



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR – DGBM

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS E EXTRATOS NATURAIS EM *Staphylococcus aureus* E
Escherichia coli

AYKE ADNET DE LIMA

RIO DE JANEIRO

2017

AYKE ADNET DE LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS E EXTRATOS NATURAIS EM *Staphylococcus aureus* E
Escherichia coli

Monografia apresentada ao
Curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro como parte
dos requisitos necessários à
obtenção do Grau de
Bacharelado em Biomedicina, na
área de Biologia Molecular.

Orientador(a) acadêmico(a): Prof. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Orientador Científico: Prof. MSc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

RIO DE JANEIRO

2017

De Lima, Ayke Adnet.

Avaliação do potencial antimicrobiano de compostos heterocíclicos e extratos naturais em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub. Rio de Janeiro, 2017

58 fl.

Monografia de graduação em Bacharelado em Biomedicina –
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Palavras-chave: Compostos heterocíclicos, estatinas, isoniazida, extratos naturais, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

AYKE ADNET DE LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS
HETEROCÍCLICOS E EXTRATOS NATURAIS EM *Staphylococcus aureus* E
Escherichia coli

Orientador(a) Acadêmico(a): Prof. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Orientador Científico: Prof. Msc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub (Presidente)

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof. Msc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira (Titular)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Renato Geraldo da Silva Filho

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof. Dra. Andréia da Silva Fernandes Campos

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e aos meus nobres amigos, pelo apoio incondicional em todas as horas, e por ajudarem a me tornar cada dia um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pelos inesgotáveis amor, carinho e respeito a mim confiados, e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, ainda que eu não fosse a mais agradável das companhias.

A minha namorada Clarice, por redefinir meu conceito de companheirismo, me ensinar que nossos limites não passam de ilusões a ser superadas e me fazer sentir todos os dias como o homem mais feliz do mundo.

Aos meus amigos queridos dos grupos “Momentos”, “Vamo marcar”, “Bezerros” e “Peraltas”, pelas grandes aventuras vividas, histórias memoráveis criadas e risadas de perder o fôlego proporcionadas. Todos e cada um são partes essenciais de mim mesmo, e deles eu não abro mão.

Aos meus eternos colegas de bancada do laboratório de microbiologia Barbara, Arthur, Isabel e Luiza pela parceria de todos os dias, e pelo crescimento conjunto que obtivemos no nosso não tão breve convívio

Um agradecimento especial ao meu exemplo a ser seguido de microbiologista e profissional biomédico de forma geral, a vitalícia chefe dos estagiários e detentora dos métodos Alice Viana. Espero um dia ser ao menos um décimo do profissional e da pessoa que você é, e tenha certeza de que quaisquer conquistas que eu obtiver neste meio, você foi parte importante deste caminho.

A professora Mônica Greco Müller, por ter me apresentado ao mundo das ciências biológicas e da saúde, abrindo o caminho que hoje estou trilhando.

Aos professores do Departamento de Microbiologia Dra. Carmen Soares de Meireles Saramago e Dr. Agostinho Alves Lima e Silva, pela dedicação

inspiradora que sempre demonstraram, e pelo valioso conhecimento passado a mim e aos meus colegas.

Um agradecimento especial ao professor Dr. Renato Geraldo da Silva Filho, pela parceria, cuidado e conhecimento passados com extrema dedicação. Você me ensinou além de microbiologia, o valor do trabalho bem feito, e a fazer o máximo e melhor que se pode, independente das condições favoráveis ou não, lição esta que será levada para a vida toda.

Aos meus nobres colegas e amigos do laboratório de genotoxicidade da UNIRIO Uyla, Isabella, Guilherme e Gabriela, pelos bons momentos vividos, pelas guloseimas compartilhadas, pelas épicas batalhas de rima e pelo tanto que crescemos como grupo. Aprendemos juntos a superar as adversidades e manter o espírito de equipe acima de qualquer coisa. Não importa a dificuldade, sobrevivemos e superamos unidos, sempre apoiando uns aos outros.

A minha orientadora professora Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub, pela confiança depositada, por todo o conhecimento passado e pelo crescimento pessoal e profissional proporcionado.

Ao meu coorientador professor MSc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira, por todo o auxílio, dedicação, preocupação e ensinamentos passados no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores Dra. Núbia Boechat, Dra Rita de Cássia Castro Carvalho, Dr Frederico Silva Castelo Branco, Dra. Andréia da Silva Fernandes Campos e Dra. Andrea Furtado Macedo pelos compostos e extratos cedidos. Sua participação foi imprescindível para a realização deste trabalho.

E finalmente agradeço aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e por estarem participando do encerramento deste tão importante ciclo.

“Aquele que diz que pode e aquele que diz que não pode tem ambos razão.”

Confúcio

RESUMO

DE LIMA, Ayke Adnet. *Avaliação do potencial antimicrobiano de compostos heterocíclicos e extratos naturais em Staphylococcus aureus e Escherichia coli*. 2017. 58 f. Monografia (Bacharel em Biomedicina) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* estão entre as principais espécies associadas a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, enfermidades estas que geram aumento do número e da duração das internações, elevados custos e alta mortalidade dos pacientes. Este cenário é agravado pelo crescente número de cepas que apresentam resistência a antimicrobianos, sendo necessárias novas alternativas de tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano dos seguintes compostos e extratos nas amostras de referência ATCC 25923 de *S. aureus* e ATCC 25922 de *E. coli*: atorvastatina e derivados PCSR009.12 e PCSR010.13; isoniazida e derivados BTI 026 e PFTI 007.12; Extrato aquoso da orquídea *Cyrtopodium glutiniferum*; Extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico dos musgos *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata*. A CMI foi avaliada em placas de microtitulação, com posterior repique para meio sólido para avaliação de efeito bactericida. Isoniazida e BTI 026 mostraram inibição parcial de *E. coli* em 1000 µM. Os extratos de *H. laevifolia* e *L. laevifolium* mostraram inibição parcial de *S. aureus* de 0,11 mg/mL a 3 mg/mL, sendo o extrato etanólico de *L. laevifolium* capaz de inibir completamente o crescimento de *S. aureus* em todas as concentrações testadas. Foi observado efeito bactericida deste extrato a partir de 0,11 mg/mL.

