo na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos, pois estes estão freqüentemente associados a outros genes, como por exemplo os que conferem resistência ao mercúrio, em ambientes onde o metal é amplamente utilizado (garimpos, consultórios odontológicos e hospitais). Há a seleção de bactérias portadoras de plasmídeo R, transposons e integrons, não só para resistência ao mercúrio mas também a uma ampla gama de drogas, aumentando assim, a prevalência de organismos multirresistentes (Magalhães *et al.*, 1997; Tubino & Magalhães, 1998). Descreveu-se neste laboratório (Sant'Anna *et al.*, 1995) uma linhagem de *Salmonella typhimurium* portadora de um plasmídeo conjugativo, de cerca de 90kb, que codifica simultaneamente resistência a tetraciclina, produção de colicina e patogenicidade para camundongos. Todos esses elementos promovem um grande fluxo de genes de resistência, fato muito preocupante do ponto de vista da genética de populações bacterianas, onde se vê uma crescente disseminação de genes (Kruse & SØrum, 1994; Hart & Kariuki, 1998). Especula-se, por exemplo, que a disseminação de genes de virulência levou ao surgimento de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), por aquisição de um prófago codificador de uma toxina

Shiga-like, ou a aquisição de uma ilha de patogenicidade pelo *Vibrio cholerae* O139 (Mecsas & Strauss, 1996).

1.5 - As plantas e a resistência bacteriana a drogas

Torna-se clara a necessidade de se pesquisar o comportamento de substâncias, de uso comum e de baixa toxicidade, quanto à ação mutagênica ou sobre a susceptibilidade bacteriana a drogas, e sua possível ação sobre a transferência de informação genética por conjugação e outros processos de transferência, favorecendo ou impedindo o fluxo gênico, com ênfase nos plasmídios R. Estas informações se fazem relevantes não só no tocante à valorização e maior segurança da utilização popular destes produtos (Habermehl, 1998) mas também em relação ao seu uso clínico em conjunto com fármacos. Deve-se ressaltar que em outros países, como Alemanha e Estados Unidos, estes vem sendo alvo de estudos sistemáticos de suas possíveis propriedades, registrando-se grande consumo deste tipo de produtos (Stix, 1998). No Brasil, importantes centros de pesquisa estão direcionando projetos para essa área (Gullo & Pereira, 1998). Esses estudos podem ser também de fundamental importância quanto à liberação de microrganismos geneticamente manipulados no meio ambiente, isto é, de como tentar impedir que estes genes criados através de engenharia genética se disseminem entre a população natural ou que ocorra a aquisição indesejável de genes provenientes pelas bactérias autóctones (Lafuente *et al.*, 1996; Miller, 1998; Trevors, 1998).

Muitas destas substâncias já foram investigadas, a partir de experimentos preliminares, quanto ao seu efeito bactericida e em alguns casos até quanto ao seu caráter mutagênico (Itoyama *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 1997; Tomita *et al.*, 1997; Akande & Hayashi, 1998), e reversão de resistência (Yan *et al.*, 1998) mas pouco foi pesquisado até agora a respeito de seu

comportamento frente aos mecanismos de transferência gênica. Dados favoráveis poderiam trazer grandes benefícios à comunidade em geral e à clínica, em especial, pois assim se saberia se determinado produto ao ser administrado ou consumido pelo paciente estaria promovendo ou impedindo a disseminação de resistência entre as bactérias.

O interesse pela ação de produtos naturais sobre a saúde é muito antigo e a humanidade sempre se utilizou do poder terapêutico de extratos animais e vegetais na forma de chás, pomadas, emplastos, vapores, tinturas e até mesmo de incensos. Sua utilização é crescente nos dias atuais (Silva *et al.*, 1998), principalmente em países subdesenvolvidos ou seguidores de terapias não convencionais. A etnofarmacologia é a ciência que aplica o método científico para estudar as atividades terapêuticas de produtos animais e vegetais utilizados popularmente (Cowan, 1999). Na atualidade, muito tem sido pesquisado em relação às diversas ações de produtos naturais, principalmente em países em desenvolvimento, que necessitam de formas alternativas mais econômicas para o controle de doenças. Mas, geralmente, esses estudos são direcionados para as doenças degenerativas, sistema nervoso central, para o caráter mutagênico ou antimutagênico dos princípios ativos dos mesmos. Estima-se que um gene de uma planta tropical, potencialmente útil, renda para um país desenvolvido 1 bilhão de dólares (Simões *et al.*, 1999).

Sabe-se que muitos compostos naturais utilizados pelo homem são antimutagênicos e anticarcinogênicos, sendo esses efeitos observados em produtos oriundos de frutas, temperos, café, chá, muitas vezes por serem capazes de proteger o DNA contra danos oxidativos, isto é, por apresentarem propriedades antioxidantes, ou serem capazes de inibir a peroxidação de lipídeos e, até mesmo, modularem a atividade de algumas enzimas (Hamss *et al.*, 1999). Pesquisas realizadas em todo o mundo indicam que dietas alimentares influenciam grandemente na prevenção ou no desenvolvimento de certas doenças, como o câncer. Estima-se que de 30 a 40% dos cânceres estão relacionados com a dieta (Ferguson, 1999). Muitos constituintes dos vegetais são reconhecidos anticancerígenos e antimutagênicos, tais como:

compostos fenólicos, fibras, clorofila, β -caroteno, vitaminas (C e E). Compostos fenólicos são ubíquos nas plantas e possuem muitas atividades biológicas, como: antioxidantes, captadores de espécies ativas de oxigênio, eletrófilos, bloqueadores de nitratação e quelação de metais ou são capazes de modular atividade enzimática (Surh *et al.*, 1998; Mejía *et al.*, 1999). A combinação de compostos pode aumentar ou diminuir os efeitos genotóxicos de um determinado composto, como por exemplo o café e seus constituintes (Duarte *et al.*, 1999). Há uma procura sistêmica por bio-antimutagênicos naturais, encontrados em plantas e animais, e a utilização de testes microbiológicos pela verificação da capacidade protetora destes compostos contra mutações, sejam induzidas ou espontâneas. Os compostos que agem sobre mutágenos extracelularmente são denominados desmutágenos, como por exemplo ácido L-ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e fibras vegetais; aqueles que agem intracelularmente são chamados de bioantimutágenos, por exemplo o chá preto (*Camellia* sp.). Além da ação protetora contra o câncer, existem muitas outras aplicações para produtos naturais, como a diminuição da pressão arterial, de colesterol, de glicose no sangue, e efeito bactericida profilático. Estudos sugerem a indicação terapêutica do chá na prevenção de influenza e redução do risco de câncer, apontando ainda para um provável uso terapêutico das catequinas industrializadas do chá (Kuroda & Hara, 1999).

Porém, nos últimos cinco anos, tem-se observado um interesse efetivo de certos grupos na ação antimicrobiana destas substâncias (Tomita *et al.*, 1997), em especial na atividade antiviral de alguns extratos frente ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e mecanismos alternativos de prevenção de infecções, como o impedimento de aderência bacteriana. Isso se deve ao fato de que, atualmente, ao lado do aumento da frequência de resistência bacteriana a drogas, o arsenal de antimicrobianos derivados de bactérias e fungos é cada vez mais limitado; a cada ano se lança de dois a três novos antibióticos, mas, na maioria das vezes, são acompanhados, simultaneamente, do isolamento de microrganismos resistentes aos mesmos (Cowan, 1999). Entretanto, pouco foi relatado quanto à ação sobre a transferência genética, permanecendo este, ainda, um campo inexplorado. Como raros exemplos,

citam-se os estudos envolvendo a cafeína e derivados de *Cannabis sativa* (Tiagunenko *et al.*, 1975; Molnar *et al.*, 1986).

Calcula-se que existam de 350.000 a 550.000 espécies de plantas no planeta, mas só uma pequena porcentagem delas é utilizada como alimento ou no preparo de medicamentos. O Brasil é o país de maior biodiversidade genética vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas (Cowan, 1999; Simões *et al.*, 1999). Entretanto, nada se sabe sobre a composição química de 99,6% das nossas plantas, além de que grande parte dos compostos secundários já isolados de plantas medicinais ainda estão para ser estudados quanto às suas atividades biológicas (Stangarlin *et al.*, 1999). Os vegetais tem uma capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias, que em muitos casos são utilizadas como defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros (Dempsey *et al.*, 1998), ou na geração de odores, cores e sabor, e que servem de modelo para a síntese de inúmeros fármacos. Entretanto, somente 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao potencial medicinal (Simões *et al.*, 1999). O mercado internacional de fitoterápicos movimenta milhões de dólares anualmente, sendo estimado em 12,4 bilhões de dólares. No Brasil, cerca de 25% do faturamento da indústria farmacêutica está relacionado com fármacos derivados de plantas, mas somente 8% das plantas medicinais brasileiras foram pesquisadas quanto aos seus compostos bioativos, com 590 plantas registradas no Ministério da Saúde para comercialização. Mas apesar de todo este potencial, o Brasil ainda importa 84% do fármacos que é utilizado a um custo muito elevado (Simões *et al.*, 1999).

Os produtos fitoquímicos podem ser divididos em dois grupos: os metabólitos primários ou macromoléculas, presentes em todos os seres vivos, e os secundários ou micromoléculas. Os primeiros são os lipídeos, prótidos e glicídeos. Estes por meios de vias biossintéticas derivam os metabólitos secundários ou micromoléculas, com estruturas complexas e atividade biológica importante, muitas vezes restritos só a determinados grupos vegetais (Habermehl, 1998; Simões *et al.*, 1999). Estes são a principal classe de

compostos antimicrobianos de origem vegetal, tais como os fenóis, os terpenos, alcalóides, lecitinas, polipeptídeos e poliacetilenos, Figura 3 (Cowan, 1999; Simões *et al.*, 1999). Existem ainda os metabólitos terciários, são aqueles produzidos por microrganismos que vivem em simbiose com o vegetal, e que são incorporados pela planta, como por exemplo as toxinas produzidas pelo fungo *Myrothecium verrucaria* presentes nas raízes de *Baccharis dracunculifolia*, incidente no sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina, que são responsáveis pelo envenenamento de gado nestas regiões (Habermehl, 1998).

A presença de compostos secundários (Figura 3) bioativos suscitam muitas teorias quanto a sua origem e utilidade, tais como formação acidental devido à presença de precursores, eliminação de material supérfluo e inútil. Porém, com toda a informação genética que codifica a maquinaria bioquímica por trás da produção desses compostos, parece plausível que tenham sido selecionados por oferecerem alguma vantagem durante a evolução das plantas. A teoria mais aceita é que sejam produzidos como um sistema de defesa contra animais, vírus, microrganismos e até mesmo outras plantas (genericamente conhecidos como fitoalexinas), ou como mecanismos de atração para polinizadores. Agiriam dando o sabor amargo ou ardido, ou por serem letais para microrganismos, como por exemplo a tomatina, que protege os tomates contra ataques de *Aspergillus*. Alguns compostos secundários, como os terpenos, são utilizados pelas plantas para diminuir a competição em um nicho, por inibir o crescimento de outras vegetais ao redor da planta produtora. Essas micromoléculas também podem ser utilizadas por microrganismos em casos de simbiose (Habermehl, 1998; Stangarlin *et al.*, 1999).

Os fenóis são compostos derivados de um anel fenólico, sendo que quanto maior for seu grau de hidroxilação, maior sua toxicidade para microrganismos. Ao que parece, os compostos oxidados inibem a atividade enzimática através de uma reação de grupos sulfidríla ou por interações não específicas com proteínas. Além dos fenóis simples, apresentam como

subclasses as quinonas (usadas pelas plantas como anti-fúngico, talvez por serem relacionadas com reações redutoras, e assim reagindo com histidina, triptofano e tirosina, induzindo reações de oxidação), flavonas, flavonóides (estes são produzidos em resposta a infecções microbianas), flavonóis, taninos (responsáveis pela preservação do fruto até o total desenvolvimento da semente) e cumarinas (assim como saponinas e outros dão sabor amargo, desestimulando a herbivoria). As atividades antimutagênica e antitumoral do chá preto (*Camellia sinensis*) são atribuídas a compostos fenólicos presentes na mesma, assim como o efeito antioxidante do mate (*Ylex paraguayensis*) (Habermehl, 1998; Cowan, 1999).

Os terpenos são metabólitos secundários derivados do acetato, cuja estrutura básica é o isopreno, e que quando possuem elementos adicionais, como o oxigênio, são denominados terpenóides. São ativos contra bactérias, fungos e protozoários, agindo possivelmente na desorganização da estrutura da membrana (Habermehl, 1998; Cowan, 1999). Alguns terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) são constituintes de óleos essenciais e como os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalaínas) agem atraindo insetos, pássaros, morcegos e ratos, responsáveis pela polinização. Os gincólídeos, terpenos presente no *Ginkgo biloba*, são responsáveis pela inibição do fator de ativação plaquetária, e os seus flavonóides (cerca de vinte tipos) pela atividade captadora de radicais livres (Cowan, 1999; Simões *et al.*, 1999).

Os alcalóides são compostos nitrogenados heterocíclicos, que têm a morfina como representante mais famosa. A ação antimicrobiana deste grupo, em especial contra protozoários, está relacionada à sua capacidade de se intercalar ao DNA. Nos vegetais dão sabor amargo, porém a sua propriedade mais marcante é a neurotoxicidade (Habermehl, 1998; Cowan, 1999).

Os peptídeos que apresentam atividade inibitória frente aos microrganismos pertencem ao grupo de moléculas positivamente carregadas e portadoras de pontes de bisulfeto. Sua ação é provavelmente relacionada à formação de canais iônicos na membrana celular ou à inibição por competição da aderência das proteínas microbianas aos receptores polissacarídeos do

hospedeiro. Essas proteínas são codificados pelos genes de resistência (genes R, tais como *Pto*, *Fen*, *Prf*, *I2* em tomates) (Hammond-Kosak & Jones, 1997; Cowan, 1999).

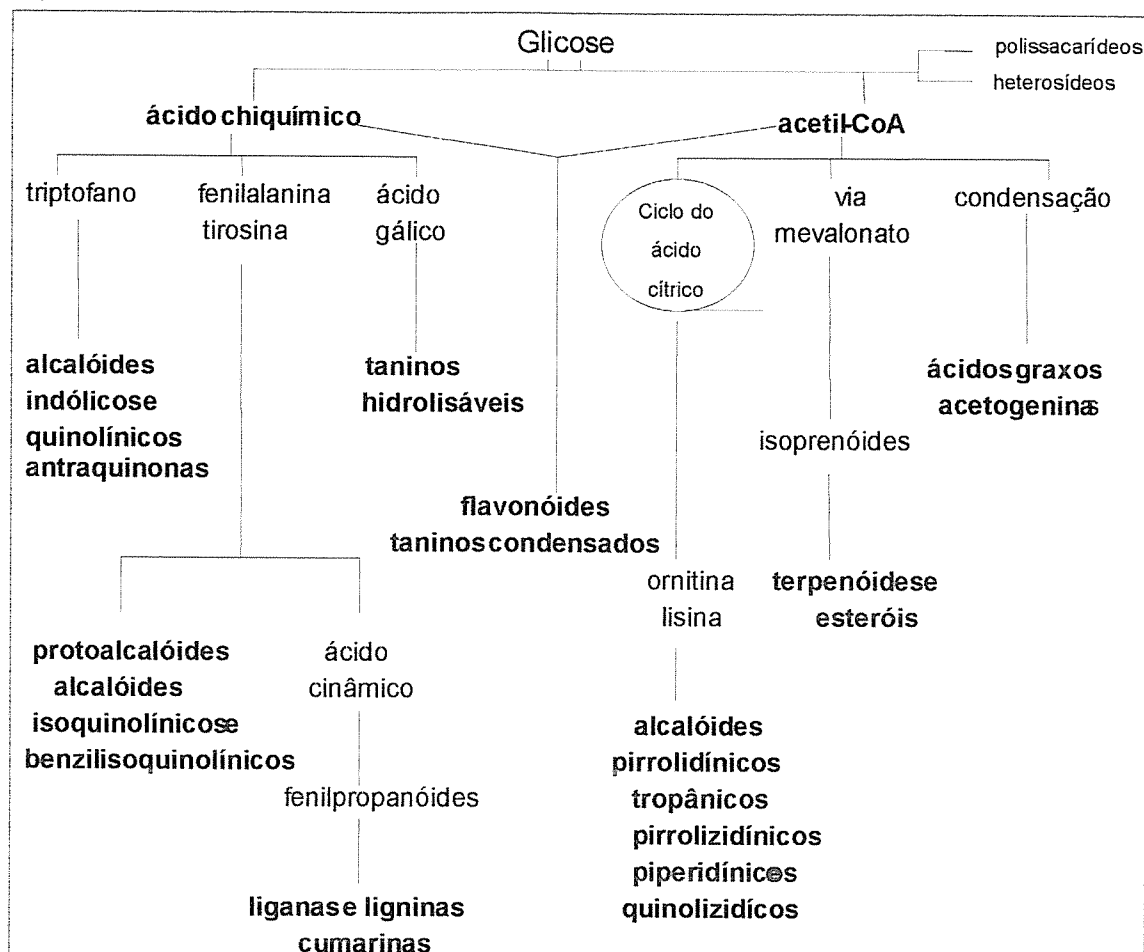


Figura 3 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte - Simões *et al.*, 1999.

As grandes moléculas de lecitinas apresentam forte atividade antiviral, sendo seu provável mecanismo de ação a inibição da interação do vírus com componentes celulares do hospedeiro (Cowan, 1999).

Além dessas classes, outras substâncias de origem vegetal mostram certa atividade antimicrobiana, como poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos e glicosídeos, fazendo esta última parte do grupo de substâncias que contém enxofre derivadas de aminoácidos. A aliina, que pela ação da alinase origina a alicina, é responsável pelas atividades biológicas (antihipertensiva,

hipocolesterolemizante, inibidora de agregação plaquetária, fibrinolítica, antidiabética) e odor característico do alho. Este produto cuja atividade antibacteriana foi relatada por Pasteur no século XIX, tem sido muito utilizado como fármaco desde da antigüidade. Sua ação é creditada à reatividade da alicina e seus produtos de degradação frente a grupos sulfidilas de proteínas (Cowan, 1999; Simões *et al.*, 1999).

Entretanto, quando certos extratos vegetais são analisados com o fim de se encontrar qual dos seus componentes é responsável pela sua atividade antimicrobiana, encontra-se não um, mas um conjunto de compostos, que só são bioativos quando juntos. Exemplos dessas misturas complexas são o látex de *Carica papaya*, que é constituído de papaína, carpaína e terpenóides, e apresenta atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*. A própolis é outro extrato derivado do bálsamo de plantas, recolhido por abelhas. Sua composição química é muito complexa, com a presença de terpenóides, flavonóides, ácidos benzóicos, e ácidos fenólicos substituídos. Estima-se que seja composta por cerca de 150 derivados, das quais apenas dois tem origem puramente animal (Santos *et al.*, 1999). *In vitro*, a própolis apresenta atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica. Entretanto, quando isolados apresentam um atividade muito menor do que a do extrato, levando a crer que, seus componentes ajam sinergisticamente (Cowan, 1999). A babosa (*Aloe vera*) é outro exemplo de produto que apresenta melhores atividades biológicas quando na forma de composto fresco, pois seus componentes tendem a ser degradar no preparo do extrato.

Os produtos naturais podem ser apresentados de diversas formas: infusões, decoctos (chás), sucos, extratos (aquosos, hidroetanólicos ou oleosos), alcoolaturas (macerados em temperatura ambiente com etanol), tinturas (0,1g/ml), extratos fluidos (1g/ml), elixires (20 a 50% V/V), xaropes (soluções com sacarose em concentrações superiores a 40%) (Simões *et al.*, 1999).