Palavra-chave: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, estatinas, isoniazida, extratos naturais.

ABSTRACT

DE LIMA, Ayke Adnet. *Evaluation of the antimicrobial potential of heterocyclic compounds and natural extracts in Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. 2017. 58 p. Monograph (Bachelor in Biomedicine) - Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* are among the main representative species related to Health Care Related Infections. These diseases lead to an increase in the number of hospitalizations and the duration of hospitalizations, high costs and high mortality among patients. This scenario is aggravated by the increasing number of strains that present antimicrobial resistance, and new treatment alternatives are necessary. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the following compounds and extracts in the reference samples ATCC 25923 of *S. aureus* and ATCC 25922 of *E. coli*: Atorvastatin and derivatives PCSR009.12 and PCSR010.13 ; Isoniazid and derivatives BTI 026 and PFTI 007.12; Aqueous extract of *Cyrtopodium glutiniferum*; Aqueous, hydroalcoholic and ethanolic extracts of the mosses *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* and *Sanionia uncinata*. The MIC was evaluated in microtiter plates, with subsequent peel to solid medium for evaluation of bactericidal effect.. Isoniazid and BTI 026 showed partial inhibition of *E. coli* at 1000 μ M. The extracts of *H. laevifolia* and *L. laevifolium* showed partial inhibition of *S. aureus* from 0.11 mg/mL to 3 mg/mL, the ethanolic extract of *L. laevifolium* being able to completely inhibit *S. aureus* growth in all the concentrations tested. It was observed bactericidal effect of this extract from 0.11 mg/mL.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, statins, isoniazid, natural extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da obtenção dos extratos secos a partir dos musgos <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> (Adaptado de FERNANDES, 2015).	28
Figura 2 – Diagrama de placa de microtitulação pré incubação.	30
Figura 3 – Gráficos de absorvância do crescimento da cepa 25923 de <i>S. aureus</i> em presença de concentrações dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico do musgo <i>Holomitriopsis laevifolia</i> (a barra de erros indica o desvio padrão das médias de três experimentos independentes).	36
Figura 4 – Gráficos de absorvância do crescimento da cepa 25923 de <i>S. aureus</i> em presença de concentrações dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico do musgo <i>Leucobryum laevifolium</i> (a barra de erros indica o desvio padrão das médias de três experimentos independentes).	37
Figura 5 – Comparação de culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> semeadas em spots após exposição aos extratos de <i>Leucobryum laevifolium</i> . Observa-se que a ocorrência de atividade bactericida aparenta ser dependente do modo de obtenção do extrato.	39
Figura 6 – Atividade bactericida do extrato etanólico de <i>L. laevifolium</i> em foco. Observa-se a ausência de crescimento nas colunas D, E e F, indicando a ocorrência de atividade bactericida do extrato nestas dadas concentrações. ...	39
Figura 7 - Comparação de culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> semeadas em spots após exposição aos extratos etanólicos de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> , <i>Leucobryum laevifolium</i> e <i>Sanionia uncinata</i> . Observa-se que o modo de obtenção do extrato não é determinante para que ocorra atividade bactericida.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação do crescimento da amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 exposta à Isoniazida e seus derivados.	32
Tabela 2- Avaliação do crescimento da amostra de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 exposta à Isoniazida e seus derivados.....	33
Tabela 3 – Avaliação do crescimento da amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 exposta à Atorvastatina e seus derivados.	34
Tabela 4 - Avaliação do crescimento da amostra de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 exposta à Atorvastatina e seus derivados.	34
Tabela 5 - Avaliação do crescimento da amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 exposta ao extrato aquoso de <i>Cyrtopodium glutiniferum</i> , e aos extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos dos musgos <i>Holomitriopsis laevifolia</i> , <i>Leucobryum laevifolium</i> e <i>Sanionia uncinata</i>	35
Tabela 6 – Avaliação do crescimento da amostra de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 exposta ao extrato aquoso de <i>Cyrtopodium glutiniferum</i> , e aos extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos dos musgos <i>Holomitriopsis laevifolia</i> , <i>Leucobryum laevifolium</i> e <i>Sanionia uncinata</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
MRSA	Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP2a	Penicillin-binding Protein 2 ^a (Proteína ligante de Penicilina 2a)
VRSA	Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HUS	Hemolytic-uremic Syndrome
TTP	Thrombotic Thrombocytopenic Purpura
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteroadgregative <i>Escherichia coli</i>
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase
CMI	Concentração Mínima inibitória
MHA	Mueller Hinton Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
EA	Extrato Aquoso
EH	Extrato Hidroalcoólico
EE	Extrato Etanólico
Dog	Densidade óptica do crescimento (growth)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)	15
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.3	<i>Escherichia coli</i>	18
1.4	Antibioticoterapia e alternativas terapêuticas	20
1.4.1	Fármacos com potencial efeito antimicrobiano	20
1.4.2	Etnofarmacologia	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral:	25
2.2	Objetivos específicos:.....	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Preparo das cepas ATCC 25923 e ATCC 25922	26
3.2	Obtenção dos compostos heterocíclicos e extratos naturais.....	26
3.3	Teste de CMI em placa de microtitulação	29
3.4	Determinação do potencial bactericida.....	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Teste de CMI em placa de microtitulação	32
4.2	Avaliação do potencial bactericida	39
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) se referem a quaisquer infecções que acometem o paciente durante e/ou devido ao tratamento ao qual ele foi submetido, incluindo internações em hospitais, atendimento em postos de saúde e cuidados domiciliares. Possuem um grande impacto negativo no sistema de saúde, devido a fatores como aumento do tempo de internação do paciente, alto custo dos cuidados e tratamentos, e elevada taxa de mortalidade (WHO, 2015).

Segundo JARVIS e MARTONE, 1992, os acometimentos mais comuns das IRAS consistem em infecções na corrente sanguínea, trato respiratório inferior, ferimento de incisão cirúrgica e trato urinário. No ano de 2011, foi registrada a ocorrência de mais de 700.000 IRAS nos Estados Unidos, sendo 21% destas infecções de ferida cirúrgica, 21% de trato respiratório inferior, 13% de trato urinário e 10% de corrente sanguínea (CDC, 2017).

O surgimento da resistência a antimicrobianos e o aumento das condições que levam à internação de pacientes em estado grave e imunocomprometidos conferem às IRAS especial relevância como questão de saúde pública, principalmente para países em desenvolvimento, onde a incidência de IRAS pode ser até 20 vezes maior que em países desenvolvidos (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Duas grandes classes de patógenos causadores de IRAS no homem são os cocos gram-positivos e as enterobactérias. Como representantes destes dois grupos, podemos destacar *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente, como as principais espécies envolvidas em IRAS (WHO, 2017) devido à sua capacidade de gerar quadros graves e à ampla distribuição de amostras resistentes aos antimicrobianos de primeira escolha (CASEY et al., 2007; LEIMBACH et al., 2013).

1.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria do gênero *Staphylococcus*, o qual é constituído atualmente por 52 espécies e 27 subespécies (EUZÉBY, 2017). Os micro-organismos pertencentes a este gênero são cocos gram-positivo, cujas células são predominantemente encontradas agrupadas formando estruturas que se assemelham a cachos de uvas, devido aos seus diferentes planos de divisão celular. São caracterizados como micro-organismos imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positivo e não esporulados (BAIRD-PARKER, 1990; FREITAS, 2005). Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo. Por sua capacidade de tolerância a altas concentrações de cloreto de sódio, são classificados como halotolerantes (HOERLLE, 2005; CHOI et al., 2014).

Os membros do gênero são divididos em dois grupos tomando como critério a presença da enzima coagulase, os coagulase-positivo e negativo, sendo *S. aureus* a única espécie de importância médica pertencente ao primeiro grupo (DOS SANTOS et al., 2007).

Staphylococcus aureus tem a capacidade de colonizar a pele e as mucosas do ser humano saudável, sendo encontrada com mais frequência nas cavidades nasais. Indivíduos colonizados por esta espécie podem desenvolver o chamado estado de portador, onde os mesmos não sofrem com os sintomas do processo infeccioso, porém se tornam um potencial meio de disseminação da bactéria na comunidade (DE OLIVEIRA; DE PAULA, 2012). Indivíduos portadores assumem um papel epidemiológico crítico quando se tratam de profissionais da área da saúde, tendo em vista que os mesmos entram em contato direto com pacientes muitas vezes debilitados e mais suscetíveis, possibilitando a transmissão desse micro-organismo. Outros grupos como os manipuladores de alimentos, por exemplo, também adquirem relevância em termos de saúde, já que muitas amostras de *S. aureus* tem a capacidade de produzir enterotoxinas, podendo causar quadros de intoxicação alimentar nos consumidores (HO et al., 2015). Além disso, o indivíduo que apresenta estado de portador, condição habitualmente inofensiva, pode ser acometido por

infecções pelo micro-organismo caso a amostra colonizadora obtenha acesso a outros sítios anatômicos, especialmente após cirurgias (VON EIFF et al., 2001).

A posição de destaque de *S. aureus* como patógeno está ligada à sua vasta gama de fatores de virulência, que conferem ao micro-organismo a capacidade de se ligar às células do hospedeiro mediante a produção de diversas adesinas, causar dano tecidual através da secreção de enzimas como hialuronidase, fibrolisina, nucleases e coagulases, além da produção de exotoxinas como a enterotoxina A e a toxina-1 do choque tóxico estafilocócico (TSST-1) (KONG et al., 2016).

No que diz respeito aos mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro, pode-se citar a proteína de superfície A (spA), responsável por se ligar inespecificamente à porção Fc de anticorpos IgG livres (VOTINTSEVA et al., 2014), e a capacidade de produzir biofilme, uma matriz extracelular que pode ser constituída por proteínas, polissacarídeos e DNA, e que envolve as células do micro-organismo, aderindo-as entre si e ao substrato, formando um microambiente onde ocorrem alterações no fenótipo, na expressão gênica e na síntese proteica (DONLAN; COSTERTON, 2002). Ambos os mecanismos tornam a bactéria menos suscetível a fagocitose, sendo o biofilme também capaz de agir como uma barreira física, aumentando a resistência das células nele inseridas à ação de antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001).