A coleta e preparação das plantas medicinais são aspectos importantes do aproveitamento de plantas medicinais e preparo de seus respectivos fármacos. Cuidados especiais devem ser tomados quanto à colheita, secagem e armazenamento do material. A coleta deve levar em conta a estação do ano em que há maior concentração do princípio ativo, assim como o horário do dia mais apropriado. Para a extração de alcalóides e óleos essenciais as plantas devem ser colhidas pela manhã, para a extração de glicosídeos no período da tarde. O estágio de desenvolvimento do vegetal também deve ser avaliado, com risco de alterações na qualidade química do produto. Ver Quadro 3 (Simões *et al.*, 1999).

O material coletado deve ser ainda protegido de danos por esmagamento e incidência de raios solares que aceleram a degradação de princípios ativos. A secagem do mesmo pode ser feita em secador ou à sombra. E o período de armazenamento deve ser o menor possível (Simões *et al.*, 1999).

Para a extração de princípios ativos deve-se levar também em consideração a consistência do tecido vegetal, a seletividade do agente extrator, que depende da polaridade da substância a ser extraída, em alguns casos o pH da extração (alcalóides), a toxicidade do solvente, e a estabilidade das substâncias extraídas - Quadro 4 (Simões *et al.*, 1999).

Finalmente, deve-se ressaltar que há mais de duas décadas que este laboratório vem desenvolvendo pesquisas envolvendo a transferência de plasmídios, por conjugação, entre bactérias Gram negativas, quando se investigaram, dentre outros temas, a mobilização e a quimiotaxia entre linhagens doadoras e receptoras de plasmídios R. Paralelamente a esta pesquisa, estudos preliminares realizados neste laboratório vem mostrando interessantes resultados evidenciando a inibição parcial ou total da transferência de plasmídios R conjugativos, em testes com um adoçante artificial e extratos de algumas plantas, o que veio a auxiliar no desenvolvimento do suporte metodológico e na infra-estrutura para a realização deste projeto.

QUADRO 3

Partes das plantas utilizadas e épocas de colheita, conforme recomendações de EMATER-DF (1988).

Parte utilizada	Quando colher
Folhas e planta inteira	Pré-floração
Flores	Bem abertas
Frutos	Bem maduros
Sementes	Bem desenvolvidas
Cascas e raízes	Outono e início de inverno

Fonte - Simões *et al.*, 1999.

QUADRO 4

Exemplos de solventes, em ordem crescente de polaridade e respectivos grupos de metabólitos majoritariamente extraídos.

Solvente	Tipos de substâncias preferencialmente extraídas
Éter de petróleo, hexano	Lipídeos, cêras, pigmentos, furanocumarinas
Tolueno, diclorometano, clorofórmio	Bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos
Acetato de etila, n-butanol	Flavonóides, cumarinas simples
Etanol, metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas, água	Saponinas, taninos
Água acidificada	Alcalóides
Água alcalinizada	Saponinas

Fonte - Simões *et al.*, 1999.

1.6 - OBJETIVOS

Considerando-se a vasta biodiversidade da flora brasileira e a tendência mundial na busca de alternativas naturais para combater o gravíssimo problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis no mercado, agravada neste final de século, realizou-se esta pesquisa para investigar a atividade de produtos de origem vegetal, de amplo uso popular, quanto à:

inibição do crescimento bacteriano;

reversão do perfil do fenótipo de susceptibilidade a antimicrobianos;

obtenção de variantes resistentes aos próprios produtos vegetais com atividade antibacteriana.

alteração da frequência de transferência de genes plasmídicos de resistência, por conjugação.

2 . MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas usadas nos experimentos estão descritas nos quadros 5, 6 e 7, e foram divididas em selvagens, manipuladas geneticamente e padrões de *Escherichia coli* e outras espécies, pertencentes ao Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, cujos perfis de resistência e comportamento frente aos mecanismos de transferência genética já são conhecidos.

QUADRO 5

Linhagens bacterianas usadas nos experimentos.

Linhagens	Perfil de Resistência	Origem
<i>E. coli</i> BH100	Lac ⁺ Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r , Km ^r , Hg ^r , Sm ^r	Chartone-Souza, E., 1975
<i>E. coli</i> K12 Sm ^r	Lac ⁻ Sm ^r	Clowes & Rowley, 1954
<i>E. coli</i> K12 Nx ^r	Lac ⁺ Nx ^r	Clowes & Rowley, 1954
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Lac ⁺	ATCC ¹
<i>E. coli</i> 22R80	Lac ⁺ Col ^s	Colindale, Inglaterra
<i>E. coli</i> 0:157	Sensível	ATCC
<i>E. coli</i> H22	Tc ^r , Sm ^r	LGMM
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 49397	Sensível	ATCC
<i>S. typhimurium</i> MG031	Lac ⁻ Tc ^r , Collb	Sant'Anna <i>et al.</i> , 1995
<i>S. typhimurium</i> ED040	Lac ⁻ Tc ^r , Collb	Sant'Anna <i>et al.</i> , 1995
<i>S. sonnei</i> ATCC 11060	Sensível	ATCC
<i>S. flexneri</i> 4	Sensível	Lobo <i>et al.</i> , 1993
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Sensível	ATCC
<i>S. aureus</i> 37	Ap ^r , Cm ^r , Ox ^r , Pen ^r , Sm ^r , Tc ^r	Di Sálvio, 1998
<i>S. aureus</i> 50	Ap ^r , Cm ^r , Ox ^r , Pen ^r , Sm ^r , Tc ^r	Di Sálvio, 1998
<i>P. aeruginosa</i> P1	Ap ^r , Cm ^r , Sm ^r , Hg ^r	Magalhães, 1997
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Ap ^r , Cm ^r , Hg ^r	ATCC

1 - ATCC - American Type Culture Collection

QUADRO 6

Linhagens bacterianas manipuladas: transconjugantes (T) e curadas (C)

Linhagens Transconjugantes e curadas	Perfil de Resistência	Origem
<i>E. coli</i> BH100 CPG ¹	Lac ⁺	LGMM
<i>E. coli</i> K12 Sm TG ²	Lac ⁻ Ap ^r , Sm ^r	LGMM ⁵
<i>E. coli</i> K12 Sm TP ²	Lac ⁻ Tc ^r , Cm ^r , Km ^r , Hg ^r , Sm ^r	LGMM
<i>E. coli</i> K12 Sm TPG ²	Lac ⁻ Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r , Km ^r , Hg ^r , Sm ^r	LGMM
<i>E. coli</i> K12 NX T ³	Lac ⁻ Nx ^r , Tc ^r , Col1	Sant'Anna <i>et al.</i> , 1995
<i>E. coli</i> K12 NX T ³ C	Lac ⁻ Nx ^r	Sant'Anna <i>et al.</i> , 1995
<i>S. typhimurium</i> MG031 C ⁴	Lac ⁻	Sant'Anna <i>et al.</i> , 1995

1 - *E. coli* BH100 curada (C) de plasmídio: G (grande - Tc^r, Cm^r, Km^r, Hg^r, Sm^r); P (pequeno - Ap^r)

2 - Transconjugantes (T) resultantes da conjugação entre *E. coli* BH 100 (doadora) e *E. coli* K12 Sm (receptora): TP: com plasmídio pequeno; TG: com plasmídio grande; TPG: com plasmídios grande(G) e pequeno (P).

3 - Transconjugante resultantes da conjugação entre *S. typhimurium* MG 031 (doadora - Tc^r Collb) e *E. coli* K12 Nx (receptora - Nx^r), que foi posteriormente curada.

4 - *S. typhimurium* MG031 C (curada de plasmídio Tc^r Collb).

5 - Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos

QUADRO 7

Linhagens bacterianas com plasmídios padrão de peso molecular conhecidos

Linhagens	Plasmídios	Peso Molecular
<i>E. coli</i> K12 HB101	pBR322	2,6 Mda
<i>E. coli</i> K12 J53W	S a	23 Mda
<i>E. coli</i> K12 J53	RP ₄	36 Mda
<i>E. coli</i> K12 J53	R6-5	65 Mda

2.2 - Plantas e produtos derivados

Tanto as plantas quanto a própolis foram escolhidas levando em consideração seu grande uso popular, tanto em nível regional, com ênfase em Belo Horizonte, MG, quanto internacional, nas formas de extrato, de decocto e suco.

Dentre as plantas destacaram-se por sua importância e facilidade de padronização as indicadas no Quadro 8:

Allium sativum (alho), *Coffea arabica* (café – com e sem cafeína, fruto seco torrado em pó solúvel), *Ginkgo biloba* (extrato seco em pó), *Punica granatum* (romã) e própolis foram escolhidos devido ao grande interesse despertado na comunidade científica nacional e internacional.

Casearia sylvestris (guaçatonga) conforme dados da literatura, por ter atividade antimutagênica.

Vanillomoropsis erythropappa Schult. Bip (candeia) escolhida por ser utilizada como mourões na agropecuária, uma vez que é popularmente conhecida como um material com resistência à degradação biológica (ação de fungos, líquens e microrganismos), e umidade do solo; *Ylex paraguayensis* (mate, folha seca torrada em pó) escolhida por ser considerada como bactericida e por apresentar elevadas concentrações de cafeína, como ocorre também com *Coffea arabica*.

Anchietea salutaris (sumá roxo, cipó) foi escolhida a partir de informação de "raizeiros", ambulantes que vendem ervas em Belo Horizonte, que a indicam para o tratamento de infecções intestinais. Sua preparação foi feita de acordo com indicação dos mesmos.

As seguintes plantas (ou produtos) foram também investigadas quanto à atividade ou concentração inibitória frente a diversas bactérias:

os fornecidos pela farmácia homeopática ATMA, na forma de extratos alcoólicos 10%:

Arctium sp (bardana), *Bowdichia* sp (sucupira), *Equinacea angustifolia* (equinacea), *Hamamelis virginia* (hamamélis), *Solanum melongena* (berinjela), *Plantago major* (tanchagem);

os preparados em nosso laboratório nas formas de:

- Extrato aquoso autoclavado 10% P/V

Camellia sinensis (chá preto, folha seca em pó, Oetker Produtos Alimentícios LTDA), *Chamomilla* sp (camomila, folha seca em pó), *Lippia alba* (cidreira, folha seca em pó), *Pimpinella anisum* (erva-doce, folha seca em pó), *Nicotiana tabacum* (fumo).

Além dos produtos mencionados, foram submetidos a testes:

Ananas commomus (abacaxi, suco puro), *Sisymbrium* sp (agrião, suco puro), *Aloe vera* (babosa, mucilagem), *Musa paradisiaca* (banana, macerado), *Allium cepa* (cebola, suco puro), *Paullinia cupana* (guaraná, extrato aquoso), *Mentha piperita* (hortelã, suco puro).

QUADRO 8

Plantas ou produtos derivados , sua preparação e indicações terapêuticas populares ou homeopáticas

Nome popular	Nome científico	Forma/ Concentração (p/v)	Origem/ Preparação	Indicações populares e homeopáticas principais	Referências de Literatura
Alho	<i>Allium sativum</i>	Suco puro	Mercado Central de BH/ ICB-UFMG	Infecções, doenças cardíacas, orgânica, verminoses	Ankri & Mirelman, 1999
Café	<i>Coffea arabica</i>	Decocto/ 10%	Café solúvel Nestlé/ UFMG	Estimulante, memória	Itoyama <i>et al.</i> , 1997
Café descafeinado	<i>Coffea arabica</i>	Decocto/ 10%	Café Descafeinado Torrado e moído Melitta LTDA/ ICB-UFMG	Uso medicinal não explícito.	
Candeia	<i>Vanillomoropsis erythropappa</i>	Tintura de tronco com casca/ 10%	ATMA Homeopática.	Indústria cosmética e agropecuária (como mourões). Uso medicinal não explícito.	http://www.destilaria.com
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Extrato aquoso / 7,5%	ATMA Homeopática.	Anticoagulante, problemas circulatórios e neurológicos	Sticher, 1993

QUADRO 8

Plantas ou produtos derivados, sua preparação e indicações terapêuticas populares ou homeopáticas (conclusão)

Nome popular	Nome científico	Forma/ Concentração (p/v)	Origem/ Preparação	Indicações populares e homeopáticas principais	Referências de Literatura
Erva-mate	<i>Ilex paraguayensis</i>	Extrato aquoso 3.4%	Matte Leão / ICB-UFMG	Estimulante	Araujo & Lucas, 1930
Romã	<i>Punica granatum</i>	Extrato alcoólico/ 10%	Lab. Schraiber	Anti-helmíntica, amigdalite, laringite, faringite,	Balbach, 1975
Sumá	<i>Anchietea salutaris</i>	Extrato aquoso/ 10%	Mercado Central de BH/ ICB/UFMG	Sífilis, coqueluche, emético, dermatoses,	Balbach, 1975
Própolis	Produzido por <i>Apis indigena</i> (abelhas)	Extrato alcoólico/ 40%	ATMA Homeopática. Farmácia	Antigripal, respiratórias e infecções intestinais, herpes.	Burdock, 1998

2.3 - Manutenção e preparação das culturas bacterianas

As linhagens bacterianas foram mantidas em tubos com tampa de borracha, em meio de Lignières, à temperatura ambiente.

Para cada experimento transferia-se com alça de níquel-cromo uma amostra do estoque, inoculando-se em 3 ml de caldo nutriente e incubando-se a 37°C, durante 18-24 horas, a não ser que se especifique outra informação.

2.4 - Métodos de preparação dos produtos vegetais

Processo de esterilização:

As partes das plantas escolhidas foram primeiramente descascadas (quando necessário) e pesadas, em seguida foram, lavadas com água e sabão neutro, e imersas em álcool 70° por um minuto, em hipoclorito 30% por 30 segundos e novamente imersos em álcool 70° por um minuto, escorrido o excesso e posto para secar em ambiente asséptico.

Suco

Após esterilização, *A. sativum* foi triturado em cadinhos esterilizados dentro da capela de fluxo laminar, para então serem espremidas em gaze estéril e seu suco estocado.

Decocto

Foram preparado na concentração de 10% (p/v), em água destilada e fervidos.

Extratos aquosos

Foram preparados na concentração de 10% (p/v), em água destilada e autoclavado a 120°C por 15 minutos.

Extratos alcoólicos

Foram fornecidos prontos pela Farmácia Homeopática Atma S. A., assim como a tintura de *V. erythropappa* (candeia) que foi preparada pela mesma.

Estocagem dos produtos

Os produtos adquiridos, já preparados, foram mantidos em seus próprios recipientes, aqueles preparados neste laboratório foram mantidos em frascos de vidro fechados à temperatura ambiente. *A. sativum* (suco) foi mantido à temperatura de 4°C, dividido em pequenas alíquotas de 1ml cada, que após descongeladas eram usadas e descartadas. *C. arabica* era preparado no momento de ser utilizado.

Padronização da substância

Foram realizados testes de solubilidade em caldo nutriente, BHI e TSB e de saturação, quando indicado. Acrescentaram-se quantidades sucessivas, seguindo de aquecimento até a determinação do valor mínimo que permitia a formação de precipitado. Utilizou-se a quantidade máxima do produto que não saturasse o meio (sem precipitado). Corrigiu-se o pH, se necessário, e de todos os produtos, assim como testando-se a esterilidade em meio BHI e BHA, após incubação por 24h a 37°C e em meio ambiente por 48-72h.

2.5 - Presença de inibição e estabelecimento da concentração inibitória mínima (CIM)

A presença ou ausência de atividade inibitória ou a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram investigada por meio de dois métodos:

- pela técnica de difusão em placa de ágar Müeller-Hinton, a qual era semeada com 0,1 ml da linhagem para formar um tapete de células, usando disco de papel filtro embebido com 10µl do produto-teste que era seco antes do uso, e/ou colocando-se diretamente, por "spot", 10µl do produto sobre o meio, seguindo-se de incubação e observação da presença ou ausência da formação de halo de inibição de crescimento, após 24h a 37°C;
- e pela técnica da diluição seriada das concentrações originais dos produtos teste, de 10 em 10, variando de 100% até 0% (controle), em caldo TSB. As culturas bacterianas foram adicionadas para completarem cerca de 10⁸ células/ml, e após 24h a 37°C, cerca de 5µl de cada cultura foi inoculada com auxílio de multi-alça em placa de TSA para a observação de presença ou ausência de crescimento. Considerou-se como CIM a menor concentração do produto-teste que não permitiu o crescimento bacteriano.

A determinação da susceptibilidade para *Allium sativum* foi realizada pelo método de diluição em caldo Müeller-Hinton, para as seguintes linhagens: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* K12 Nx, *E. coli* O:157 H7, *Salmonella typhimurium* ED 040, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 37, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* P1.

2.6 - Determinação do crescimento bacteriano em concentrações sub-inibitórias de alguns produtos

Determinou-se uma curva de crescimento simplificada para as linhagens de *E. coli* BH 100, *E. coli* K12 Sm, *E. coli* K12 Nx e *S. typhimurium* ED 040, na presença ou ausência dos produtos testados (*A. sativum*, *A. salutaris*, *C. arabica*, *Y. paraguayensis*, *Ginkgo biloba*, *V. erythropappa*, *P. granatum*,

própolis), diluídos em TSB. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. As quais foram utilizadas para o preparo de novas culturas em TSB mais o produto a ser testado, totalizando 4ml, de modo a obter uma população de 10^7 células/ml. Essas culturas foram incubadas a 37 °C. Nos tempos T_0 , T_2 (duas horas), T_4 (quatro horas) foram retiradas alíquotas, que após diluições de 10^{-1} até 10^{-8} , foram semeadas (0,1 ml) de cada uma em placas com ágar nutriente, em duplicata. As leituras dos resultados foram feitas após 24 horas de incubação a 37 °C, contando-se o número de colônias por placa. O número de UFC/ml, nos diversos intervalos de tempo, foi estimado multiplicando-se a média do número de colônias das placas pelo respectivo fator de diluição, e ainda por 10, uma vez que o inóculo nas placas era de 0,1ml.

2.7 - Influência do pH sobre a atividade antibacteriana dos produtos

Pesquisou-se a manutenção da atividade inibitória de diversos produtos sobre as linhagens de *E. coli* K12 Nx, *E. coli* K 12 SM, *E. coli* BH 100 e *S. typhimurium* ED 040 após drástica alteração do pH. Para isso, foram preparadas concentrações inibitória e sub-inibitória em caldo TSB dos seguintes produtos: *A. sativum*, *A. salutaris*, *C. arabica*, *G. biloba*, *I. paraguayensis*, *P. granatum*, *V. erythropappa* e própolis. Seguiu-se acidificação do caldo com os diversos produtos com ácido clorídrico até o pH1,5 permanecendo assim por uma hora, em temperatura ambiente. Procedeu-se a seguir, à correção do pH para cerca de 6,5 a 7, com hidróxido de sódio, após o que as culturas bacterianas foram adicionadas para completarem 10^8 células/ml e incubadas por 24 horas a 37 °C. Após inoculação por "spot" em placa de TSA e incubação por 24 horas a 37 °C, verificava-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

2.8 - Obtenção de “sobreviventes” bacterianos resistentes em placa gradiente (Bryson & Szybalski, 1952, modificado)

Para a obtenção de possíveis variantes resistentes aos próprios produtos que apresentaram atividade antimicrobiana após determinação da CIM (*A. sativum*, *P. granatum*, *C. arabica*, *A. salutaris*, própolis) escolheram-se as linhagens *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* BH100, *E. coli* k12 Nx, *E. coli* k12 Sm, *S. aureus* 50, *P. aeruginosa* 1 e *S. typhimurium* ED040. Efetuou-se a passagem dessas bactérias em placas gradiente, com concentração inicial equivalente, no máximo, ao dobro do valor da CIM, conforme Figura 4 .

Para o segundo passo, colônias variantes eram ressuspensas em caldo TSB e semeadas em placa gradiente com no máximo o dobro da concentração do primeiro passo.