Além da produção de biofilme, *S. aureus* possui outros mecanismos de resistência à antimicrobianos, como o presente nas cepas conhecidas como MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina). A resistência à meticilina e a outros β -lactâmicos semissintéticos é determinada pela presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação a penicilina modificada, a PBP2a, com baixa afinidade a antibióticos β -lactâmicos (GORDON; LOWY, 2008). O antimicrobiano vancomicina é empregado no tratamento de infecções por MRSA, porém desde 1997 há registros de amostras que apresentam resistência também a este fármaco, sendo conhecidas como VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina) (MOHR; MURRAY, 2007).

1.3 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria do gênero *Escherichia*, o qual é constituído atualmente por 8 espécies (EUZÉBY, 2017), sendo esta a de maior importância em termos de saúde pública e controle sanitário (PADILHA, 2011; SILVA et al., 2017). Os micro-organismos pertencentes a este gênero são bastonetes gram-negativo, anaeróbios facultativos, não esporulados, da Família das Enterobacteriaceae. Podem ser imóveis ou móveis, com flagelação periférica (BRENNER et al., 2005). Em geral inofensiva, *Escherichia coli* é habitualmente encontrada colonizando o trato gastrointestinal inferior de seres humanos, fazendo parte de sua microbiota e beneficiando o hospedeiro com a produção de Vitamina K2, fator importante na síntese de fatores do sistema de coagulação sanguínea (BENTLEY; MEGANATHAN, 1982), além de impedir que outros micro-organismos possivelmente patogênicos se instalem naquele sítio através da ocupação de receptores.

Algumas cepas de *E. coli* são comumente empregadas em testes de controle de qualidade e saneamento como parâmetros de contaminação fecal, devido à sua considerável viabilidade em ambientais desfavoráveis (ANVISA, 2006).

Algumas estirpes de *E. coli* com maior patogenicidade são capazes de provocar morbidades graves nos seres humanos como intoxicações alimentares, infecções do trato urinário, e diversas outras incluindo meningite e septicemia, sendo a transmissão fecal-oral o principal modo de contaminação neste primeiro (CDC, 2017).

Dentre os fatores de virulência de *E. coli*, podemos destacar a produção de adesinas e fímbrias de adesão agregativa responsáveis por, respectivamente fixar o micro-organismo às células do hospedeiro e causar um amontoamento de células da bactéria (BERNIER et al., 2002), e a produção de toxinas como as termolábeis (LT), as termoestáveis (ST) (CZIROK et al., 1992) e outras mais potentes, como a de Shiga (*Stx*), responsável por quadros de diarreia leve a severa e sanguinolenta, podendo progredir para síndrome hemolítico-urêmica (HUS), caracterizada por falência renal, e púrpura

trombocitopênica trombótica (TTP), com possível envolvimento do sistema nervoso central (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007; OBRIG, 2010).

Algumas cepas também possuem genes que codificam os componentes de um sistema de secreção tipo 3, incluindo *mxl* (excreção de *ipa* – antígenos de plasmídeo de invasão – pela membrana) e *spa* (apresentação de antígenos de plasmídeo de invasão na superfície), permitindo que ocorra a invasão dos enterócitos do hospedeiro de forma similar à realizada por *Shigella spp.* (UD-DIN; WAHID, 2014; MICHELACCI et al., 2016).

As cepas de maior patogenicidade são classificadas em grupos de acordo com suas características e seus fatores de virulência. Estas podem ser enteropatogênica Clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC) enteroagregativas (EAEC) e uropatogênicas (UPEC) (MÜHLDORFER; HACKER, 1994).

As estirpes de *E. coli* que fazem parte da microbiota humana estão frequentemente sofrendo pressão seletiva, visto que a cada vez que se faz uso de um antimicrobiano a nível sistêmico para tratar uma infecção já existente ou prevenir que esta enfermidade se instale, a microbiota é indiretamente exposta a este composto, em concentrações inferiores à janela terapêutica, propiciando a formação de populações desses micro-organismos amplamente resistentes a antimicrobianos (ANDRADE et al., 2006). Neste contexto, estão descritas as amostras produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) (WOERTHER et al., 2017), resistentes a múltiplos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos como a penicilina e amoxicilina, e as amostras produtoras de carbapenemases, resistentes aos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, fenótipo este primeiramente observado em *Klebsiella pneumoniae* (amostras KPC) (KUSKUCU et al., 2016).

Vale ressaltar não só o potencial patogênico destas amostras, mas também sua importância como reservatório de genes de resistência, visto que muitos destes estão alocados em plasmídeos e podem ser transferidos para outras espécies mais virulentas, acarretando em um pior prognóstico para o tratamento de infecções bacterianas (USP, 2017).

1.4 Antibioticoterapia e alternativas terapêuticas

Juntamente com a profilaxia através de métodos de higiene básica e controle dos riscos de contaminação, a antibioticoterapia sempre foi uma das principais formas de combate às infecções bacterianas em seres humanos (ANVISA, 2016). No entanto, a constante exposição dos micro-organismos a estes fármacos desde o início da era da penicilina levou a um aumento alarmante do número de cepas com eficientes mecanismos de resistência aos antimicrobianos nas mais variadas espécies, classificadas como patogênicas ou não. Isso se deve principalmente ao uso desregrado destas formas de tratamento, já que a regulamentação de seu uso nem sempre foi validada e posta em ação, e ao uso errôneo destes medicamentos.

Recorrentemente são receitados antimicrobianos de amplo espectro para tratamento de infecções diagnosticadas com base apenas em aspectos clínicos rasos, sem confirmação laboratorial, levando à exposição muitas vezes desnecessária das bactérias, tanto as patogênicas quanto as que compõem a microbiota, a estes fármacos, selecionando cada vez mais cepas resistentes e diminuindo a eficácia do tratamento em novas infecções (LOPEZ-VAZQUEZ et al., 2012).

Tendo em vista as razões descritas acima, torna-se necessário além do uso consciente e eficaz dos antimicrobianos já disponíveis, que sejam realizados estudos buscando novas alternativas de tratamento para estas patologias, a fim de controlar infecções causadas por cepas resistentes de bactérias e reduzir o uso de antimicrobianos apenas aos casos de estrita necessidade.

1.4.1 Fármacos com potencial efeito antimicrobiano

Não é incomum que fármacos já aprovados e amplamente utilizados pela população tenham mecanismos de ação e efeitos que não o de sua prescrição original ainda desconhecidos (LIAO; LAUFS, 2005). No que diz

respeito à interação com infecções, estes efeitos podem ser benéficos ao paciente quando auxiliam no combate ao micro-organismo, neutros, ou até prejudiciais se o fármaco em questão propicia o desenvolvimento do quadro infeccioso, seja por provocar depressão da resposta imune do paciente, ou ativar/potencializar mecanismos de virulência e resistência dos patógenos, entre outros.

Dentro do próprio grupo dos antimicrobianos, a isoniazida é um pró-fármaco da classe das linezolidas utilizada no esquema RIPE de tratamento da tuberculose, juntamente com a Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol (Cadernos de Atenção Básica, 2002). Seu mecanismo de ação consiste no impedimento da síntese de ácidos micólicos, componente essencial da parede celular de micobactérias. Esta substância é catalisada por uma catalase-peroxidase do micro-organismo chamada KatG, se transformando em um radical acil isonicotínico, que espontaneamente forma um complexo com o NADH. Esse complexo se liga fortemente à proteína transportadora enoil-acil redutase (InhA), bloqueando a síntese de ácidos graxos (SUAREZ et al., 2009). Um estudo recente envolvendo avaliação da toxicidade e mutagenicidade da isoniazida e dos derivados PFTI 00712 e BTI 026 através de teste de Ames (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000) demonstrou elevada toxicidade destes compostos em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (BRANCO, 2015), uma enterobactéria recorrentemente ligada a quadros de intoxicação alimentar (CHRISTENSON, 2013), levantando a hipótese de que o efeito antimicrobiano destes fármacos poderiam se estender a outras espécies que não as micobactérias.

Um estudo de VIANA et al., 2015, evidencia o fármaco diclofenaco de Sódio, um medicamento amplamente difundido e utilizado pelo seu efeito anti-inflamatório inclusive em pacientes internados e, portanto, susceptíveis a IRAS. Foi demonstrado que o medicamento é capaz de exercer efeito antimicrobiano em *S. aureus* ainda que provocando estímulo da produção de biofilme em concentrações subinibitórias, mostrando que o estudo aprofundado de fármacos destinados ao tratamento de outras enfermidades que não as infecções podem ser úteis no combate a estas patologias.

Como outro exemplo, pode-se citar as estatinas, os fármacos mais utilizados para o controle da hipercolesterolemia e prevenção de doenças cardiovasculares, e que possuem uma série de efeitos pleiotrópicos (CAMPO; CARVALHO, 2007; GALGÓCZY et al., 2011). As estatinas atuam principalmente inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima esta responsável pela conversão de HMG-CoA em mevalonato, uma etapa limitante na síntese de colesterol (VARGAS; LIMBERGER, 2013).

O efeito observado consiste na diminuição da síntese de LDL-C (Lipídeos de baixa densidade) e aumento do seu catabolismo mediado por receptores de LDL-C (WELLS et al., 2006). Estudos recentes apontam que dentre os seus efeitos pleiotrópicos, estariam os potenciais antifúngico (GALGÓCZY et al., 2011) e antimicrobiano (JERWOOD; COHEN, 2008). A atorvastatina é o fármaco de maior destaque contra *S. aureus* e *E. coli* comparado à Sinvastatina e Rosuvastatina (MASADEH et al., 2012). Em contrapartida, GRAZIANO et al., 2015 observou ação antibiofilme de *S. aureus* no fármaco Sinvastatina, onde este foi capaz de reduzir a formação da matriz extracelular em culturas novas e a viabilidade celular em biofilmes maduros.

1.4.2 Etnofarmacologia

A Etnofarmacologia é definida como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (ELISABETSKY, 2003), em outras palavras, o estudo do conhecimento popular no que diz respeito ao tratamento de enfermidades com produtos derivados da natureza. Segundo ELISABETSKY, 2003, embora a cultura popular se limite a identificar sintomas e associar efeitos destes produtos de forma crua, sem caracterizar as doenças da forma que os pesquisadores o fazem, o estudo aprofundado destes compostos e extratos tendo como base para pré-triagem relatos da própria população pode ser um atalho para a descoberta de novos fármacos.

Alguns dos medicamentos mais difundidos hoje na população são provenientes de estudo e refinamento de substâncias ativas de origem natural, a exemplo da morfina, um alcaloide da papoula (*Papaver somniferum*) inicialmente isolado por Friederich Serturmer em 1806, e que é amplamente utilizado como analgésico para os mais diversos fins (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). A aspirina (ácido acetilsalicílico), por sua vez, também possui origem etnofarmacológica. Ela é obtida através da manipulação do ácido salicílico, composto utilizado no tratamento de artrite reumatoide. O ácido salicílico resulta de uma alteração estrutural da salicina, uma substância analgésica e anti-inflamatória retirada do salgueiro branco (*Salix alba*). O consumo da salicina do salgueiro branco para o alívio de dores data de 400 a.C., quando o filósofo grego tido como pai da medicina, Hipócrates, recomendava a seus seguidores que fizessem uso do chá da casca do vegetal (BAYER JOVENS, 2017). O conhecimento prévio das propriedades destes extratos foi essencial para o posterior desenvolvimento dos fármacos citados, dentre muitos outros.