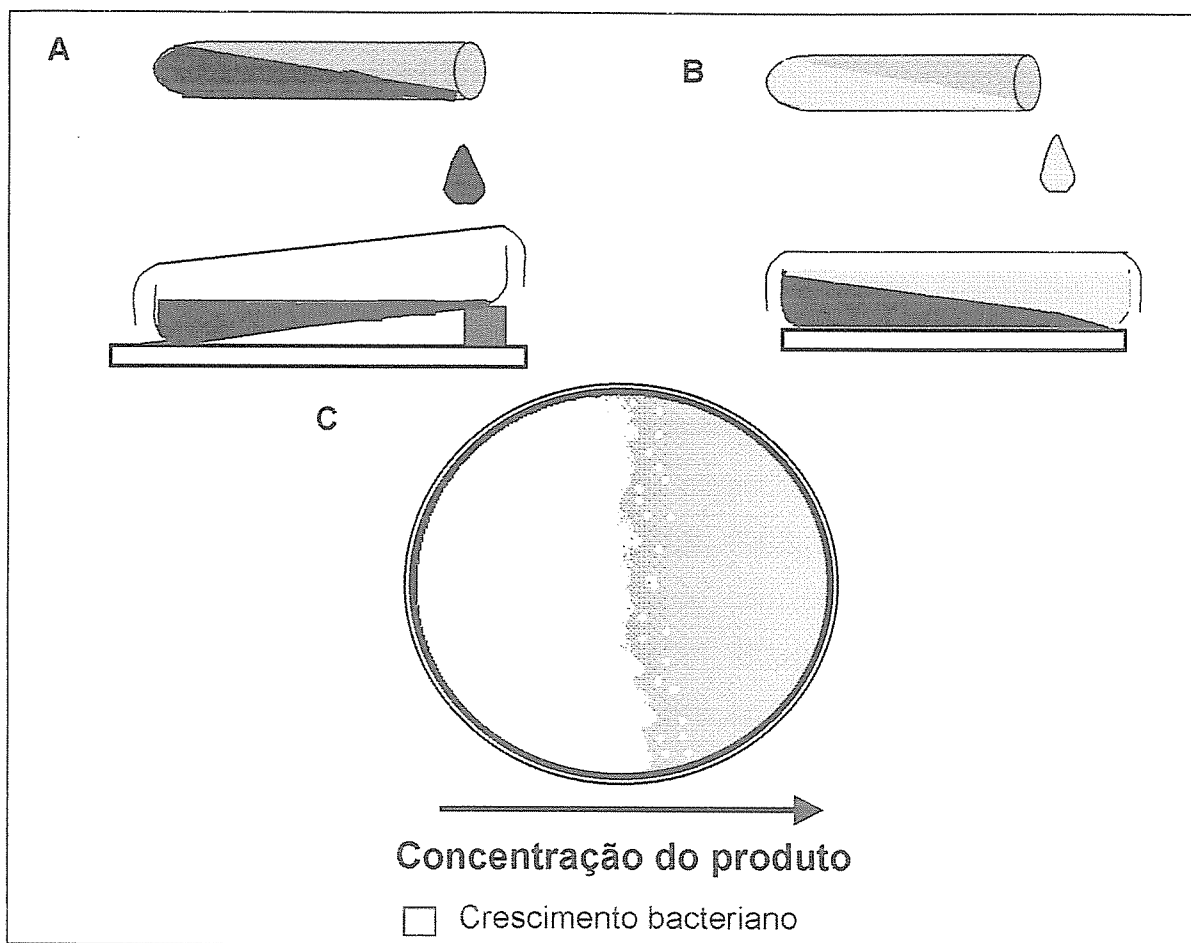


FIGURA 4 - Preparação da placa gradiente. (A) Adição sobre placas inclinadas a cerca de 5° de 20ml de ágar Müller-Hinton. (B) Adição de 20 ml do mesmo meio, a 45° com o produto(Quadro 10). (C) Após secagem da placa, semeadura, com alça de Drigalsky, de 0,1 ml de cultura (preparada em caldo TSB a 37°C por 24 horas); detecção de colônias isoladas variantes, após incubação a 37°C, por 48 horas ou mais se necessário.

2.9 - Pesquisa de reversão fenotípica do perfil de susceptibilidade aos antibióticos

Para se investigar a reversão fenotípica do perfil de susceptibilidade de algumas bactérias frente a algumas drogas foram utilizados dois procedimentos.

Procedimento I. Cerca de 10^5 UFC/ml das linhagens foram incubadas por 24h a 37°C em caldo Müller-Hinton puro ou acrescido dos produtos-teste nas devidas concentrações sub-inibitórias (NCCLS, 1993), e semeadas por meio de "spot" em ágar Müller-Hinton suplementado com os seguintes antibióticos: ampicilina (Ap, 100µg/ml); cloranfenicol (Cm, 60µg/ml) estreptomicina (Sm, 150µg/ml); tetraciclina (Tc, 100µg/ml) e penicilina G (Pen, 200µg/ml). Após incubação por 24 horas a 37 °C, verificava-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

Procedimento II. Cerca de 10^5 UFC/ml das linhagens bacterianas incubadas por 24h a 37°C em caldo Müller-Hinton puro ou suplementado com produtos teste e os antibióticos nas devidas concentrações, e semeadas por "spot" (NCCLS, 1993), em ágar Müller-Hinton 1,5%. Após incubação por 24 horas a 37 °C, investigava-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

2.10 - Ação de produtos naturais na conjugação

A transferência de plasmídios R foi efetuada pelo processo de conjugação em caldo TSB (Watanabe & Fukasaka, 1961, modificado), utilizando como receptoras a *E. coli* K12 Nx Lac⁺ com resistência cromossômica ao ácido nalidíxico e *E. coli* K12 Sm Lac⁻ com resistência cromossômica à estreptomicina. Como doadoras, a *S. typhimurium* ED040 Lac⁻

portadora de plasmídio R conjugativo (65 Mda) codificador de resistência à tetraciclina e produção de Collb, e *E. coli* BH100 Lac⁺ portadora de um plasmídio R conjugativo grande (60Mda), denominado G, codificador de resistência à tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, bicloreto de mercúrio e estreptomina (em baixas concentrações), e um plasmídio pequeno (10 Mda), denominado P, mobilizável pelo primeiro, codificador de resistência à ampicilina (P). A cultura mista, em TSB, foi exposta ou não a uma concentração sub-inibitória do produto a ser testado durante um período de duas horas. A seleção de transconjugantes feitas em ágar EMB (indicador de Lac⁺ e Lac⁻) suplementado com ácido nalidíxico e tetraciclina, ambos na concentração de 20µg/ml, para *E. coli* K12 Nx X *S. typhimurium* ED040, e com estreptomina (200µg/ml) e tetraciclina (20µg/ml) para *E. coli* K12 Sm X *E. coli* BH 100. Realizou-se a leitura após incubação por 24 a 48 horas à 31°C.

Foram realizadas 8 combinações da adição dos produtos na conjugação (Quadro 9). O tratamento prévio da doadora ou receptora (ou de ambas) foi realizado separadamente inoculando-se 1ml de cultura crescida em TSB a 37°C por 24h em TSB acrescido do produto-teste na respectiva concentração sub-inibitória, (para dar uma população de cerca de 10⁸/ml) totalizando 10ml. Após incubação por 2 horas a 37 °C, alíquotas foram e então utilizadas na conjugação (cultura mista). O tratamento durante a cultura mista foi feito acrescentando-se o produto-teste na respectiva concentração sub-inibitória ao TSB, totalizando 3ml, adicionando-se então as culturas doadora e receptora, tratadas ou não tratadas, de modo a atingir cada uma a população de cerca de 10⁸/ml.

Para o teste com *A. sativum*, o experimento de conjugação foi realizado em caldo Müeller-Hinton, utilizando como receptora *E. coli* K12 Nx, e como doadora *S. typhimurium* ED040. Apenas a cultura mista foi submetida à exposição ao produto, durante um período de duas horas. A seleção de transconjugantes foi realizada em ágar Müeller-Hinton suplementado com ácido nalidíxico e tetraciclina, ambos na concentração de 20 µg/ml.

QUADRO 9

Combinação da utilização dos produtos sobre bactérias doadoras e receptoras e sobre a cultura mista

Exposição aos produtos		Representação
Exposição prévia	Cultura Mista	
Doadora não exposta (D ⁻) e receptora não exposta (R ⁻)	Não (-)	D ⁻ R ⁻
Doadora não exposta (D ⁻) e receptora não exposta (R ⁻)	Sim (+)	D ⁻ R ⁺
Doadora exposta (D ⁺) e receptora não exposta (R ⁻)	Não (-)	D ⁺ R ⁻
Doadora exposta (D ⁺) e receptora não exposta (R ⁻)	Sim (+)	D ⁺ R ⁺
Doadora não exposta (D ⁻) e receptora exposta (R ⁺)	Não (-)	D ⁻ R ⁺
Doadora não exposta (D ⁻) e receptora exposta (R ⁺)	Sim (+)	D ⁻ R ⁺
Doadora exposta (D ⁺) e receptora exposta (R ⁺)	Não (-)	D ⁺ R ⁺
Doadora exposta (D ⁺) e receptora exposta (R ⁺)	Sim (+)	D ⁺ R ⁺

2.11 - Detecção de produção de bacteriocinas (Kelner, 1948)

As amostras, após o crescimento em caldo BHI a 37 °C por 18-24h, foram semeadas em placas contendo ágar BHI, na forma de "spot", com cerca de 10µl da cultura.

Após a incubação (37 °C / 18-24h), as placas foram expostas a vapores de clorofórmio (E. Merck), para esterilização da superfície. Para isto, 1,0 ml de clorofórmio foi colocado no interior das tampas, justapondo-as a seguir às

respectivas placas em posição invertida. Após 30 minutos, as placas foram entreabertas e mantidas por igual tempo, para completa evaporação do clorofórmio. A seguir, alíquotas de 0,6 ml da cultura padrão indicadora de bacteriocina *E. coli* 22R80, crescida em caldo BHI (37 °C / 18-24h), foram transferidas para tubos contendo 6.0 ml de ágar BHI semi-sólido (0,7% de ágar-ágar), previamente fundido e resfriado à temperatura de 45°C e homogeneizadas. O conteúdo dos tubos foi vertido sobre a superfície do meio de cada placa que era a seguir incubada a 37 °C por 18-24h. O critério utilizado para a leitura foi a verificação da presença ou ausência de halos de inibição circundando os crescimentos bacterianos originais.

2.12 - Extração plasmidiana (Técnica de Birnboim & Dolly, 1979; com modificações) e eletroforese em gel de agarose

As amostras bacterianas teste e com padrão de pesos moleculares conhecidos foram crescidas em caldo TSB e incubadas a 37 °C por 18-24h. Após o crescimento, foi transferido 1,5 ml de cada cultura para tubos Eppendorf, as quais foram centrifugadas por dois minutos (12.000 rpm). O sobrenadante foi descartado, adicionaram-se a cada tubo 100µl da solução I, ressuspendeu-se o sedimento com o auxílio de micropipeta, lisando-se assim a parede celular. Adicionaram-se 200µl da solução II, inverteu-se lentamente por 5 vezes, promovendo a lise da membrana celular e desnaturação do DNA cromossômico. As amostras foram mantidas em gelo por 10 min. Adicionaram-se 150µl da solução III, homogeneizou-se e recolocou-se por cerca de 60 minutos no gelo, renaturando-se assim o DNA plasmidiano e precipitando o cromossômico e plasmidiano de alto peso molecular. Centrifugou-se por 10 min, sendo transferido todo o sobrenadante para novos tubos Eppendorf.

Acrescentaram-se 2V de etanol (E. Merck) gelado, homogeneizando-se novamente e purificando-se assim o DNA plasmidiano. Após a permanência da mistura à -20°C por 18-24h, seguiram-se nova centrifugação, por 10 min., sendo desprezado o sobrenadante. Adicionaram-se 600µl de etanol gelado a 70%, inverteram-se os tubos cuidadosamente, os quais foram centrifugados por mais cinco minutos. Aspirando-se o sobrenadante e deixando-se secar o sedimento, que foi ressuspendido em 15µl de tampão TE. Adicionaram-se 3µl de mistura corante, aplicando-se a solução nas canaletas do gel de agarose a 0,7% e submetendo-as à eletroforese (fonte Pharmacia Biotech - EPS 300/70V), por cerca de três horas. Ao término de a corrida, corou-se o gel durante 30 minutos no tampão de corrida adicionado de brometo de etídio (50µg/ml). Examinaram-se o gel em transiluminador de luz ultravioleta (Germetec LTDA.), o qual foi fotografado com luz ultravioleta incidente, utilizando-se câmara fotográfica Kodak Digital Screen DC40.

Também foi utilizado como padrão de peso molecular o DNA Ladder Supercoiled (Gibco, BRL).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, seguidos de discussão, serão apresentados na seguinte ordem: determinação da concentração inibitória mínima dos diversos produtos de origem vegetal frente a bactérias patogênicas ou não patogênicas, resistentes ou sensíveis a antibióticos; estudo da viabilidade de algumas bactérias (doadoras e receptoras de plasmídeo R), em concentração sub-inibitórias de alguns produtos; detecção de sobreviventes bacterianos frente a alguns produtos, pela técnica de placa gradiente; pesquisa de reversão fenotípica da susceptibilidade a antimicrobianos após o crescimento de algumas bactérias em meios com concentrações sub-inibitórias de *Allium sativum* e *Punica granatum*; influência de alguns produtos sobre a transferência de plasmídios R, por conjugação.

3.1 - Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada pelo “método de diluição em meio líquido”. Finalmente, foram feitos também, para alguns produtos, testes de triagem utilizando “o método de difusão em meio sólido”, com ou sem discos de papel. Os resultados mostraram que para a grande maioria dos produtos, o método de difusão não era o indicado pois evidenciava pouco ou nenhum efeito inibidor, talvez devido a problemas de difusão do princípio ativo no meio sólido que acabava por interferir no resultado final. Molina-Torres *et al.* (1999) descrevem resultados semelhantes, onde extratos de *Heliopsis longipes* e *Capsicum annum* não evidenciavam poder inibitório quando testados por meio de difusão em placa. Entretanto, quando submetidos a teste em meio líquido, mostraram resultados positivos. As exceções, no presente trabalho, foram o *A. sativum* e *C. arabica*, cujos produtos mostraram um poder inibitório muito pronunciado, contra diversas bactérias, com qualquer método utilizado.

Para controle dos experimentos pesquisou-se também a capacidade de inibição do álcool etílico frente às bactérias testadas, com a finalidade de se determinar o efeito do mesmo quando presente nos extratos alcoólicos. Ele se mostrou totalmente inócuo nas concentrações utilizadas. Os solventes utilizados nas extrações de princípios ativos geralmente não interferem em sua atividade biológica, principalmente antimicrobiana (Tosi *et al.*, 1996; Mahasneh & El-Oqlah, 1999).

Verificou-se o pH de todos os produtos, cujos valores dos estoques ou preparações originais variaram de 4.5 a 7 (Tabela 1). Entretanto, nas concentrações utilizadas, o meio de cultura usado nos testes era capaz de tamponar a maioria dos produtos, não sendo, então, necessário sua correção.

TABELA 1

Valores dos pHs das preparações dos diversos produtos

Produtos	pH
<i>A. salutaris</i>	6
<i>A. sativum</i>	6.5
<i>Arctium</i> sp	5
<i>Bowdichia</i> sp	5
<i>C. arabica</i>	5
<i>C. officinalis</i>	5
<i>C. sinensis</i>	5
<i>C. sylvestris</i>	5
<i>Chamomilla</i> sp	5
<i>E. angustifolia</i>	5
<i>H. virginia</i>	5
<i>L. alba</i>	5.5
<i>N. tabacum</i>	7
<i>P. anisum</i>	4.5
<i>P. granatum</i>	5
<i>P. major</i>	5
<i>S. melongena</i>	5
<i>V. erythropappa</i>	5
<i>Y. paraguayensis</i>	5
Própolis	5

Para alguns dos produtos não foi possível a determinação da CIM devido às dificuldades de padronização, foram eles: *Ananas commomus* (abacaxi, contaminação recorrente, falta de reprodutibilidade), *Sisymbrium* sp (agrião, a extração do suco variava de acordo com as condições da planta), *Aloe vera* (babosa) e *Musa paradisiaca* (banana), não miscíveis em água, *Allium cepa* (cebola, a extração do suco variava de acordo com as condições da mesma, com resultados não reproduzíveis), *Paullinia cupana* (guaraná, altamente contaminado, e sem efeito inibidor aparente), *Mentha piperita* (hortelã, a extração do suco variava de acordo com as condições da planta). Estes resultados mostram a importância de se padronizar desde do cultivo da

planta, até condições de coleta (horário, estação do ano, etc.), e tempo e modo de estocagem. Mesmo se adquirindo os produtos sempre do mesmo fornecedor, essas variáveis não podiam ser controladas. Plantas estocadas por muito tempo desidratam, afetando a qualidade do suco dela extraído. Assim como certos componentes se degradam sob efeito da luz e do calor, e até mesmo por traumatismos do tecido vegetal. As condições do local de armazenamento também influem no número de contaminantes (Simões *et al.*, 1999). Os resultados relativos à CIM para as diversas linhagens utilizadas se encontram na Tabela 2.