Quando se trata de medicamentos antimicrobianos de origem etnofarmacológica, é sabido que em ecossistemas maduros os organismos estão constantemente competindo entre si por nutrientes e espaço, o que acarreta na seleção natural de características que beneficiem uma espécie em detrimento de outra. A própria Penicilina, um antibiótico que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas após sua descoberta em 1928 por Alexander Fleming, trata-se de um composto de origem natural produzido por fungos do gênero *Penicillium* (ACS, 2017).

Assim como os fungos que competem com os micro-organismos nos ecossistemas, as espécies vegetais também o fazem, além de constantemente serem infectadas por estes patógenos. Portanto, não é um equívoco que plantas produzam metabólitos e compostos que possuam efeito antimicrobiano (KOH et al., 2013). Neste âmbito, as orquídeas do gênero *Cyrtopodium spp.* são conhecidas popularmente por suas propriedades cicatrizante, anti-inflamatória, antitussígena e até antitumoral. Originalmente consumida como suco feito a partir do xarope de seus bulbos, atualmente alguns representantes como *Cyrtopodium punctatum* são comercializadas em forma de pomada de

uso tópico anti-inflamatório, e são especialmente recomendadas para o tratamento de furúnculos, enfermidade esta comumente causada pela bactéria *S. aureus*, ainda que não haja evidências de atividade antimicrobiana vinculada ao emprego de extratos deste gênero (SILVA, 2013).

Já no que diz respeito às briófitas, um estudo de FERNANDES, 2015, avaliou o potencial fotoprotetor de extratos dos musgos amazônicos *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*, e do musgo antártico *Sanionia uncinata*, bem como seu risco toxicológico. Embora tais musgos não sejam até o momento de uso popular para tratamento de enfermidades, estas espécies foram selecionadas de acordo com seu habitat de origem, regiões com alta incidência de raios ultravioleta (KIRCHHOFF; ECHER, 2001; FREDERICK et al., 1998), partindo do princípio evolutivo de que estas espécies teriam sofrido pressão seletiva do ambiente e desenvolvido e preservado características que as possibilitasse a sobrevivência nos ambientes citados. De acordo com os estudos realizados até o momento, esses extratos são promissores para o desenvolvimento de fármacos fotoprotetores, prevenindo doenças ligadas à exposição solar, como o câncer de pele entre outras (FERNANDES, 2015; INCA, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar o potencial antimicrobiano, seletividade e espectro de ação de uma seleção de compostos heterocíclicos e extratos naturais disponíveis no banco de extratos e farmacoteca do laboratório de genotoxicidade da UNIRIO e do laboratório de mutagênese ambiental da UERJ em duas estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar o potencial antimicrobiano, seletividade e espectro de ação dos seguintes compostos e extratos utilizando o teste de determinação da concentração mínima inibitória nas amostras de referência ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* e ATCC 25922 de *Escherichia coli* como representantes das bactérias gram-positivas e gram-negativas:
 - Atorvastatina e derivados PCSR009.12 e PCSR010.13;
 - Isoniazida e derivados BTI 026 e PFTI 007.12;
 - Extrato aquoso da orquídea *Cyrtopodium glutiniferum*;
 - Extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos do musgo *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata*.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparo das cepas ATCC 25923 e ATCC 25922

Foram utilizadas neste estudo as cepas (gram-positiva) ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* e (gram-negativa) ATCC 25922 de *Escherichia coli*, cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz.

As cepas foram inicialmente estocadas a -4 °C, em tubos de vidro de 13 x 100 mm contendo Ágar Mueller Hinton – MHA (DIFCO®).

A ativação das estirpes bacterianas foi realizada repicando-as em tubos de vidro contendo 2 mL de Caldo Soja Trypticaseína – TSB (ACUMEDIA®) a partir do estoque. O caldo de ativação das cepas foi mantido em incubação sem agitação por 24 horas e posteriormente foi feita a semeadura por esgotamento em Ágar Soja Trypticaseína – TSA (ACUMEDIA®). Após 24h a 35 °C, foi confirmada a pureza das culturas e, a partir deste crescimento, foram preparadas suspensões e alíquotas das estirpes em tubos eppendorf contendo 1 mL de Caldo Mueller Hinton - MHB (DIFCO®) e então armazenadas a -4 °C para posterior realização do teste em placa de microtitulação de 96 poços.

A concentração das alíquotas armazenadas foi ajustada em comparação com a turvação do padrão 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2005) e por titulação em placa, correspondendo a uma densidade de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/mL.