TABELA 2
Concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos testados em caldo TSB (% v/v) frente a diversas bactérias

Planta/Produto	Linhagens Bacterianas									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> BH 100	<i>E. coli</i> BH 100	<i>E. coli</i> BH 100 CPG	<i>E. coli</i> K12 Sm	<i>E. coli</i> K12 Sm TP	<i>E. coli</i> K12 Sm TG	<i>E. coli</i> K12 Sm TPG	<i>E. coli</i> K12 Sm TPG	<i>E. coli</i> K12 Nx
Controle*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. salutaris</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30	25
<i>A. sativum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Arctium</i> sp	25	30	25	25	25	20	20	25	25	20
<i>Bowdichia</i> sp	25	25	20	20	20	25	25	20	20	15
<i>C. arabica</i>	10	20	20	20	20	20	20	20	20	10
<i>C. officinalis</i>	25	30	30	30	25	30	25	30	30	25
<i>C. sinensis</i>	20	30	15	30	30	30	30	30	30	15
<i>C. sylvestris</i>	20	30	20	20	20	20	25	25	25	20
<i>Chamomilla</i> sp	15	10	20	20	15	30	30	15	15	20
<i>E. angustifolia</i>	25	25	25	25	25	20	25	30	30	25
<i>H. virginia</i>	25	25	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>L. alba</i>	20	30	30	30	30	30	20	30	30	20
<i>N. tabacum</i>	15	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>P. anisum</i>	20	20	30	30	20	30	20	30	30	20
<i>P. granatum</i>	20	25	20	20	20	25	25	25	25	20
<i>P. major</i>	25	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>S. melongena</i>	25	30	30	30	30	25	25	25	25	25
<i>V. erythropappa</i>	30	30	30	30	20	30	25	30	30	15
<i>Y. paraguayensis</i>	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35
Própolis	20	20	20	20	15	20	20	20	20	20

+ - crescimento # - em caldo TSB sem produto

TABELA 2

Concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos testados em caldo TSB (% v/v) frente a diversas bactérias (continuação)

Planta/Produto	Linhagens Bacterianas									
	<i>E. coli</i> H22	<i>E. coli</i> P307	<i>E. coli</i> O:157	<i>S. typhimurium</i> MG 031	<i>S. typhimurium</i> MG 031cur	<i>E. coli</i> K12 Nxt31	<i>E. coli</i> K12 Nxt31cur	<i>S. typhimurium</i> ED 040	<i>S. typhimurium</i> ED 040	<i>S. typhimurium</i> ED 040
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. salutaris</i>	30	20	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>A. sativum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Arctium</i> sp	25	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>Bowdichia</i> sp	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>C. arabica</i>	20	15	20	15	15	10	10	10	10	10
<i>C. officinalis</i>	25	15	25	25	20	25	25	25	25	20
<i>C. sinensis</i>	15	10	30	30	15	20	30	20	20	20
<i>C. sylvestris</i>	20	10	20	25	20	20	20	20	20	20
<i>Chamomilla</i> sp	15	15	20	20	20	10	15	20	20	20
<i>E. angustifolia</i>	25	15	20	25	20	20	25	20	20	20
<i>H. virginia</i>	20	15	20	20	15	15	20	15	15	15
<i>L. alba</i>	30	15	20	30	30	20	30	20	15	15
<i>N. tabacum</i>	15	10	15	15	15	20	20	20	15	15
<i>P. anisum</i>	20	15	20	15	20	15	20	20	20	20
<i>P. granatum</i>	20	15	25	20	15	20	25	20	20	20
<i>P. major</i>	20	20	20	20	20	25	20	20	20	20
<i>S. melongena</i>	30	15	25	30	30	25	30	30	30	30
<i>V. erythropappa</i>	30	25	30	20	25	25	30	30	30	30
<i>Y. paraguayensis</i>	40	30	40	40	40	40	40	40	40	40
Própolis	15	10	15	20	20	15	15	15	15	20

+ - crescimento # - em caldo TSB sem produto

TABELA 2
Concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos testados em caldo TSB (% v/v) frente a diversas bactérias (conclusão)

Planta/Produto	Linhagens Bacterianas						
	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> 50	<i>S. aureus</i> ATCC 11060	<i>S. flexineri</i> 4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> 1
Controle	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. salutaris</i>	30	25	25	30	30	30	30
<i>A. sativum</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Arctium</i> sp	25	20	15	20	20	20	20
<i>Bowdichia</i> sp	20	20	20	15	20	20	20
<i>C. arabica</i>	10	10	10	15	15	20	20
<i>C. officinalis</i>	20	20	20	20	20	20	20
<i>C. sinensis</i>	30	15	15	15	15	30	15
<i>C. sylvestris</i>	20	15	10	15	20	20	20
<i>Chamomilla</i> sp	15	15	30	15	10	10	10
<i>E. angustifolia</i>	20	15	15	15	20	20	15
<i>H. virginia</i>	15	15	15	15	15	20	20
<i>L. alba</i>	15	15	15	15	15	20	20
<i>N. tabacum</i>	15	15	15	15	20	20	20
<i>P. anisum</i>	15	15	15	15	15	15	15
<i>P. granatum</i>	20	15	20	15	20	20	20
<i>P. major</i>	20	15	20	15	15	20	15
<i>S. melongena</i>	25	20	20	20	20	25	25
<i>V. enythropappa</i>	30	30	30	30	25	25	25
<i>Y. paraguayensis</i>	40	35	35	40	40	40	40
Própolis	15	10	10	15	15	20	20

+ - crescimento # - em caldo TSB sem produto

Deve-se salientar que os valores das CIM obtidos (%v/v) não devem ser comparados diretamente porque as concentrações dos estoques originais eram, em geral, diferentes para cada produto. Mas de qualquer modo dão informação relevante quanto à presença ou ausência de atividade inibitória de cada produto sobre as bactérias. Cabe ressaltar também a dificuldade de comparação com os resultados disponíveis na literatura, já que a metodologia utilizada para a verificação de atividade biológica dos extratos sobre microrganismos ainda está sendo padronizada, utilizando-se diferentes métodos, o que explica a diferença dos dados obtidos entre diferentes grupos de pesquisa (Hammer *et al.*, 1998).

Entretanto, alguns produtos, como aqueles preparados a partir de peso seco, permitem comparação, embora cautelosa, dos resultados. Para um refinamento da metodologia, e aumentar a reprodutibilidade dos resultados, deve-se levar em consideração, além das variações específicas de cada planta, parâmetros como região, estação climática e partes do vegetal coletadas, bem como a forma de preparação e duração dos estoques dos produtos. Deve-se esclarecer ainda que, embora os resultados obtidos sejam considerados como preliminares, dadas as dificuldades e peculiaridades de padronização nesse tipo de pesquisa, aqueles que evidenciaram atividade inibitória do crescimento bacteriano já atingiram parte dos objetivos propostos. Além da importância da atividade inibidora em si, que abre perspectivas para investigações posteriores, criou-se condição para o uso de concentrações sub-inibitórias permitindo avaliar, a seguir, a ação desses produtos sobre o fluxo gênico, isto é, sobre a transferência de genes de resistência, localizados em plasmídios R conjugativo, para as linhagens receptoras, a partir da alteração da frequência dos transconjugantes. Obviamente, que os produtos que não evidenciaram efeito inibitório poderiam ser usados também com o mesmo propósito, uma vez que não se espera relação direta e obrigatória entre as duas atividades, por serem fenômenos diferentes, podendo a inibição da transferência ocorrer em qualquer fase da conjugação.

Apesar da diversidade nos métodos de obtenção dos produtos, os valores das CIM foram medidos pela percentagem dos volumes dos estoques originais dos produtos em TSB (com exceção de *A. sativum* que foi preparado em Mueller-Hinton) que variaram de 15 a 40%.

Alguns produtos testados não evidenciaram atividade inibitória como *C. arabica* descafeinado e *Ginkgo biloba*. O teste com *C. arabica* descafeinado (100 mg/ml) foi feito em placa, por "spot", e em caldo, e sempre se mostrou ineficiente, ao contrário do café com cafeína que mostrou atividade inibitória. Entretanto, não se pode afirmar que seja a cafeína o produto inibidor presente no café (cafeinado), uma vez que o processo de descafeinização envolve a perda de muitas outras substâncias além da cafeína. *Ginkgo biloba* também se mostrou ineficiente até a 75 mg/ml. Cabe ressaltar que o aumento da concentração de *G. biloba* significaria um aumento de partículas em suspensão com a saturação do meio, o que poderia vir a inviabilizar a conjugação por ser um impedimento físico no meio, além de não ter sido encontrado relatos na literatura sobre qualquer atividade antimicrobiana, relatando-se apenas os benefícios que este produto traz às células eucarióticas (Sticher, 1993).

Alguns produtos, entretanto, evidenciaram forte atividade antibacteriana como ocorreu com *Allium sativum* (Tabela 2), cujos dados estão de acordo tanto com o conhecimento científico como popular. Pasteur, na segunda metade do século passado, já havia descrito o grande poder bactericida do alho e desde a antiguidade ele já era usado por soldados para o controle de infecções em ferimentos de guerra. Seu poder antimicrobiano se deve à alicina, um composto sulfurado, que confere ao alho seu odor característico. A alicina só é produzida quando ocorre lesão do tecido vegetal, em consequência da quebra do precursor aliina pela enzima alinase, que estão localizadas em diferentes compartimentos. Esta compartibilização é indicativa de sua função defensiva contra patógenos. Ele detém ainda outras interessantes atividades, como protetor cardiovascular em casos de parada cardíaca, trombose coronariana e arteriosclerose, que são atribuídas à sua capacidade de inibir a

agregação plaquetária (Al-Qattan *et al.*, 1999). A ação de um dente de alho médio pode ser o equivalente a ação de 1% de penicilina.

A própolis também mostrou considerável poder antimicrobiano frente a todas as linhagens bacterianas testadas (Tabela 2), sendo esta característica já muito popular (Fernandes Jr. *et al.*, 1995). Estudos utilizando a própolis de diversas regiões geográficas mostrou que sua atividade biológica independe de sua origem, apesar de sua composição química variar de acordo com o local de coleta, em decorrência das diferentes fontes vegetais utilizadas pelas abelhas. A ação antimicrobiana é creditada principalmente aos flavonóides presentes na própolis – pirocebrin e galangin (Fernandes Jr. *et al.*, 1995; Burdock, 1998), mas outros componentes, tais como ésteres fenólicos, apresentam também tal atividade. Entretanto, quando se compara a ação antimicrobiana de própolis de diversas partes do mundo verifica-se que em algumas regiões um desses componentes só se apresenta em quantidades mínimas (traços), mas mesmo assim a própolis mantém sua atividade, comparável aos que possuem maiores quantidades destas substância. Isto indica que outros princípios ativos da própolis são também responsáveis pela sua atividade biológica, mas que ainda não foram identificados. É importante salientar que nenhum componente já isolado de própolis apresentou atividade antimicrobiana maior do que o extrato de própolis não fracionado (Santos *et al.*, 1999; Kujungiev *et al.*, 1999). Os resultados da CIM de própolis frente às linhagens testadas variaram de 10 %v/v (17.6 mg/ml) a 20 %v/v (35.2mg/ml). O que está em discordância com a literatura, que apresenta resultado que variam de 3.3mg/ml a 23.1mg/ml, frente a bactérias Gram positivas e negativas (Burdock, 1998). Mas por outro lado eles concordam com dados da literatura que mostram uma maior sensibilidade à própolis das bactérias Gram positivas quando se compara com as Gram negativas. Deve-se ressaltar que a *E. coli* p307, portadora de um plasmídeo com marcadores de virulência (fímbria de adesão e toxina), sempre se mostrou mais sensível do que as outras bactérias do mesmo gênero, o que está de acordo com Fernandes Jr. *et al.*, 1995.

Outro produto que possui atividade antimicrobiana reconhecida é o chá preto (*C. sinensis*), apresentando ação inibitória do crescimento frente à *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *Vibrio spp.* e *Pseudomonas spp.*, além ser de fungicida, impedir adsorção viral a células eucarióticas e ser inibidor de hemolisina (Hamilton-Miller, 1995). Entretanto, devido às diferenças de metodologia e forma do composto, os resultados na literatura se mostram conflitantes, necessitando de mais estudos e padronização para a determinação precisa de suas atividades biológicas. A atividade microbiológica do chá preto está relacionada à fração de polifenóis, em especial às catequinas (por destruir o envoltório celular bacteriano) presente no mesmo, já existindo até um composto disponível comercialmente, Sunphenon, derivado de polifenóis do chá, que previne a adesão de *S. mutans* ao dente. Os resultados aqui obtidos mostram uma grande sensibilidade de *S. aureus* ao chá, quando comparado com outras bactérias, o que está de acordo com a literatura (Hamilton-Miller, 1995; Yam, 1998).

A análise panorâmica da atividade de todos os produtos sobre as bactérias testadas (Tabela 2) mostrou algumas evidências interessantes: *S. aureus*, tanto sensíveis como resistentes aos antibióticos são os mais susceptíveis à maioria dos produtos. O dado é relevante uma vez que as linhagens VISA de *S. aureus* tornaram-se resistentes, recentemente, à vancomicina, último antimicrobiano para o qual era sensível (Aubry-Damon & Courvalin, 1999). Outro dado interessante é a maior sensibilidade da linhagem *E. coli* p307, sabidamente patogênica, quando comparada com outras linhagens de *E. coli* (Tabela 2). Este resultado pode indicar que o uso de alguns destes produtos naturais não destruiria o equilíbrio da microbiota normal, o que é importante no estabelecimento de uma infecção, abrindo perspectivas para a realização de novos experimentos *in vitro* e *in vivo* envolvendo outros representantes da população bacteriana intestinal.

Em uma comparação intra-genérica, observou-se que para o gênero *Pseudomonas*, ambas as quatro linhagens possuem CIM semelhantes para a

maioria dos produtos, sendo que para *C. sinensis* a linhagem padrão é duas vezes mais resistente do que a linhagem selvagem (Gráfico 1). Quanto ao *Staphylococcus*, a linhagem padrão diferiu da selvagem *S. aureus* 50 em cinco produtos; apresentando a primeira uma CIM maior para *Arctium* sp e *C. sylvestris* em cerca de 5%, enquanto a segunda uma CIM maior para *P. granatum* e *P. major*, também em 5%. Mas frente à *Chamomilla* sp., apresentou uma CIM duas vezes maior (Gráfico 2). No gênero *Shigella*, observou-se uma diferença de CIMs em sete produtos (Gráfico 3), sendo que na maioria dos casos foi a linhagem selvagem *S. flexneri* 4 que se mostrou mais resistente; mas qualquer que seja o produto esta diferença não ultrapassou os 5%. No Gráfico 4 estão representados os resultados das CIMs dos produtos frente à linhagem de *S. typhimurium* MG 031, curada ou não, e seus transconjugantes.

De uma forma geral, os resultados indicam um grande potencial para utilização da atividade antimicrobiana da maioria dos produtos testados contra uma diversidade de bactérias, entretanto, requerendo pesquisas posteriores para maior padronização e isolamento dos princípios ativos responsáveis por tal atividade. Provavelmente, mais de uma fração ou substância pura de cada planta, como ocorre com o própolis (Burdoch, 1998), estejam envolvidos com a atividade antimicrobiana.

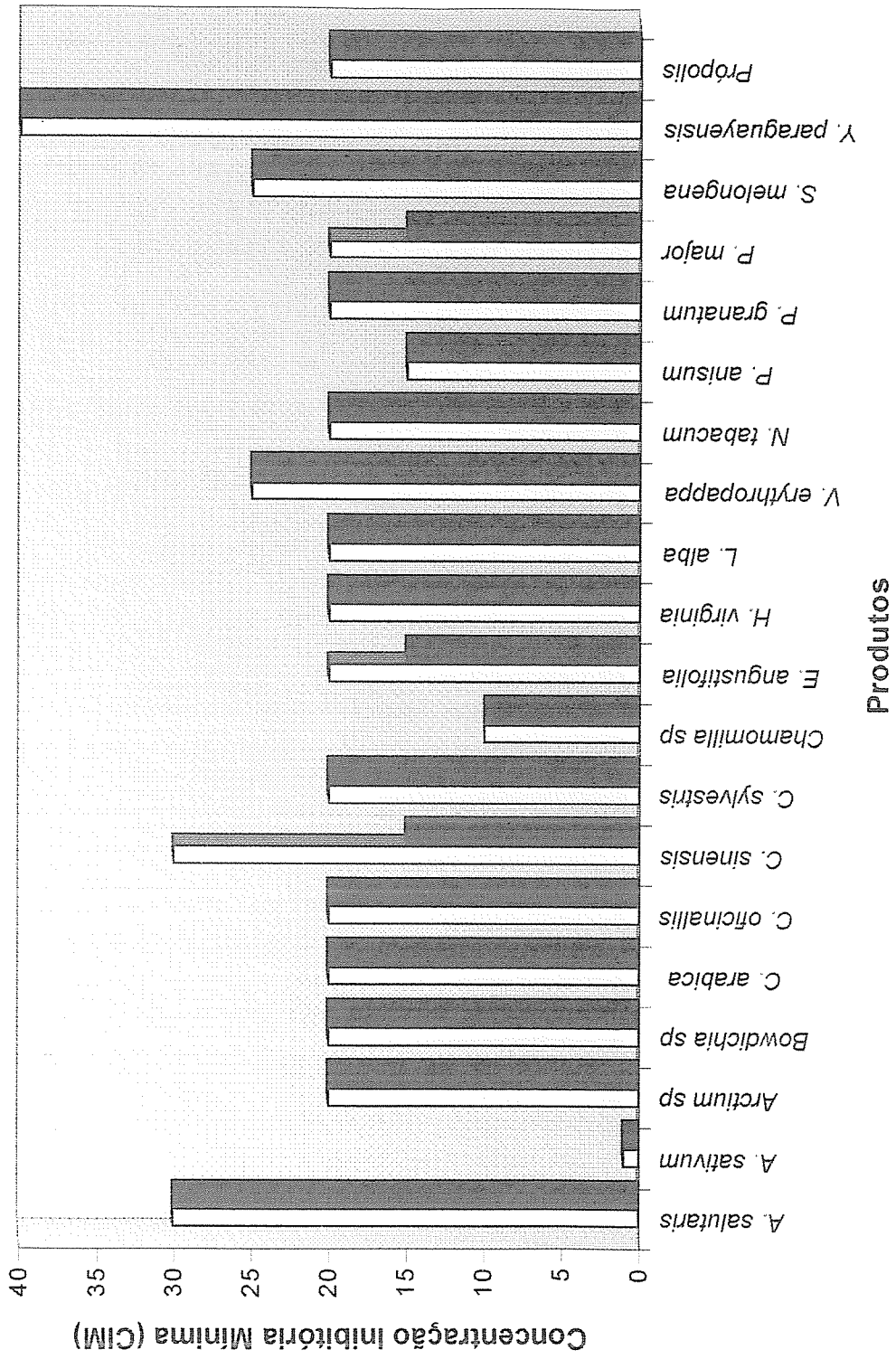
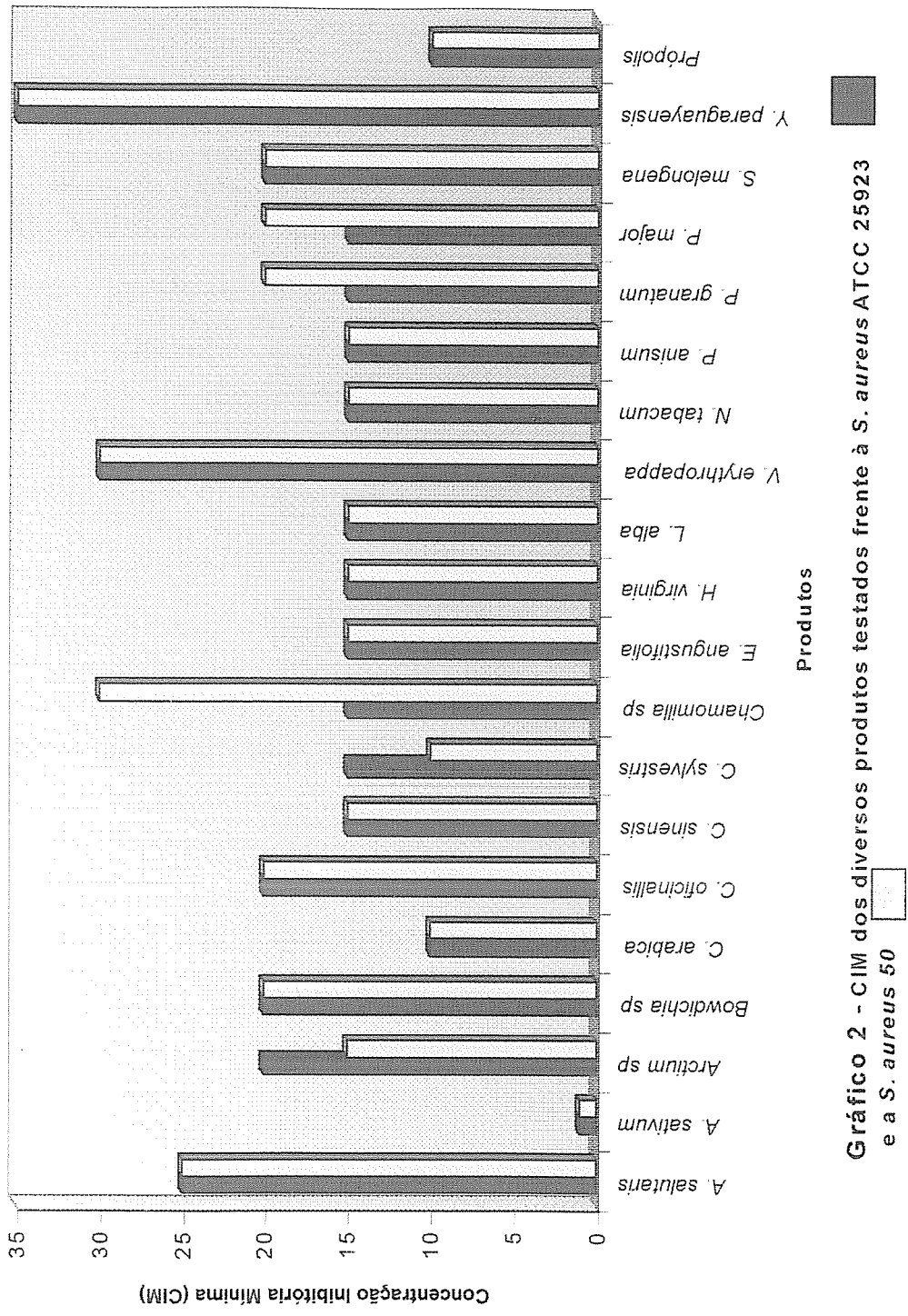


GRÁFICO 1 - CIM dos diversos produtos testados frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* 1



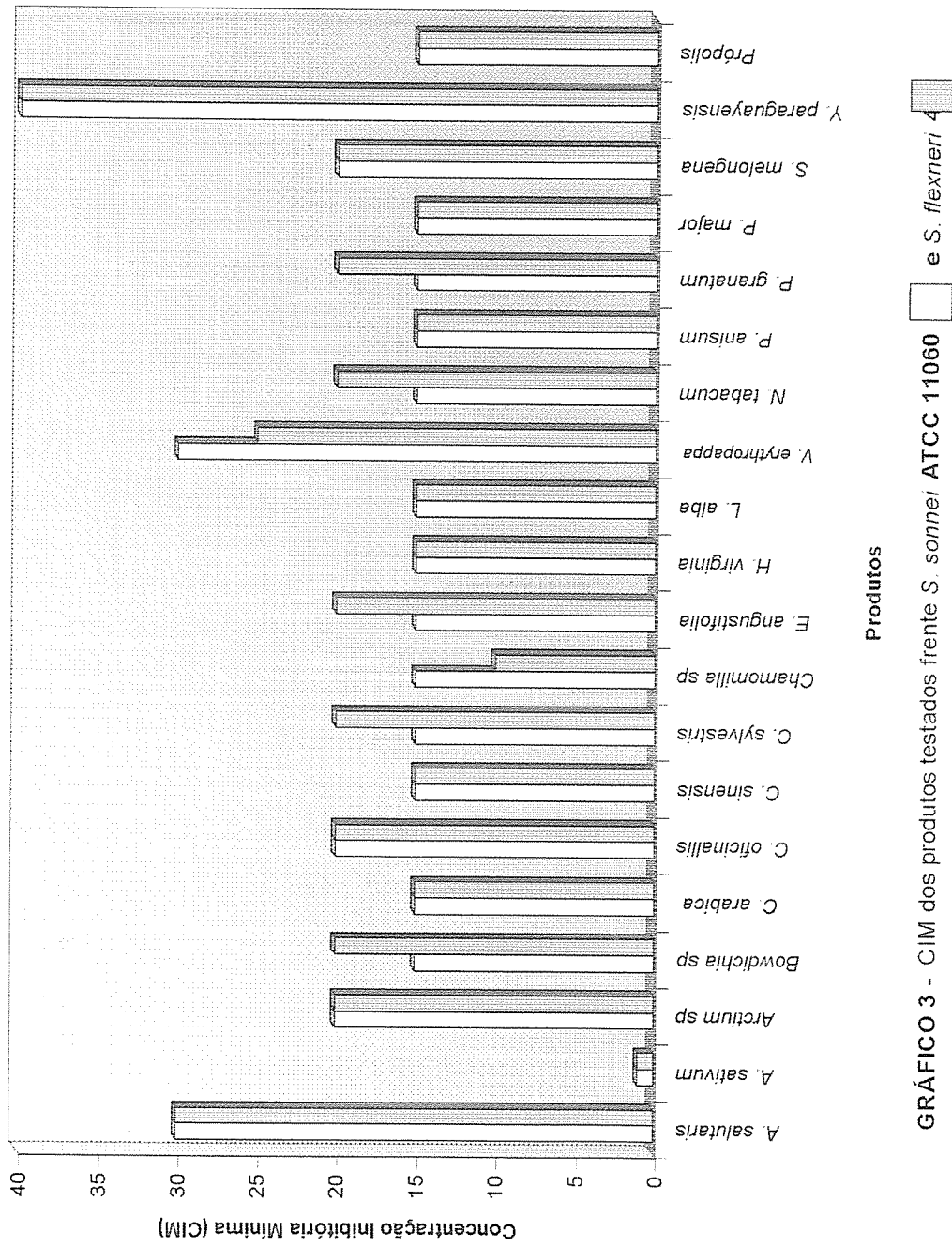


GRÁFICO 3 - CIM dos produtos testados frente *S. sonnei* ATCC 11060 e *S. flexneri* 4

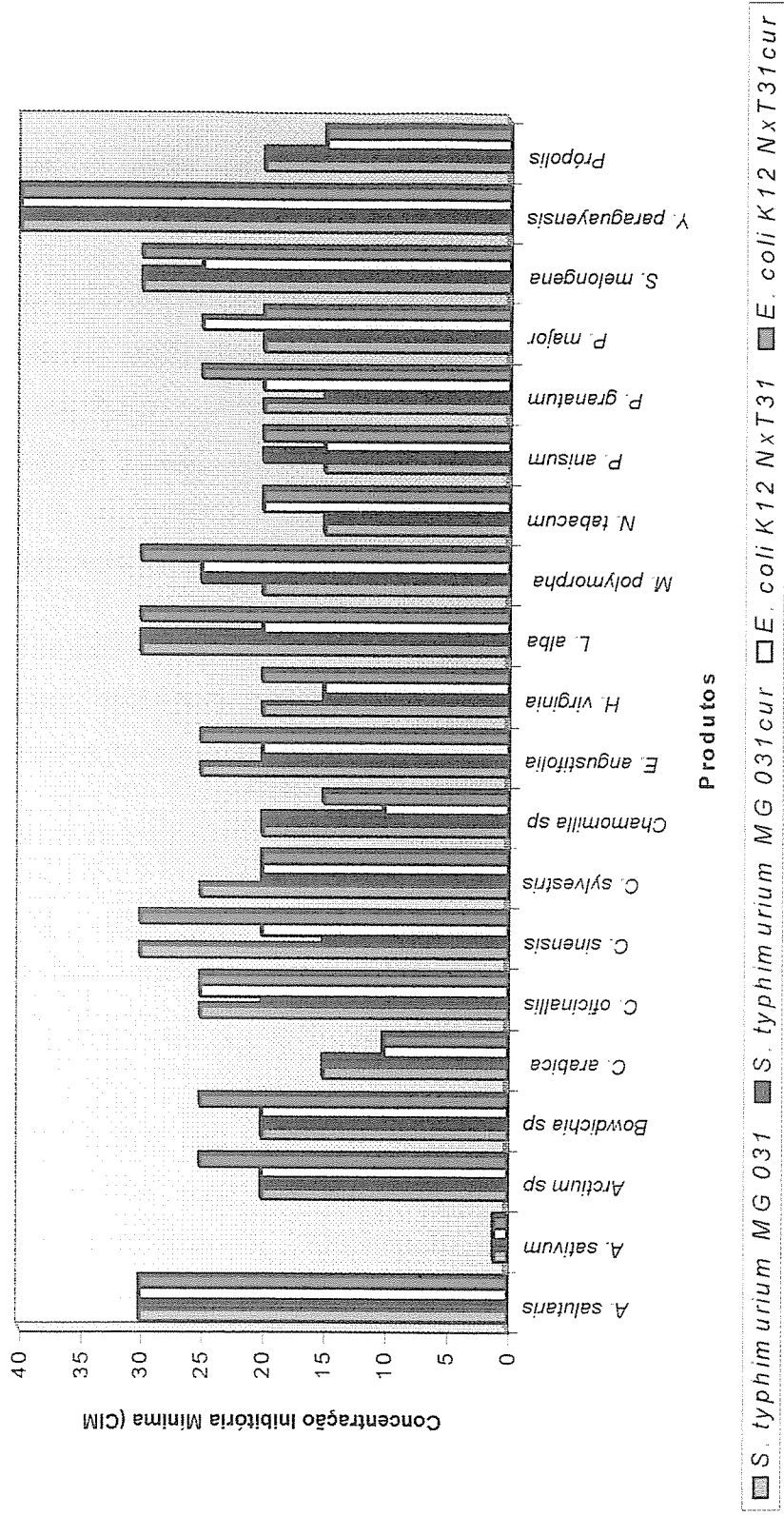


GRÁFICO 4 - CIM da linhagem de *S. typhimurium* e seus transconjugantes, curadas ou não

Perspectivas abertas quanto à determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM):

investigar o modo de ação dos produtos testados na determinação da susceptibilidade;

fracionar os extratos para determinação dos princípios ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Deve-se informar que já se encontra em andamento o estudo de sementes de *Carica papaya* (mamão) e de *P. granatum* (romã), envolvendo o pessoal deste laboratório em associação com a professora Jaqueline Aparecida Takashi, do Departamento de Química do ICEX da UFMG;

estudar e padronizar os diversos métodos e técnicas de obtenção de extratos (oleoso, alcoólico, aquoso, puro), e meios para determinação da CIM, relatados na literatura, para tornar os resultados mais comparáveis.

3.2 - Estudo do crescimento bacteriano em concentrações sub-inibitórias de alguns produtos

Observa-se que as concentrações sub-inibitórias dos produtos (*G. biloba* não apresentou atividade inibitória mesmo nas maiores concentrações utilizadas) permitiram o crescimento das diversas linhagens bacterianas testadas, com pequena ou nenhuma interferência sobre a população bacteriana, como um todo (resultados não apresentados). Este dado serviu para estabelecer a concentração sub-inibitória que seria usada nas culturas da linhagem doadora, receptora e mista, durante os experimentos para determinar a possível influência do produto sobre a transferência gênica (plasmídios R), por conjugação de: *S. typhimurium* ED040 (doadora com plasmídio R conjugativo, que codifica resistência para tetraciclina e produção de colicina) com a receptora *E. coli* K12 Nx; e *E. coli* BH

100, doadora (com plasmídeo R conjugativo que codifica resistência à tetraciclina e outras drogas) com a receptora *E. coli* K12 Sm.

3.3 - Atividade dos produtos frente à mudança de pH

Considerando a necessidade e oportunidade de se efetivarem *in vivo* (camundongos livres de germes – "germ free") os testes até agora realizados "in vitro", tentou-se reduzir o pH dos produtos ensaiados, que apresentaram pH entre 4,5 e 6,5 (Tabela1), para cerca de pH 1,5 por uma hora a 37°C, e retornou-se ao pH 6,5 – 7, logo após, numa simulação da passagem desses produtos pelo estômago e intestino do homem e outros animais. Os resultados foram úteis na escolha dos produtos e bactérias a serem submetidas aos teste *in vivo* na próxima fase experimental.

Foram realizados dois testes, um com a concentração inibitória e outro com a concentração sub-inibitória dos produtos utilizados nos experimentos de conjugação, exceto *A. sativum*. Não foi possível em ambos os casos, com a técnica utilizada, detectar alteração da atividade dos produtos anteriormente encontrada.

3.4 - Detecção de "sobreviventes" bacterianos pela técnica da "placa gradiente"

Dos produtos testados, quatro selecionaram sobreviventes de primeiro passo em placa gradiente, para pelo menos uma das linhagens testadas (Quadro 10). Após 72 horas de incubação era possível a visualização das

colônias sobreviventes que inicialmente eram muito pequenas. Dos produtos escolhidos dois não selecionaram sobreviventes resistentes em nenhuma das quatro linhagens bacterianas utilizadas (Quadro 10). Não foram observados variantes de segundo passo nas placas gradiente com maior concentração dos produtos, em nenhum dos experimentos. Uma segunda variação genética pode não ocorrer ou ser letal nas condições experimentais usadas, uma vez que muito dos grupos de substâncias ou frações que compõem os extratos vegetais devem atuar em alvos estratégicos, tanto em nível de envoltório, como internamente na economia/fisiologia da célula bacteriana. Experimentos utilizando concentrações menores devem ser realizados, uma vez que neste caso podem dar resultado positivo.

Em placas gradientes contendo *P. granatum* só ocorreu a visualização de variantes de *S. typhimurium* ED040, com cerca de 13 colônias puntiformes, tendo havido crescimento confluyente (basal) até aproximadamente um terço da placa, e de *E. coli* K12 Nx, com cerca de 20 variantes, cujo crescimento confluyente (ou basal) ocupou cerca de um terço da placa.

Em meio contendo até 20% de própolis só ocorreu a visualização de variantes em placas semeadas com *S. typhimurium* ED 040, com cerca de 7 variantes puntiformes, onde seu crescimento confluyente se deu até aproximadamente um terço da placa, e com *E. coli* K12 Nx, com cerca de 40 variantes, também ocupando um terço da placa (Quadro 10, Figura 5). Para ambos os produtos ocorreu a formação no crescimento basal de uma borda lisa sem variantes para as linhagens de *E. coli* Sm e *E. coli* BH100.

QUADRO 10

Obtenção de "sobreviventes" bacterianos resistentes em placa gradiente frente a diversos produtos

Produto	Concentração da placa gradiente (% v/v)		Variantes em placa gradiente			
	1º passo	2º passo	<i>E. coli</i> K12 Sm	<i>E. coli</i> K12 Nx	<i>E. coli</i> BH100	<i>S. typhimurium</i> ED 040
<i>A. salutaris</i>	0→20	0→40	-	-	+	-
<i>A. sativum</i>	0→5		-	-	-	-
<i>C. arabica</i>	0→5	0→10	-	-	+	-
<i>P. granatum</i>	0→20	0→30	-	+	-	+
<i>Y. paraguayensis</i>	0→50		-	-	-	-
Própolis	0→20	0→30	-	+	-	+

Em placas contendo *C. arabica* só ocorreu a liberação de variantes para *E. coli* BH100 (Quadro 10). As demais linhagens só apresentaram crescimento confluyente de bordas lisa, não apresentando variantes. Entretanto, como a borda do crescimento se mostrava diferenciada, mais espessa do que o restante, foi feito um inóculo proveniente dessa região, como também os variantes de *E. coli* BH 100, os quais foram submetidos ao segundo passo. Na área de menor concentração ocorreu crescimento confluyente de *E. coli* BH 100 em cerca de um quarto da placa, sem, entretanto, a liberação de novos variantes.

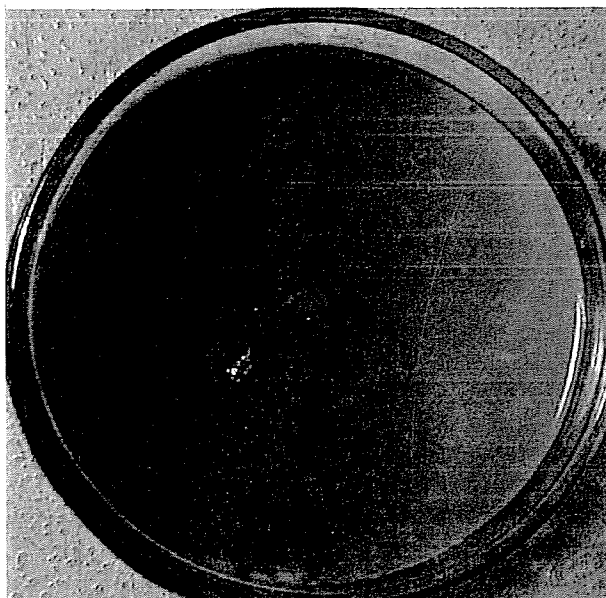


FIGURA 5 - Placa gradiente de própolis da linhagem *E. coli* K12 Nx

Em placas contendo *A. salutaris* ocorreu a liberação de variantes somente para *E. coli* BH100. As colônias distantes da borda foram utilizadas preferencialmente para serem semeadas em placas com maior concentração de produto (2º passo). Todas as outras linhagens cresceram confluentemente, ocupando quase toda a placa. Nas placas de *A. salutaris* semeadas com *S. typhimurium* ED 040, a borda do crescimento tinha a forma de franja, sem, entretanto, liberação de variantes, o mesmo ocorrendo com *E. coli* K12Nx. Para *E. coli* K12 Sm só ocorreu um pequeno crescimento na região de menor concentração do produto na placa.

As linhagens de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* 50 e *P. aeruginosa* 1 também foram submetidas a este experimento, entretanto não se verificou o isolamento de nenhum variante, frente a qualquer produto.

Deve-se esclarecer que, em todos os experimentos placas controle foram utilizadas, e embora não tenham sido observados variantes de 2º passo, a partir dos primeiros variantes, para nenhum dos produtos testados, novas tentativas devem ser feitas. Mas existe a possibilidade dessas alterações serem efetuadas.

Os dados obtidos, embora preliminares, são extremamente, originais e relevantes: originais porque é a primeira vez que são descritos variantes resistentes ou sobreviventes a extratos vegetais e própolis (até onde se teve acesso à literatura), e relevantes porque evidencia que ao lado da ação inibitória desses produtos testados, o que representa um enorme potencial para aplicação, já existem variantes, raros, mas suficientes para a sobrevivência da população bacteriana nesses ambiente.

Estes experimentos abrem perspectivas para:

a repetição do segundo passo, em concentrações menores do que as usadas, para aqueles produtos onde sobreviventes de primeiro passo foram detectados;

repetição do primeiro passo em placa gradiente de *A. sativum* e outros produtos, em concentrações menores do que as usadas neste trabalho.

3.5 - Pesquisa da reversão fenotípica da susceptibilidade bacteriana a antibióticos após o crescimento em meio com *Allium sativum* e *Punica granatum*

A Tabela 3 mostra valores da CIM de diversas drogas frente à oito linhagens sem exposição ao produto, em caldo Müeller-Hinton, excetuando-se *S. aureus* 37 para o que utilizou-se caldo nutriente.

As concentrações utilizadas foram escolhidas de modo a permitir o crescimento de todas as linhagens consideradas resistentes para dado antimicrobiano, embora apresentassem diferentes valores de CIM.

TABELA 3

CIM das linhagens determinadas em caldo Müller-Hinton

Linhagens	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>P. aeruginosa</i> 1	Ap1024; Cm128; Sm1024, Tc16, Pen1024
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Ap1024, Cm160, Sm 16 , Tc16, Pen1024
<i>S. aureus</i> 37*	Ap128, Cm64, Sm1024, Pen1024, Tc128
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Sensível aos antimicrobianos utilizados (≤ 16)
<i>E. coli</i> O:157	Sensível aos antimicrobianos utilizados (≤ 16)
<i>E. coli</i> K12Nx	Sensível aos antimicrobianos utilizados (≤ 16)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sensível aos antimicrobianos utilizados (≤ 16)
<i>S. typhimurium</i> ED 040	Tc128, sensível aos antimicrobianos utilizados (≤ 16)

* CIM determinada em ágar nutriente, uma vez que os dados originais foram determinados em caldo ágar nutriente, Di Sálvio, 1998.

Para os experimentos de reversão fenotípica foram escolhidos dois produtos, *A. sativum* e *P. granatum*, por sua atividade inibitória, e os resultados em concentrações sub-inibitórias. É importante salientar que usou-se a concentração de 2% de *A. sativum* (v/v) em Caldo Müller-Hinton, por ser a concentração sub-inibitória para as diversas linhagens testadas, enquanto que em TSB a concentração de 1%(v/v) era inibitória para estas mesmas bactérias.

Efeito do *A. sativum*

Experimento 1

Houve reversão fenotípica da linhagem *P. aeruginosa* P1, de sensível para resistente, à Tc, quando tratada com *A. sativum*. Esta é uma reversão importante pois passou a conferir resistência à 100 $\mu\text{g/ml}$, que é um nível

clínico de resistência, e representa cerca de seis vezes a CIM original para esta linhagem, frente a essa droga. Em relação aos demais antibióticos investigados (Ap, Cm, Pen e Sm) esta linhagem manteve seu perfil de susceptibilidade. *S. typhimurium* ED 040 (Ap^S e Sm^S) reverteu de sensível para resistente a essas duas drogas, enquanto a reversão de resistente para sensível só ocorreu para *S. aureus* 37, para Cm, Sm, Pen e Tc, *S. aureus* ATCC 25923 manteve seu perfil inalterado, ao lado de outras espécies (Tabela 4).