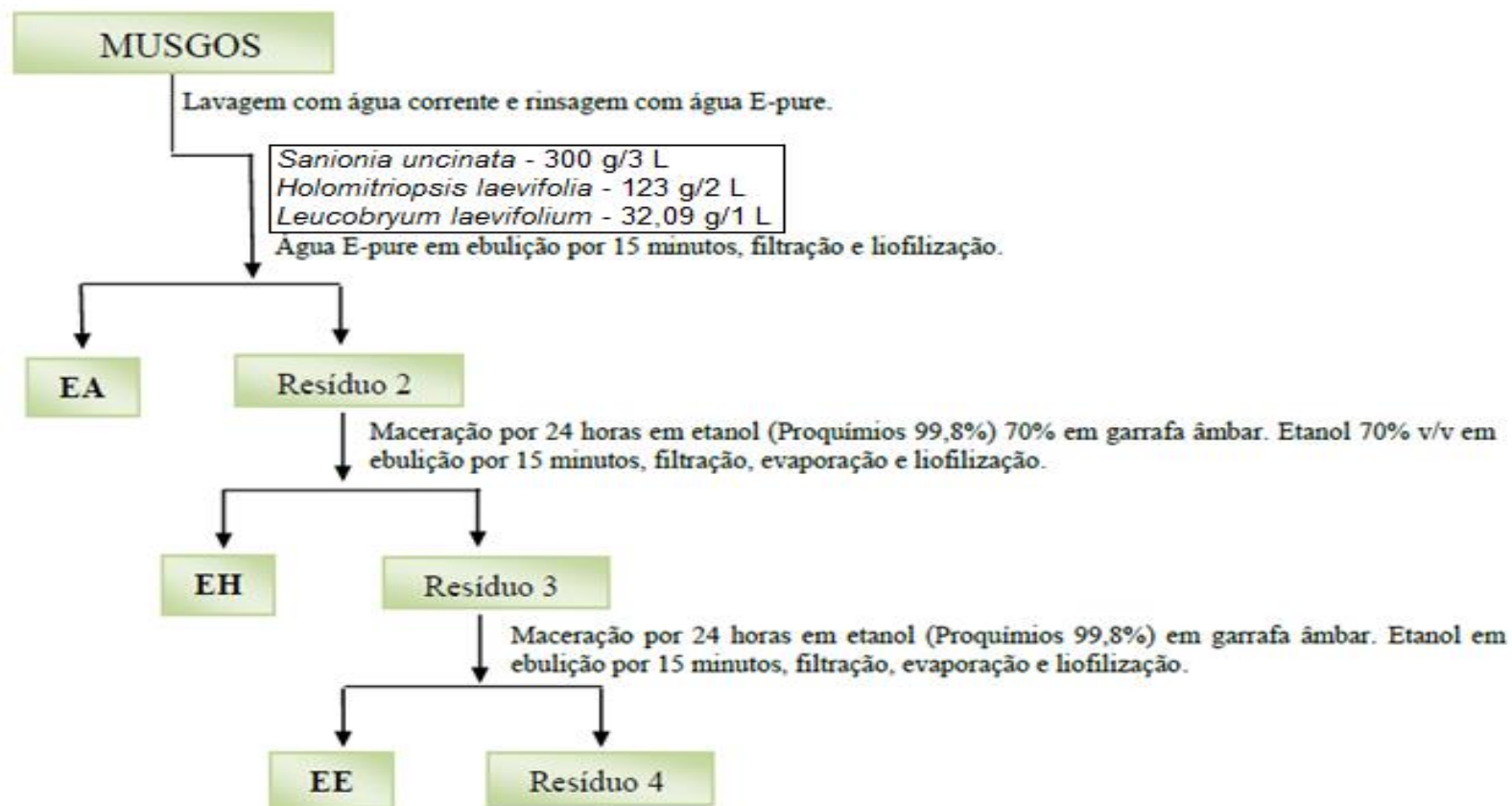
3.2 Obtenção dos compostos heterocíclicos e extratos naturais

Os compostos heterocíclicos isoniazida, atorvastatina e seus respectivos derivados BTI 026 e PFTI 007.12, e PCSR009.12 e PCSR010.13 foram confeccionados e cedidos a este estudo pela Dra. Núbia Boechat, Dra. Rita de Cássia Castro Carvalho e Dr. Frederico Silva Castelo Branco, do Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz.

O extrato aquoso da orquídea *Cyrtopodium glutiniferum* foi obtido e cedido a este estudo pela Dra. Andrea Furtado Macedo da UNIRIO. A obtenção do extrato se deu através do aquecimento de 1 kg de pseudobulbos frescos de *C. glutiniferum* cortados em pequenos pedaços em 2 L de água à 80 °C sob agitação durante 1 h. Após isso, o extrato aquoso foi filtrado em papel de filtro Whatmann (4 mm) e o filtrado liofilizado. Para realização dos testes de concentração mínima inibitória, o extrato seco foi ressuspendido em salina 0.9%.

Os extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos dos musgos *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata* foram obtidos e cedidos a este estudo pela Dra. Andréia da Silva Fernandes Campos da UERJ. O protocolo de obtenção dos extratos secos está descrito na Figura 1. Os extratos se encontravam secos por processo de liofilização. Para a realização dos testes de CMI, os mesmos foram eluídos em Caldo Mueller Hinton puro (aquosos) e uma mistura 1:1 de Caldo Mueller Hinton e Dimetilsulfóxido (hidroalcoólicos e etanólicos).

Figura 1 – Fluxograma da obtenção dos extratos secos a partir dos musgos *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* (Adaptado de FERNANDES, 2015).



Fonte: FERNANDES, 2015 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos secos dos musgos *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*, realizado pela Dra. Andréia da Silva Fernandes Campos. Neste fluxograma estão descritos os extratos aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE).

3.3 Teste de CMI em placa de microtitulação

Os testes de CMI em placa de microtitulação de fundo chato foram realizados conforme as diretrizes do Manual de Testes de Suscetibilidade a Antimicrobianos do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2005).

As concentrações testadas para a isoniazida, atorvastatina e os respectivos derivados foram de 1000 μM , 333 μM , 111 μM , 37 μM , 12,4 μM e 4,1 μM .