TABELA 4

Bactérias crescidas em caldo Müeller-Hinton com extrato de *A. sativum* 2% v/v por 24 horas a 37°C, semeadas em meio ágar Müeller-Hinton contendo determinadas concentrações de antibiótico para as quais eram originalmente sensíveis (S) ou resistentes (R).

Drogas ¹ (µg/ml)	Bactérias ²															
	P1		P. ATCC		E. ATCC		E. O:157		S. ATCC		S. t. ED		S. a. 37		E. Nx	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
Ap (100)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
Cm (60)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Pen (200)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Sm (150)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Tc (100)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S

1 - Ap - ampicilina; Cm - cloranfenicol; Pen - penicilina; Sm - estreptomina; Tc - tetraciclina

2 - P1 - *P. aeruginosa* 1; P.ATCC - *P. aeruginosa* ATCC 27853; E.ATCC - *E. coli* ATCC 25922; E. O:157 - *E. coli* O:157 H7; S. ATCC - *S. aureus* ATCC 25923; S. t. ED - *S. typhimurium* ED 040; S. a. 37 - *S. aureus* 37; E. Nx - *E. coli* K12 Nx^R

R - Resistente à concentração indicada

S - Sensível à concentração indicada

A - antes da exposição ao *A. sativum*

D - depois da exposição ao *A. sativum*

Experimento 2

Quando a cultura bacteriana foi incubada com antibiótico e *A. sativum* simultaneamente, e posteriormente semeada em meio ágar Müeller-Hinton sem antibiótico, detectou-se o fenômeno de reversão de resistente para sensível em

S. aureus 37, apenas para Ap e Tc, enquanto *S. aureus* ATCC 25923 manteve seu perfil inalterado. Neste experimento, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tc^S), *E. coli* k12 Nx (Ap^S e Cm^S) e *S. typhimurium* ED 040 (Sm^S) reverteram de sensível para resistente (Tabela 5).

TABELA 5

Bactéria crescidas em caldo Müeller-Hinton com antibiótico e extrato de *A. sativum* (2% v/v) plaqueado em ágar Müeller-Hinton não suplementado com antibióticos.

Drogas ¹ (µg/ml)	Bactérias ²															
	P1		P. ATCC		E. ATCC		E. O:157		S. ATCC		S. t. ED		S. a. 37		E. Nx	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
Ap (100)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
Cm (60)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R
Pen (200)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
Sm (150)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
Tc (100)	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S

1 - Ap - ampicilina; Cm - cloranfenicol; Pen - penicilina; Sm - estreptomicina; Tc - tetraciclina

2 - P1 - *P. aeruginosa* 1; P.ATCC - *P. aeruginosa* ATCC 27853; E.ATCC - *E. coli* ATCC 25922; E. O:157 - *E. coli* O:157 H7; S. ATCC - *S. aureus* ATCC 25923; S. t. ED - *S. typhimurium* ED 040; S. a. 37 - *S. aureus* 37; E. Nx - *E. coli* K12 Nx^f

R - Resistente à concentração indicada

S - Sensível à concentração indicada

A - antes da exposição ao *A. sativum*

D - depois da exposição ao *A. sativum*

Efeito de *P. granatum*

Experimento 1

Neste experimento, *S. aureus* ATCC 25923 (Tc^S) e *S. typhimurium* ED 040 (Sm^S) reverteram de sensível para resistente, sendo que a reversão de resistente para sensível só ocorreu para *S. aureus* 37 mas, para todos os marcadores (Tabela 6).

TABELA 6

Bactérias crescidas em caldo Müller-Hinton com extrato *P. granatum* (5% v/v) por 24 horas a 37°C, semeada em meio ágar Müller-Hinton contendo determinadas concentrações de antibiótico para as quais eram originalmente sensíveis (S) ou resistentes (R).

Drogas ¹ (µ/ml)	Bactérias ²															
	P1		P. ATCC		E. ATCC		E. O:157		S. ATCC		S. t. ED		S. a. 37		E. Nx	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
Ap (100)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Cm (60)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Pen (200)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Sm (150)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Tc (100)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S

1 - Ap - ampicilina; Cm - cloranfenicol; Pen - penicilina; Sm - estreptomicina; Tc - tetraciclina

2 - P1 - *P. aeruginosa* 1; P.ATCC - *P. aeruginosa* ATCC 27853; E.ATCC - *E. coli* ATCC 25922; E. O:157 - *E. coli* O:157 H7; S. ATCC - *S. aureus* ATCC 25923; S. t. ED - *S. typhimurium* ED 040; S. a. 37 - *S. aureus* 37; E. Nx - *E. coli* K12 Nx^f

R - Resistente à concentração indicada

S - Sensível à concentração indicada

A - antes da exposição ao *P. granatum*

D - depois da exposição ao *P. granatum*

Experimento 2

Neste experimento, e *E. coli* ATCC (Pen^S), e *S. typhimurium* ED 040 (Sm^S) reverteram de sensível para resistente, tendo ocorrido a reversão de resistente para sensível só para *S. aureus* 37, para todos os marcadores (Tabela 7).

TABELA 7

Bactérias crescidas em caldo Müeller-Hinton com antibiótico e extrato de *P. granatum* (5% v/v) semeado em ágar Müeller-Hinton não suplementado com antibióticos.

Drogas ¹ (µg/ml)	Bactérias ²															
	P1		P. ATCC		E. ATCC		E. O:157		S. ATCC		S. t. ED		S. a. 37		E. Nx	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
Ap (100)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Cm (60)	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Pen (200)	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Sm (150)	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Tc (100)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S

1 - Ap - ampicilina; Cm - cloranfenicol; Pen - penicilina; Sm - estreptomicina; Tc - tetraciclina
 2 - P1 - *P. aeruginosa* 1; P.ATCC - *P. aeruginosa* ATCC 27853; E.ATCC - *E. coli* ATCC 25922; E. O:157 - *E. coli* O:157 H7; S. ATCC - *S. aureus* ATCC 25923; S. t. ED - *S. typhimurium* ED 040; S. a. 37- *S. aureus* 37; E. Nx - *E. coli* K12 Nx^f

R - Resistente à concentração indicada

S - Sensível à concentração indicada

A - antes da exposição ao *P. granatum*

D - depois da exposição ao *P. granatum*

Observa-se que tanto no procedimento 1 como no 2, *P. granatum* não interferiu no perfil de susceptibilidade em *Pseudomonas*, enquanto, que para *S. aureus* 37 este mostrou-se capaz de reverter toda a resistência múltipla, tornando-a totalmente sensível às concentrações usadas. Tão pouco, não reverteu para resistência em *S. aureus* ATCC 25923. Apresentou o menor número de reversão, em geral, para resistência do que *A. sativum*.

Numa análise geral, os dois produtos testados foram capazes, em alguns casos, de levar à reversão tanto do fenótipo "sensível" para "resistente", como vice-versa. Os dois produtos reverteram o fenótipo de resistente para sensível em *S. aureus* 37, que é uma linhagem MRSA, para todos os antibióticos testados. É sabido que recentemente pesquisadores da Inglaterra relataram que o extrato de *C. sinensis*, o popular chá preto, é capaz de determinar a reversão da resistência de *S. aureus* MRSA, com purificação dos

compostos responsáveis, ao impedir que a bactéria produzisse PBP2', talvez por agir como chaperone da proteína. Este efeito não é letal para a bactéria, mas torna o *S. aureus* MRSA sensível aos β -lactâmicos (Yam *et al.*, 1998). Outros produtos também são citados na literatura como capazes de interferir com as PBPs, entretanto são detergentes não-iônicos tóxicos (Triton-X e Polidocanol), não podendo portanto ser utilizados no tratamento de seres vivos (Komatsuzawa *et al.*, 1994). A indústria farmacêutica está pesquisando a construção de moléculas sintéticas que exibem ação semelhantes às encontradas no chá.

É importante observar que o *S. aureus*, este grande vilão da resistência e um dos principais agentes de infecção hospitalar tem se mostrado susceptível à ação de produtos naturais, como o romã mostrado neste trabalho, e ainda o que sofreu maior número de reversões de resistente para sensível, podendo estes produtos ser uma arma potencial contra estes microrganismos, cujas linhagens VISA tornaram-se resistentes a todos os antimicrobianos hoje disponíveis. Esses dados preliminares sido obtidos *in vitro* deverão ser confirmados em testes *in vivo* para aumentar as chances de aplicação futura, em associação com antibióticos. A grande vantagem desses produtos é serem já amplamente utilizados pela população sem nenhum ou com poucos efeitos colaterais (Yam *et al.*, 1998).

Ao contrário do desejado a reversão encontrada de sensível para resistente, é altamente preocupante e mostra a necessidade de mais estudos da dieta em associação com a prescrição do antibiótico. Um bom exemplo é o que ocorre com a interação da tetraciclina com o leite, uma vez que este antibiótico se complexa com cátions, e ao ser ingerido conjuntamente com o leite forma complexos insolúveis de tetraciclina/cálcio $^{2+}$, que são eliminados junto com as fezes, não exercendo seu papel terapêutico (Nascimento, 1998).

Quando neste experimentos de reversão apenas o produto-teste estava presente no meio líquido, estando o antibiótico no meio sólido (procedimento 1), pôde-se constatar alguns revertentes do fenótipo sensível para resistente, e

outros de resistente para sensível, evidenciando a possível ação dos produtos sobre as linhagens, já que a quantidade do produto presente no 'spot' era provavelmente insuficiente para inativar a droga presente na placa.

Os dados obtidos com o procedimento 2 sugerem, mais uma vez, que os produtos estejam agindo sobre as linhagens e não sobre as drogas, isto porque, em um mesmo experimento um determinado produto não reverteu o perfil de susceptibilidade a um mesmo antibiótico para todas as linhagens testadas. Caso houvesse ocorrido a inativação significativa do antibiótico no caldo, esperava-se que todas as linhagens revertissem seu fenótipo de sensível para resistente no mesmo experimento.

Outros experimentos realizados neste laboratório mostram resultados semelhantes. Testes utilizando ácido ascórbico, sementes de *Carica papaya* (mamão) e *Zingiber officinale* (gengibre) mostraram tanto a reversão de sensibilidade para resistência, quanto o oposto.

Todos estes dados, embora preliminares e obtidos em experimentos *in vitro*, mostram a instabilidade dos sistemas bacterianos quanto à presença de substâncias que podem influenciar seja levando à resistência ou revertendo à sensibilidade, com possível repercussão na antibioticoterapia. Por isso, torna-se essencial a realização de experimentos *in vivo*, usando, por exemplo, camundongos livres de germes e também com microbiota já estabelecida.

Estes experimentos abrem perspectivas para:

determinar novamente a CIM dos antibióticos frente às linhagens testadas, após a exposição dos produtos;

pesquisar os mecanismos envolvidos na reversão;

pesquisar e tentar isolar os componentes vegetais responsáveis por esta atividade.

3.6 - Influência de alguns produtos sobre a frequência de transferência de plasmídios R, por conjugação

Apesar de terem sido usadas outras linhagens bacterianas doadoras e receptoras decidiu-se relatar preferencialmente, pela alta frequência de transferência no cruzamento controle (sem o produto teste), e reprodutibilidade, os resultados obtidos com a conjugação da linhagem selvagem *S. typhimurium* ED 040 com *E. coli* K12 Nx, receptora. Esta linhagem doadora é relevante por possuir um plasmídio R que codifica, simultaneamente, resistência à tetraciclina, colicina Ib e patogenicidade para camundongo (Sant'Anna *et al.*, 1995). A linhagem *E. coli* K12 Nx é resistente ao ácido nalidíxico, devido à mutação cromossômica em *gyrA*, que codifica DNA girase. Para os testes, realizados em triplicata, utilizou-se a concentração sub-inibitória dos produtos, conforme Tabela 8.

A partir destes estudos preliminares, que evidenciaram resultados tão relevantes e onde foram utilizadas intencionalmente produtos de grande uso popular, abrem-se perspectivas para continuação das pesquisas e refinamento da metodologia para purificação de frações vegetais. Neste último caso, deve-se estar atento uma vez que os resultados positivos obtidos podem resultar da ação sinérgica de mais de um componente. É essencial ainda, para a continuidade desta linha de pesquisa, a realização de experimentos *in vivo* (com camundongos por exemplo) para a confirmação dos resultados *in vitro*, uma vez que se tem como objetivo a aplicação futura dos dados obtidos, numa tentativa de diminuir a frequência do fluxo de genes de resistência entre bactérias.

TABELA 8

Concentrações sub-inibitória dos produtos, em TSB*, usadas nos cruzamentos entre *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx, e entre *E. coli* BH100 e *E. coli* K12 Sm

Produto	Concentração sub-inibitória %
Controle (TSB)	-
<i>A. salutaris</i> *	20
<i>A. sativum</i>	2
<i>Ginkgo biloba</i>	70
<i>P. granatum</i>	2.5
<i>V. erythropappa</i>	20
<i>Y. paraguayensis</i>	10
Própolis	5

* Usou-se caldo Müeller-Hinton para *A. sativum*

Foram encontrados poucos relatos da ação de produtos naturais na transferência gênica, exceto com cafeína e derivados de *Cannabis sativa*. Entretanto, ainda não foi esclarecido como estes produtos interferem na conjugação (Molnar *et al.*, 1986; Tiagunenko *et al.*, 1975). Outros estudos foram direcionados para esta área, mas utilizando substâncias que não poderiam ser administradas a seres vivos, tais como espermina, que provavelmente interfere nos primeiros passos da recombinação, pela formação de heteroduplex na receptora (Bialkowska-Hobrzanska & Kunicki-Goldfinger, 1979), compostos químicos bioativos – histonas, EDTA, lisozima, metacil e pentoxil, que em muitos casos são, na verdade, agentes curagênicos (Levchenko *et al.*, 1975; Glatman *et al.*, 1977). Existem pesquisas até com antibióticos já utilizados e biocidas (Moroz *et al.*, 1975; Al-Masaudi & Russel, 1991; Scazzocchio *et al.*, 1988).

Dentre os produtos testados, nos cruzamentos entre *S. typhimurium* ED 040 e *E. coli* K12 Nx a própolis foi capaz de inibir completamente o fluxo gênico e ao mesmo tempo manter quase o mesmo tamanho da população de células viáveis do controle sem o produto (Tabela 9, Gráfico 6). Entretanto, a influência da própolis na conjugação variou de acordo com as condições de tratamento. Quando o produto era adicionado no momento da conjugação (cultura mista) ocorreu a inibição total de transferência somente quando pelo menos a doadora havia sido previamente tratada. Mas de uma forma geral ambas, doadora e receptora, mesmo quando tratadas em culturas individuais, sofreram influência forte da exposição à própolis (Tabela 9, Gráfico 6). Testes utilizando *E. coli* BH 100 e *E. coli* K12 Sm também foram realizados, com variações do tratamento das linhagens. No caso de própolis observou-se que independentemente das condições de tratamento esta sempre abolia a transferência de plasmídios (Tabela 10). Entretanto, deve-se levar em consideração que neste caso a freqüência de transconjugantes no controle é muito menor que no cruzamento anterior.

TABELA 9

Conjugação de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx em presença de 5% de própolis

Exposição (combinações)	Freqüência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	10 ¹
D ⁺ R ⁺	0
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	10 ²
D ⁺ R ⁺	10 ¹
D ⁺ R ⁺	0

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto

D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

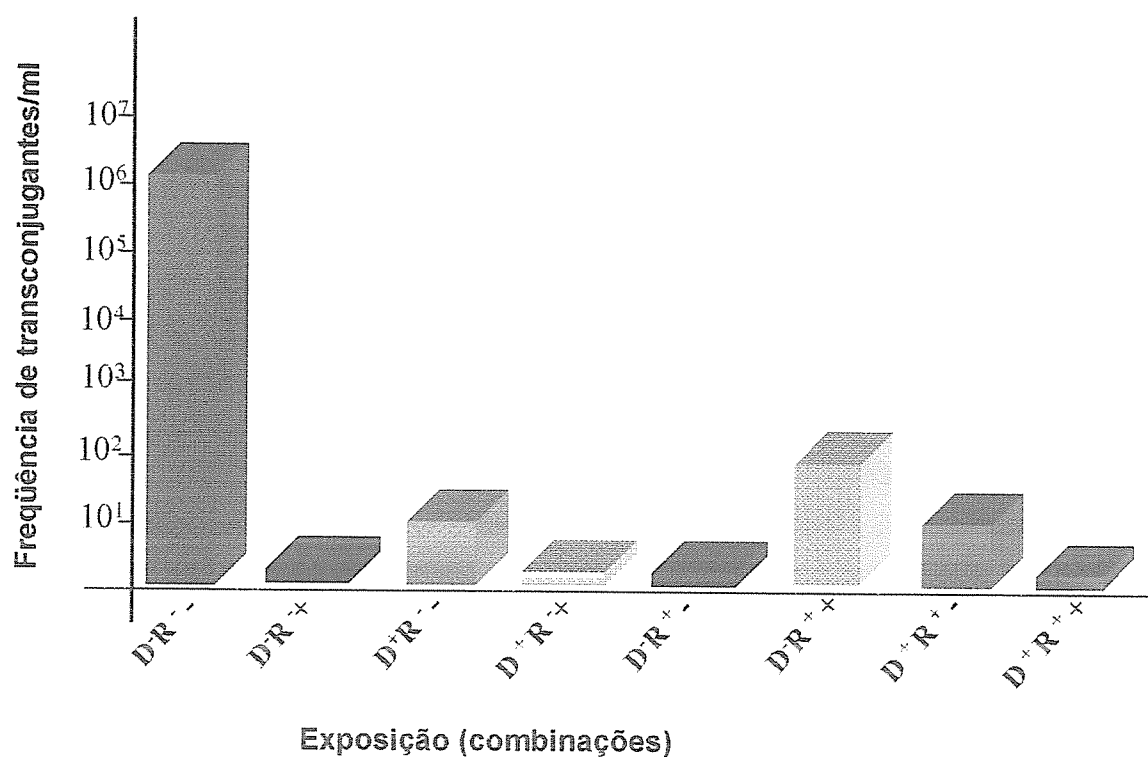


Gráfico 5 - Frequências de transconjugantes do cruzamento entre *S. typhimurium* ED 040 e *E. coli* k12 Nx, em meio TSB, em ausência ou presença de 5% de própolis (D⁺R⁺+ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto; D⁻R⁻- = ausência de exposição ao produto).

TABELA 10

Conjugação de *E. coli* BH100 e *E. coli* K12 Sm em presença de 5% de própolis

Exposição (combinações)	Freqüência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁴
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	0
D ⁺ R ⁺	0
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	0
D ⁺ R ⁺	0
D ⁺ R ⁺	0

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto

D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

P. granatum foi capaz de reduzir a freqüência de conjugação em cerca de 1000 vezes, enquanto que *A. salutaris* e *V. erythropappa* reduziram em até 100 vezes esta freqüência. Os produtos, *Ginkgo biloba* e *Y. paraguayensis* não reduziram a freqüência de transconjugantes. O *A. sativum*, cujo o experimento foi realizado em caldo Müller-Hinton, foi capaz de reduzir em até 1000 vezes a freqüência de transconjugantes (Gráfico 7), como *P. granatum* em TSB. Deve-se ainda salientar que em nenhum dos experimentos os produtos testados foram capazes de aumentar a freqüência de transconjugantes.

Outros produtos também foram testados nas combinações de exposição aos produtos. Na Tabela 11 e 12 estão os resultados obtidos para a exposição ao *A. salutaris*. Nas conjugações envolvendo de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx, observa-se queda de até 10⁶ vezes, na freqüência de transconjugantes, quando a receptora é exposta previamente ao *A. salutaris*, sugerindo, assim, que talvez aja interferência do produto na entrada e/ou

estabilização do plasmídio na receptora. A situação onde houve menor interferência na conjugação ocorreu quando apenas a doadora foi exposta ao produto, resultado que se repetiu na conjugação de *E. coli* BH100 e *E. coli* K12 Sm. Os resultados destes dois experimentos mostram que para se avaliar melhor a interferência de um produto na conjugação, quando ocorre queda da frequência de transconjugantes, a linhagem de *S. typhimurium* ED 040 é mais indicada do que a *E. coli* BH100, pela sua maior frequência de transferência no controle, se, exposição aos produtos.

Assim sendo, as conjugações em presença de *Ginkgo biloba*, *Y. paraguayensis*, *P. granatum* e *V. erythropappa* foram feitas só se utilizando a linhagem de *S. typhimurium* ED040 como doadora.

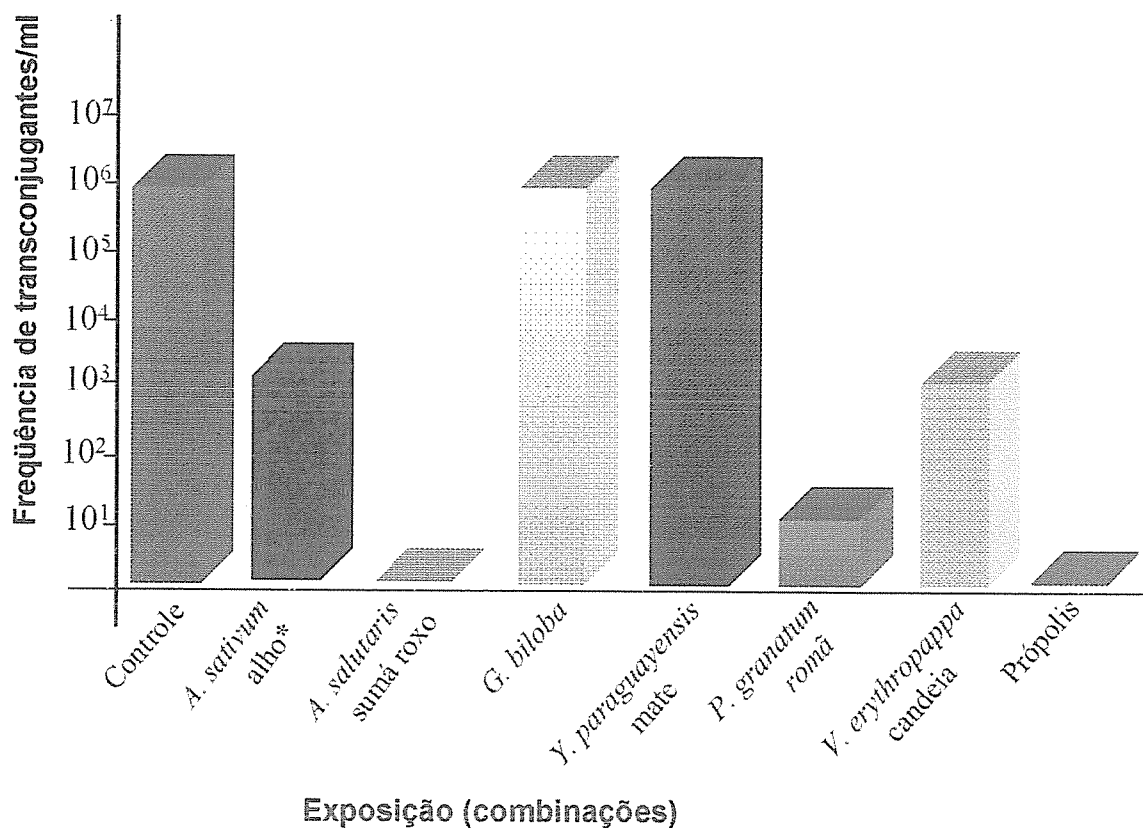


Gráfico 6 - Frequências de transconjugantes do cruzamento entre *S. typhimurium* ED 040 e *E. coli* k12 Nx, em meio TSB, em ausência ou presença de produtos naturais (**A. sativum* em caldo MH; D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto; D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto).

TABELA 11

Conjugação de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx em presença de 20% de *A. salutaris*

Exposição (combinações)	Frequência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ²
D ⁺ R ⁻	10 ³
D ⁺ R ⁺	10 ²
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	10 ²
D ⁺ R ⁺	0

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto
D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

TABELA 12

Conjugação de *E. coli* BH100 e *E. coli* K12 Sm em presença de 20% de *A. salutaris*

Exposição (combinações)	Frequência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁴
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	10 ²
D ⁺ R ⁺	0
D ⁻ R ⁻	0
D ⁻ R ⁺	0
D ⁺ R ⁻	0
D ⁺ R ⁺	0

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto
D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

TABELA 13

Conjugação de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx em presença de 70% de *G. biloba*

Exposição (combinações)	Freqüência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ⁶
D ⁺ R ⁻	10 ⁶
D ⁺ R ⁺	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ⁶
D ⁺ R ⁺	10 ⁶
D ⁺ R ⁻	10 ⁶
D ⁺ R ⁺	10 ⁶

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto
D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

Nas Tabelas 13 e 14 observou-se que nem o extrato de *G. biloba* nem o de *Y. paraguayensis* alteraram, respectivamente, as freqüências de transconjugantes, em quaisquer das combinações realizadas. Deve-se lembrar que *G. biloba* não exerceu nenhuma atividade antimicrobiana, e *Y. paraguayensis* tem um pequeno efeito sobre a viabilidade das linhagens testadas, nas concentrações utilizadas.

TABELA 14

Conjugação de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx em presença de 10% de *Y. paraguayensis*

Exposição (combinações)	Freqüência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ⁶
D ⁺ R ⁻	10 ⁶
D ⁺ R ⁺	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ⁶
D ⁺ R ⁻	10 ⁶
D ⁺ R ⁺	10 ⁶

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto

D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

A Tabela 15 mostra a influência do extrato alcoólico de *P. granatum*, que provocou uma queda na freqüência de transconjugantes de até 10⁵ vezes, quando tanto a doadora quanto a receptora foram expostas previamente ao produto, e a conjugação realizada também em presença do mesmo. As freqüências mostram também que quando a conjugação era realizada em presença de *P. granatum*, e uma das linhagens, doadora e/ou receptora, havia sido exposta, ocorria uma queda ainda maior na freqüência (de 10 vezes). Portanto, ambas linhagens parecem ser afetadas igualmente.

TABELA 15

Conjugação de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx em presença de 2.5%
de *P. granatum*

Exposição (combinações)	Freqüência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ³
D ⁺ R ⁻	10 ³
D ⁺ R ⁺	10 ²
D ⁻ R ⁺	10 ³
D ⁺ R ⁺	10 ²
D ⁺ R ⁻	10 ²
D ⁺ R ⁺	10 ¹

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto
D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

Em relação à *V. erythropappa* também observou-se uma queda no número de transconjugantes (Tabela 16). Quando o produto estava ausente da cultura mista, vê-se uma queda de 100 vezes na freqüência de transconjugantes. Sendo a combinação de doadora não exposta, receptora e cultura mista expostas (D⁻R⁺) a que foi mais afetada, com uma redução de 10000 vezes na freqüência.

TABELA 16

Conjugação de *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx em presença de 20% de *V. erythropappa*

Exposição (combinações)	Freqüência de Transconjugantes
D ⁻ R ⁻	10 ⁶
D ⁻ R ⁺	10 ⁴
D ⁺ R ⁻	10 ⁴
D ⁺ R ⁺	10 ³
D ⁻ R ⁺	10 ⁴
D ⁺ R ⁺	10 ²
D ⁺ R ⁻	10 ⁴
D ⁺ R ⁺	10 ³

* D⁺R⁺ = exposição da doadora, receptora e cultura mista ao produto

D⁻R⁻ = ausência de exposição ao produto

Para confirmação da presença de plasmídios determinantes da resistência à tetraciclina e produção de colicina foram analisados 30 transconjugantes provenientes de conjugação, entre *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx, cuja cultura mista foi exposta ou não à *P. granatum*, frente à linhagem *E. coli* 22R80, considerada como sensível à colicina, em duplicata. Ocorreu produção de colicina tanto em condições normais, quanto em presença de romã, com halos de tamanhos equivalentes. Os controles (ambas linhagens cultivadas em presença e ausência do produtos) funcionaram normalmente.

Além disso, algumas linhagens bacterianas foram cultivadas em meio TSB com ou sem *P. granatum* e própolis, e mantiveram o perfil plasmidiano inalterado após extração e eletroforese em gel de agarose, como ocorreu em *S. typhimurium* ED040 e *E. coli* K12 Nx transconjugante. A Figura 6 ilustra a

presença de plasmídio de *P. aeruginosa* 1, exposta ou não à *P. granatum* e própolis.

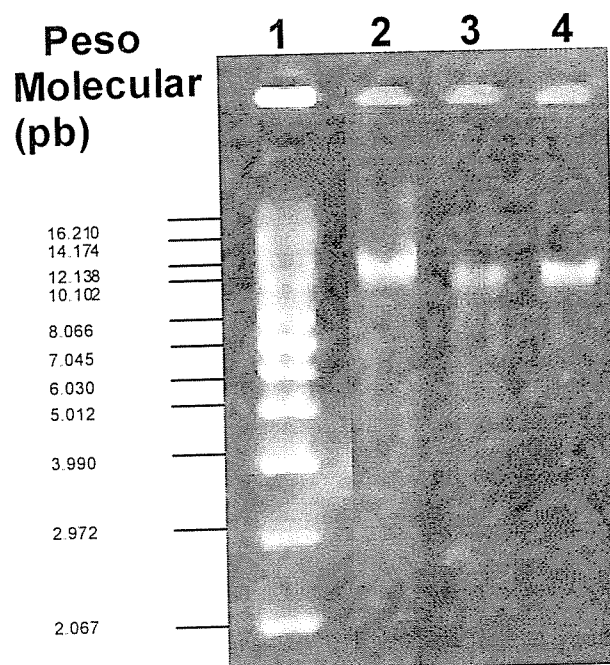


Figura 6 – Perfil plasmidiano de *P. aeruginosa* 1 cultivada em TSB, na presença e ausência de *P. granatum* e própolis.

Canaletas: 1 – “Ladder DNA supercoiled” com 5% de extrato de própolis 2 - controle na ausência de extrato 3 -crescidas com 5% de extrato de própolis 4 - crescidas com 2,5% de extrato de *P. granatum*

A manutenção da frequência das células doadora e receptora nos controles durante todo o experimento, quando na presença dos produtos, concomitantemente com a interrupção ou redução na transferência gênica horizontal, assim como a ausência de cura plasmidiana (Figura 6), sugerem uma possível ação destes produtos em algum ponto do mecanismo de conjugação, desde a formação do *pilus*, pelas células doadoras, ou seus alvos na superfície das células receptoras, e estabilização do par, até a transferência gênica do DNA da doadora para a receptora, que depende de dezenas de genes, da região *tra* do plasmídio, e a expressão fenotípica pela receptora. Por outro lado pode ter havido a transferência do plasmídio R na mesma

freqüência do controle sem o produto, mas, sem a expressão do gene de resistência à tetraciclina, o que levaria à inviabilidade das receptoras.

Os dados até agora obtidos, indicando a redução da freqüência de transconjugantes, não permitem sugerir qual ou quais desses pontos estão sendo afetados

Entretanto, os resultados obtidos, com a redução parcial, ou mesmo total, como no caso da própolis, da transferência de transconjugantes entre essas bactérias intestinais são relevantes e originais representando grande potencial para explorações biotecnológicas futuras. Por exemplo, experimentos *in vivo* com camundongos podem abrir perspectivas terapêuticas para a aplicação, pois o maior problema com resistência a drogas relaciona-se atualmente com o fluxo de genes de resistência, que está se mostrando cada vez mais promíscuo, principalmente quando envolve o mecanismo de conjugação. Sabe-se que esse mecanismo depende da presença de plasmídios ou transposons conjugativos e tanto um como o outro podem conter integrons ou genes cassetes com marcadores de resistência, virulência e outros genes. A queda total da freqüência de transconjugantes ou na ordem de 100 a 1000 vezes como ocorreu *in vitro* com alguns produtos é altamente relevante principalmente se ocorrer a repetição desses resultados *in vivo*.

A obtenção de frações ou componentes purificados ajudarão na compreensão dos mecanismos envolvidos, mas deve-se estar atento pois, mais de uma fração pode ser responsável pelo fenômeno, como ocorre com a própolis em relação à sua atividade antibacteriana (Santos *et al.*, 1999). Deve-se estar atento também para os resultados negativos obtidos *in vitro* devido à possibilidade dos componentes ativos serem liberados apenas *in vivo* após digestão ou metabolização pelo homem ou animal.

Estes resultados abrem perspectivas para:

o estudo da conjugação *in vivo*, na presença dos produtos;

a investigação da fase do processo de conjugação onde ocorre a interferência dos produtos testados.

4 – CONCLUSÕES

A maioria dos produtos testados apresentou efeito inibidor do crescimento bacteriano, sendo *A. sativum* o produto que mais afetou o crescimento bacteriano, não ocorrendo alteração dos valores da concentração inibitória mínima, nem da concentração sub-inibitória após variação de pH.

Das bactérias testadas frente à cinco produtos, pela técnica da placa gradientes, foram observadas variantes resistentes de *S. typhimurium* ED 040 para *P. granatum* e própolis, de *E. coli* BH 100 para *A. salutaris* e *C. arabica*; e de *E. coli* K12 Nx para *P. granatum* e própolis, não tendo sido observado qualquer variante de *E. coli* K12 Sm para nenhum dos produtos.

Os variantes obtidos foram prejudicados em seu crescimento, uma vez que se tornaram mais evidentes só após 72 horas de incubação. Não ocorrendo, em qualquer caso, liberação de variantes resistentes no segundo passo do experimento, levando à hipótese de que sejam letais, caso existam.

Tanto *A. sativum* quanto *P. granatum* alteraram o perfil de sensibilidade das linhagens testadas frente às concentrações sub-inibitórias escolhidas dos antimicrobianos. Sendo que *S. aureus* 37 apresentou reversão de resistência para sensibilidade frente a todos os antimicrobianos testados.

Excetuando-se os produtos derivados de *Y. paraguayensis* e *G. biloba*, os outros 6 produtos testados afetaram a freqüência de transconjugantes

obtidos a partir de cruzamentos ente *S. typhimurium* ED 040 (doadora) e *E. coli* K12 Nx (receptora), reduzindo-a de 0 a 10^6 vezes.

Não se detectou cura plasmidiana através da análise fenotípica dos controles dos experimentos de conjugação, quanto à manutenção da resistência a drogas, produção de bacteriocinas e do perfil plasmidiano, obtido por eletroforese, das linhagens doadoras, receptoras e transconjugantes.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akande, J. A. & Hayashi, Y.** (1998) Potency of extract contents from selected tropical chewing sticks against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus auricularis*. *World J. Microbiol. Biotech.*, 16: 235-238.
- Alekshun, M. N. & Levy, S. B.** (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrobial. Agents Chemother.*, 41:2067-2075.
- Al-Masaudi, S. B., Day, M. J. & Russell, A.D.** (1991). Effect of some antibiotics and biocides on plasmid transfer in *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 71: 239-243.
- Al-Qattan, K. K.; Alnaqeeb, M. A. & Ali, M.** (1999). The antihypertensive effect of garlic (*Allium sativum*) in the rat two-kidney-one-clip Goldblatt Model. *J. Ethnopharmacol.*, 66:217-222.
- Ankri, S. & Mirelman, D.** (1999) .Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microb. Infect.*, 2: 125-129.
- Anthony , K. G. ; Klimke, W. A., Manchak, J. & Frost, L. S.**(1999) Comparison of proteins Involved in *pilus* synthesis and mating pair

stabilisation from the related plasmid F and R100-1: insights into the mechanism of conjugation. *J. Bacteriol.*, 181: 5149-5159.

Araújo, J. S. & Lucas, V. (1930) Catálogo de extractos fluidos, Nova Edição, Silva Araújo e Cia, Rio de Janeiro.

Aubry-Damon, H. & Courvalin, P.(1999). Bacteria resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996 to 1998. *Emerg. Infect. Dis.*,5:315-320.

Balbach, A. (1975) A flora nacional na medicina doméstica. Vol. III, 23^a Edição, Itaquaquecetuba, SP.

Bialkowska-Hobrzanska, H. & Kunicki-Goldfinger, W. J. (1979) Spermine hinders post-conjugation recombination in *Escherichia coli* K-12. *Acta Microbiol. Pol.* 28: 5-14.

Birnboim, H. C. & Doly, J. A. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, 7: 1513-1523.

Bravo-Angel, A. M.; Gloeckler, V.; Hohn, B. & Tinland, B. (1999) Bacterial conjugation protein mobA mediates integration of complex DNA structures into plant cells. *J. Bacteriol.*, 181: 5758-5765.

Bryson, V. & Sybalski, W. (1952) Microbial selection. *Science*, 116: 46-48.

Burdock, G. A. (1998) Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*, 36: 347-363.

Cabezon, E.; Sastri, J. L. & de la Cruz, F. (1997) Genetic evidence of a coupling role for TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.*, 254: 400-406.

Cairns J.; Overbaugh, J. & Miller, S.(1988) The origin of mutants. *Nature*, 8;335: 142-5

- Chartone-Souza, E.** (1975). *Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em Escherichia coli*. Tese apresentada para obtenção do grau de mestre ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte.
- Chartone-Souza, E.** (1987) Plasmídios bacterianos in: *Genética molecular e de microrganismos – Os fundamentos de engenharia genética*. (COSTA, S. O. P., ed) Editora Manole LTDA, 273-289.
- Chartone-Souza, E.**(1998) Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. *Ciência Hoje*, 23(138): 26-35.
- Clowes, R. C. & Rowley, D.** (1954) Some observations on linkage effects in genetic recombination in *E. coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, 11: 250-260.
- Cowan, M. M.** (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 12:564-82.
- Dempsey, D. A.; Silva, H. & Klessig, D. F.** (1993) Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiol.*, 6: 54-61.
- Di Sálvio, V. M. P.** (1998) Estudo da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* de origem hospitalar e obtenção de mutantes resistentes à vancomicina . Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre ao departamento de Microbiologia, UFMG, Belo Horizonte.
- Domin, M. A.** (1998) Highly virulent pathogens-a post antibiotic era? *Br. J. Theatre. Nurs.*,8(2): 14-8.
- Duarte, M. P.; Laires, A.; Gaspar, J.; Leão, D.; Oliveira, J. S. & Rueff, J.** (1999) Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. *Mutat. Res.*, 442:43-51.
- Falkiner, F. R.** (1998) The consequences of antibiotic use in horticulture. *J. Antimicrobial. Chemother.*, 41: 429-431.

- Ferguson, L.R.** (1999). Natural and man-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Mut. Res.*, 443: 1-10.
- Fernandes Jr., A. Sugizaki, M. F.; Fogo, M. L., Funari, S. R. C. & Lopes, C. A. M.** (1995) *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins*, 1: 63-69.
- Fidler, D. P.** (1998) Legal issues associated with antimicrobial drug resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 169-177.
- Finch, R. G.** (1998) Antibiotic resistance. *J. Antimicrobial Chemother.*, 42: 125-128.
- Franklin, T. J. & Snow, G. A.** (1981) *Biochemistry of antimicrobial action*. 3rd Edition, Chapman and Hall Publishers. New York.
- Ghetu, A.F., Gubbins, M. J., Oikawa, K, Kay, C.M, Frost, L.S. & Glover, J.N.M.** (1999). The FinO repressor of bacterial conjugation contains two RNA binding regions. *Biochem.*, 38: 14036-14044.
- Glatman, L. I.; Antsiferova, N. G.; Afinogenov, G. E.; Moroz, A. F. & Tiagunenkov, IuV.** (1977) Action of various surface-active substances on the genetic transmission of R-plasmid in the *E. coli*. *Antibiotik.*, 22: 429-432.
- Goossens, H. & Sprenger, M.J.W.** (1998). Community acquired infections and bacterial resistance. *BMJ*, 317: 654-659.
- Gullo, C. & Pereira, C.** (1998) A cura no jardim. *Isto É*, 1513: 72-78.
- Habermehl, G. G.** (1998) Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. *Toxicon.*, 36: 1707-1719.

- Hall, R. M. & Collins, C. M.** (1995) Mobile genes cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.*, 15: 593-600.
- Hall, R. M.** (1997) Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp*, 207: 192-202.
- Hamilton, T.T. & Miller, J.T.M.** (1995). Antimicrobial proprieties of tea. *Antimic. Agent. Chemother.*, 39: 2375-2377.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V.** (1998) In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J. Antimic. Chemother.*, 42: 591-595.
- Hammond-Kosack, K. & Jones, J. D. G.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 48: 575-607.
- Hamss, R.E., Analla, M., Campos-Sanchez, J., Alonso-Moraga, A., Muñoz-Serrano, A. & Idaomar, M.** (1999) A dose dependent anti-genotoxic effect of turmeric. *Mutat. Res.*, 446: 135-139.
- Hart, C. A. & Kariuki, S.** (1998) Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ*, 317: 647-650.
- Hawkey, P.M.** (1998). The origins and molecular basics of antibiotic resistance. *BMJ*, 317: 657-659.
- Huovinen, P. & Cars, O.** (1998) Control of antimicrobial resistance: time for action. *BMJ*, 317: 613-615.
- Huycke, M. M.; Sahm, D. F. & Gilmore, M. S.** (1998) Multiple-drug resistant *Enterococci*: The nature of the problem and the agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 239-249.

- Ippen-Ihler, K. & Skurray, R.** (1993) Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids . In: *Bacterial conjugation*. (Clewell, D. B., ed.) Plenum Press, New York., pp 23-45.
- Itoyama, M. M.; Bicudo, H. E. M. C. & Cordeiro, J.** (1997) A effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera). *Braz. J. Gen.*, 24: 655-657.
- Johnston, A. M.** (1998) Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *BMJ*, 317: 665-667.
- Jones, R. D.** (1999) Bacterial resistance and topical antimicrobial wash products. *Am J Infect Control.*, 4: 351-63.
- Kelner, A.** (1948) A method for investigating large microbial population for antibiotic activity. *J. Bacteriol.*, 56: 157-162.
- Komatsuzawa, H.; Choi, G. H.; Ohta, K.; Sugai, M.; Tran, M. T. & Suginaka, H.** (1999) Cloning and characterization of a gene, *pbpF*, encoding a new penicillin-binding protein, PBP2B, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 43:1578-83.
- Kruse, H. & SØrum, H.** (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl. Env. Microbiol.*, 60: 4015-4021.
- Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. & Popov, S.** (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.*, 64: 235-240.
- Kuroda, Y. & Hara, Y.** (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mut. Res.*, 436: 69-97.
- Labischinski, H.; Ehlert, K. Berger-Bächi, B.** (1998) The targeting of factors necessary for the expression of methicillin resistance in staphylococci. *J. Antimicrobial Chemother.*, 41: 581-584.

- Labrador, M. & Corces, V. G.** (1997) Transposable element-host interactions: regulation of insertion and excision. *Ann. Rev. Genet.*, 31: 381-404.
- Lafuente, R.; Maymó-Gatell, X.; Mas-Castellà, J. & Guerrero, R.** (1996) Influence of environmental factors on plasmid transfer in soil microcosms. *Curr. Microbiol.*, 32: 213-220.
- Lanka, E. & Wilkins, B. M.** (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Ann. Rev. Biochem.*, 64: 141-169.
- Levchenko, A. B., Belousova II, El'Gart, R. E., Chistiakova, A. M. & Tereshin, I. M.** (1975). Effect of biologically active compounds on the resistance of bacteria to antibiotics. *Antibiotiki*, 20: 1002-1005.
- Lobo, B. M., Junqueira, H., Faraco, S. R., Peret-Filho, L. A., Nardi, R. M. D. & Penna, J.** (1993). *Shigella* sp. Como agente da diarréia aguda de crianças menores de cinco anos de idade atendidas no Centro Geral de Pediatria em Belo Horizonte. *Rev. Med. Minas Gerais*, 3: 124-126.
- Lorenz, M. G. & Wackernagel, W.** (1994) Bacterial gene transfer by natural genetics transformation in the environment. *Microbiol. Rev.*, 58: 563-602.
- Luna, V. A. & Roberts, M. C.** (1998) The presence of the *tetO* gene in a variety of tetracycline-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes from Washington state. *J. Antimic. Chemother.*, 42: 613-619.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J.** (1997) *Brock Biology of Microorganisms*, 18th Edition, Prentice Hall. New Jersey
- Magalhães, P. P.; Reis, A.; Ferreira, M. D. & Chartone-Souza, E.** (1997) Resistência a 13 antimicrobianos e ao mercúrio em 25 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Bras. Med.*, 53: 130-136.
- Mahasneh, A. M. & El-Oqlah, A. A.** (1999) Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 64: 271-276.

- Mazodier, P. & Davis, J.** (1991). Gene Transfer Between Distantly Related Bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 25: 147-171.
- Mecsas, J. & Strauss, E.** (1998) Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg. Infec. Dis.*, 4:271-288.
- Mejía, E.G., Castaño-Tostado, E. & Loarca-Piña, G.** (1999). Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mut. Res.*, 441: 1-9.
- Miller, R. V.** (1998) Bacterial gene swapping in nature. *Sci. Amer.*, 278:46-51.
- Molina-Torres, J. García-Chavez, A. & Ramírez-Chávez, E.** (1999) antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.* 64: 241-248.
- Molnar, J.; Csiszar, K.; Nishioka, I. & Shoyama, Y.** (1986) The effects of cannabispino compounds and tetrahydrocannabidiolic acid in the plasmid transfer and maintenance in *Escherichia coli*. *Acta Microbiol. Hung.*, 33: 221-231.
- Moreira, R. R. D.; Anno, I. S. & Leite, C. Q. F.** (1997) Sensitivity of mycobacteria to different species of Eucalyptus L'herit. *Rev. Microbiol.*, 28: 256-260.
- Moroz, A.F., Glatman, L.I., Neshchadim, G.N. & Khanina, M.F.** (1975). Possible mechanisms of the rifampicin supression of the conjugation transfer of R-factors in *Escherichia coli*. *Antibiotiki* ,20:119-126.
- Nascimento, A. M. A.** (1998) Porque não se pode tomar leite com tetraciclina? *Ciência Hoje*, 24:5.
- National Comitee for Clinical Laboratory Standards** (1993) Methods for antimicrobial susceptibility testing of aerobic bacteria. 4th Ed. Approved Standard M11-A4. NCCLS

- Ochiai, K. Yamanaka, T.; Kimura, K. & Sawada, O. (1959) Studies on Inheritance of Drug Resistance Between Shigella Strains and *Escherichia coli* strains. *Nippon. Igi. Shimpo.*, 1861:34-46, 1959 (in Japanese) *Apud* WATANABE, T. (1963) Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. *Bac. Rev.*, 27: 87-115.
- Okeke, I.N., Lamikanra, A. & Edelman, R. (1999). Socioeconomic and Behavioral Factors Leading to Acquired Bacterial Resistance to Antibiotics in Developing Countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 18-27.
- Petrosino, J.; Cantu III, C. & Palzkill, T. (1998) β -lactamases: Protein Evolution in Real Time. *Trends Microbiol.*, 6:323-327.
- Piddock, L. J. V.; Ricci, V.; McLaren, I. & Griggs, D. J. (1998) Role of mutation in the *gyrA* and *parC* Genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* Serotypes Isolated from Animals in United Kingdom. *J. Antimicrobial. Chemother.*, 41: 635-641.
- Radicella, J. P.; Park, P. U. & Fox, M. S. (1995). Adaptative Mutation in *Escherichia coli*: a Role for Conjugation. *Science*, 268;418-420.
- Rattan, A.; Kalia, A. & Ahmad, N. (1998) Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerg. Infec. Dis.*, 4:195-209,.
- Reimann, C. & Haas, D. (1993). Mobilisation of chromosomes and Nonconjugative plasmids by Cointegrative Mechanisms. In: *Bacterial conjugation*. (Clewell, D. B., ed.) Plenum Press, New York., pp 137-173.
- Rubin, R. J.; Harrington, C. A.; Poon, A.; Dietrich, K.; Greene, J.A. & Moiduddin, A. (1999) The Economic Impact of Staphylococcus aureus Infection in New York City Hospitals. *Emerg. Infec. Dis.*, 5: 917.
- Salyers, A. A. & Amabile-Cuevas, C. F. (1997) Why are Antibiotic Genes so Resistant to Elimination? *Antimicrobial. Agent. Chemother.*, 41:2321-2325.

- Sant'anna, Y. X.; Casalli, G. D.; Barbosa, A. J. A., Zuchi, T. M. A. D.; Chartone-Souza, E.** (1995) Plasmids simultaneously codifying tetracycline resistance, colicin production and pathogenicity in *Salmonella typhimurium*. *Rev. Microbiol*, 26: 4754.
- Santos, F. A.; Bastos, E. M. A. F.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M. & Moreira, E. S. A.** (1999) Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from the *Bacteroides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. *Anaerobe*, 5:1-3.
- Scazzochio, F.; Selan, L.; Oliva, B.; Schippa, S. Cellini, L. & Renzini, G.** (1988) Inhibition of plasmid conjugation by some recently synthesised 4-quinolone compounds. *Chemiother.*, 7: 269-267.
- Schmidt-Eisenlohr, H.; Donke, N. & Baron, C.** (1999) TraC of IncN plasmid pKM101 associates with membranes and extracellular high-molecular-weight structures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 5563-5571.
- Scott, K.P., Barbosa, T.M., Forbes, K. J. & Flint, H.J.** (1997). High-frequency transfer of a naturally occurring chromosomal tetracycline resistance elements in the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3405-3411.
- Silva, L. J.** (1998) Emerging infectious diseases in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 341-342.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R.** Farmacognosia – da planta ao medicamento. Editora da Universidade e Editora da USC. 821pp, 1999.
- Stangarlin, R. J., Schwan-Estrada, K. R. F., Cruz, M. E. S., Nozaki, M. H.**(1999). Plantas Medicinais e controle alternativos de fitopatógenos. *Biotechnol. Ciênc. Des.* 11: 16-21.
- Sticher, O.** (1993) Quality of *Ginkgo* preparations. *Planta Med.*, 59: 2-11.

- Stix, G.** Plant Matters: How to Regulate a Herb? *Sci. Amer.*, 278:22-23, 1988.
- Surh, Y.J., Lee, E. & Lee, J.M.** (1998). Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mut. Res.*, 402: 259-267.
- Tiagunenko, IuV.; Glatman, L. I. & Antsiferova, N. G.** (1975) Caffeine as an Inhibitor of conjugation transfer of R-factors. A study of certain aspects of the mechanism of action of caffeine on conjugation transfer of R-factors. *Antibiotik*, 20: 253-257.
- Tomita, T.; Sato, N.; Arai, T.; Shiraishi, H.; Sato, M.; Takeuchi, M. & Kamio, Y.** (1997) Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol. Immunol.*, 41:1005-1009.
- Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C. & Bruni, A.** (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother. Res.*, 10: 335-336.
- Trevors, J. T.** (1998). Review: bacterial population genetics. *World J. Microbiol. Biotech.*, 14:1-5.
- Trieu-Cuot, P. & Poyart, C.** (1998). Visite guidée au coeur de l'arsenal bactérien. *La Recherche*, 314: 62-67.
- Tubino, M. & Magalhães, M. E. A.** (1998). Mercúrio: um caminho rápido para a toxicidade. *Ciência Hoje*, 13: 20-22.
- Venitt, S. & Parry, J. M.** (1984) Mutagenicity testing: a practical approach. IRL Press, 354 pp.
- Waldor, M. K.** (1998) Bacteriophage biology and bacterial virulence. *Trends Microbiol.*, 6:195-297.

- Watanabe, T. & Fukasaka, T.** (1961) Epissome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J. Bacteriol.*, 81:669-678.
- Wegener, H. C.; Aarestrup, F. M.; Jensen, L. B.; Hammerum, A. M. & Bager, F.** (1999) Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis.*, 5:329-35.
- Werner, S.; Jording, D.; Simon, R. Pühler, A.** (1995) Insertional sequence (IS) elements as natural constituents of the genomes of the Gram-negative Rhizobiacea and their use as tool in ecological studies. *in* Population Genetics of Bacteria, Soc. for Gen. Microbiol., Symposium 52, pg. 89-109.
- Wilkins, B. & Lanka, E.** (1993). DNA processing and replication during plasmid transfer between Gram-negative bacteria. *In: Bacterial conjugation.* (Clewell, D. B., ed.) Plenum Press, New York., pp 105-129.
- Wilkins, B. M.** (1995) Gene transfer by bacterial conjugation: diversity of systems and functional specializations in population genetics of bacteria, *Soc. for Gen. Microbiol.*, Symposium 52, pg. 60-83.
- Willets, N.** (1993). Bacterial conjugation: a historical perspective. *In: Bacterial Conjugation* (Clewell, D. B., ed.) Plenum Press, New York, pp. 1-22.
- Yan, Y & Demerec, M.** (1965) Genetic analysis of pyrimidine mutants of *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 52:643-51
- Yam, T. S.; Hamilton-Miller, J. M. & Shah, S.** (1998) The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.*, 42:211-6.
- Yin, X. & Stotzky, G.** (1997) Gene transfer among bacteria in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.*, 45: 153-212.

Endereços eletrônicos:

DESTILARIA MARIPÁ – <http://www.destilaria.com>

6. ANEXO

6. 1 – Outros materiais

- Antibióticos

- Ácido nalidíxico (Nx).....	Sigma
- Ampicilina dissódica (Ap).....	Laboterápica Bristol S/A
- Cloranfenicol (Cm).....	Parke Davis LTDA
- Cloridrato de tetraciclina (Tc).....	Lepetit
- Agar Sulfato de canamicina (Km).....	Laboterápica Bristol S/A
- Sulfato de estreptomicina (Sm).....	Wyeth

- Drogas, corantes, reagentes, solventes e sua origem:

- Ácido acético glacial.....	E. Merck
- Ácido clorídrico P. A.....	E. Merck
- Ficoll.....	Sigma Chemical Co.
- Metanol P. A.	Merck
- Trizma base.....	Sigma Chemical Co.

- Meios de Cultura:

- Industrializados

- Agar Nutriente (AN)..... Difco
- Caldo Nutriente (CN)..... Difco
- Agar Müeller-Hinton (AMH)..... E. Merck
- Caldo Müeller-Hinton (CMH)..... E. Merck
- Brain Heart Agar (BHA)..... Difco
- Brain Heart Infusion (BHI)..... Difco
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)..... Difco
- Tryptic Soy Agar (TSA) Difco
- Tryptic Soy Broth (TSB) Difco

- Preparados no laboratório

- ▲ Meio de Lignières (Bier, 1966)

- Caldo nutriente (Difco).....8g
- Bacto Agar (Difco).....6g
- Gelatina tipo II (Sigma Chemical Co.).....5g
- Água destilada q.s.p.....1000ml

Autoclavado a 120°C por 15 minutos. pH 7.4

▲ Soluções utilizadas na eletroforese:

Solução I:

Glicose (E. Merck).....50mM 5,0ml da solução 1M
 EDTA (Sigma Chemical Co.).....10mM pH8,0
 TRIS.HCl.....25mM pH 8,0
 Água bidestilada.....87,5 ml

Esterilizada a 121°C por 15 min. Deve ser mantida a 4°C, por até 4 meses.

Solução II:

NaOH 0,2N (Reagen).....80µl de NaOH 10N
 SDS -dodecil-sulfato de sódio1% (FisherChemical)....200µl de
 SDS 20%
 Água bidestilada.....3,720µl

Solução preparada no momento do uso.

Solução III

Tris-acetato (Sigma Chemical Co.).....40mM pH 7,9
 Na₂EDTA 2mM

Ajustar o pH com ácido acético glacial e guarda à temperatura ambiente.

Solução de Brometo de Etídio 0,1%

Brometo de etídio (E. Merck).....0,1%
 Água bidestilada.....q.s.p.

Dissolver e guardar em frasco escuro a 4°C.

Tampão corante

Azul de bromofenol (E. Merck).....0,25%

Glicerol P. A . (E. Merck).....50%

Tris-Acetato.....50mM

PH 7,9

Gel de Agarose

Agarose Tipo II (Sigma Chemical Co.).....1%

Tampão TAE 1Xq.s.p.

6. 2 - Figuras dos produtos testados

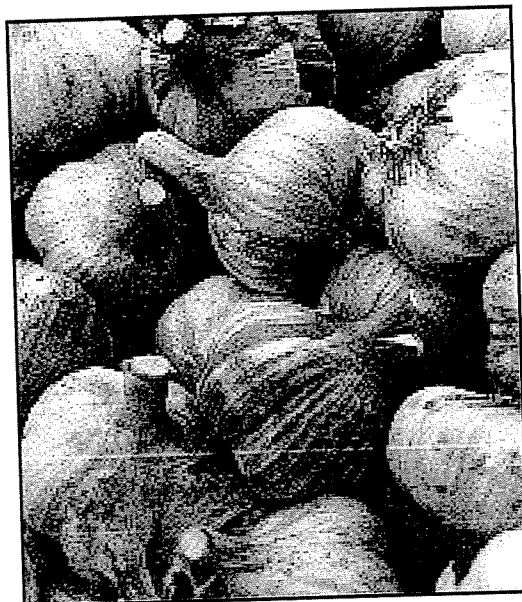


FIGURA 7 - Foto de Alho
(*Allium sativum*)



FIGURA 8 - Foto de Café
(*Coffea arabica*)



FIGURA 9 – Foto de Candéia
(*Vanillomoropsis erythropappa*)



FIGURA 10 - Foto de
Ginkgo biloba



FIGURA 11 - Desenho de Mate
(*Ylex paraguayensis*)



FIGURA 12 - Foto de Romã
(*Punica granatum*)

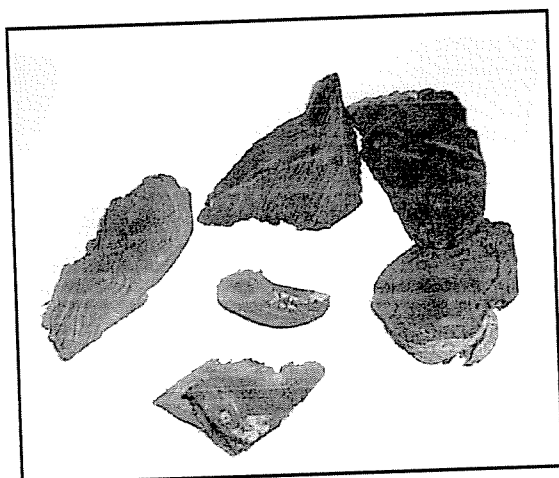


FIGURA 13 - Foto de Sumá Roxo
(*Anchietea salutaris*)

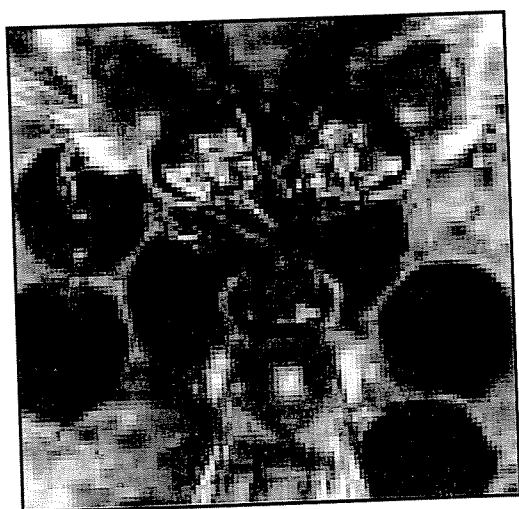


FIGURA 14 - Foto de Própolis
- abelha (*Apis indigena*)

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](#)