Para o extrato de *Cyrtopodium glutiniferum*, as concentrações testadas foram de 3 mg/mL, 1 mg/mL, 0,33 mg/mL, 0,11 mg/mL, 0,04 mg/mL e 0,01 mg/mL. A concentração máxima do extrato de *C. glutiniferum* foi definida como aproximadamente 1/1000 da massa encontrada em pomadas de uso tópico (2,5 g).

Para os extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos de *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata*, as concentrações testadas foram de 3 mg/mL, 1 mg/mL, 0,33 mg/mL, 0,11 mg/mL, 0,04 mg/mL e 0,01 mg/mL. A concentração máxima foi definida como o limite de solubilidade dos extratos.

Em cada experimento, foram pipetados 300 μL de Caldo Mueller Hinton – MHB em cada poço da terceira fileira da placa de microtitulação (fileira C), e 200 μL do mesmo meio de cultura nas fileiras restantes. Na fileira C, foram pipetados os volumes dos compostos e extratos a serem testados, no dobro da concentração final desejada. Foi então realizada a diluição seriada na proporção de 1:3, começando na fileira C, transferindo o volume de 100 μL para o poço imediatamente abaixo e homogeneizando com o micropipetador. O processo foi repetido até a homogeneização dos poços da última fileira (fileira H), de onde foram retirados e descartados 100 μL (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama de placa de microtitulação pré-incubação.

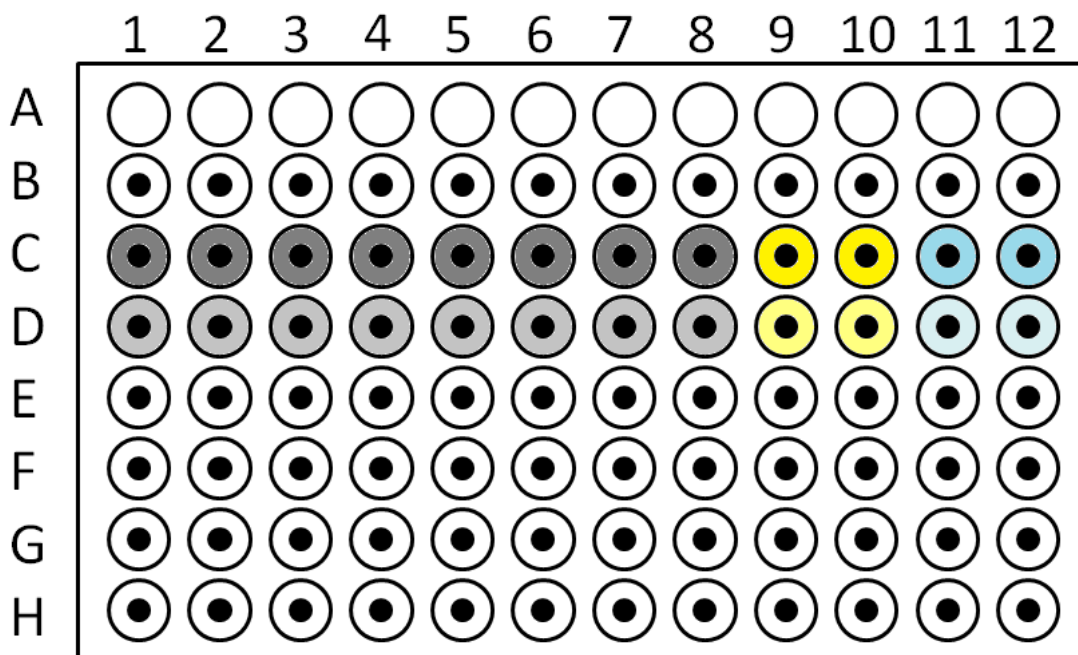


Diagrama de placa de microtitulação pré-incubação. Os poços contendo um ponto central correspondem ao inóculo, sendo a fileira A destinada ao Branco e a fileira B ao controle negativo de inibição do crescimento bacteriano. A partir da fileira C em diante, encontram-se diluições seriadas (1:3) dos compostos/extratos testados (colunas 1 – 8) e dos antimicrobianos tetraciclina (colunas 9 e 10) e ampicilina (colunas 11 e 12), estes últimos como controle positivo de inibição do crescimento.

A partir disso, o volume de 100 µL foi transferido de cada poço da placa para os correspondentes de outra.

Para cada experimento realizado, uma alíquota de cada estirpe foi descongelada e diluída em Caldo Mueller Hinton - MHB na proporção de 1:500, gerando um inóculo da ATCC 25923 de *S. aureus* e outro da ATCC 25922 de *E. coli*, ambos com a concentração de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ ufc/mL. Destas suspensões, foram pipetados 100 µL em cada poço das placas de microtitulação, uma cepa em cada placa. Na primeira fileira de cada uma, foram pipetados mais 100 µL de Caldo MH sem inóculo, para o controle de esterilidade do teste (Branco). Os antimicrobianos Tetraciclina (SIGMA®) e Ampicilina (SIGMA®) foram empregados em todos os experimentos como controle positivo, nas concentrações de 1,8 µg/mL a 445 µg/mL e 1,4 µg/mL a 350 µg/mL, respectivamente.

Com a adição do inóculo, a concentração do composto/extrato testado foi ajustada para o valor desejado (diluição 1:2) e a concentração final dos inóculos foi de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ ufc.

As placas de microtitulação foram incubadas por 24h a 35 °C e o crescimento das amostras avaliado tanto visualmente, quanto espectrofotometricamente com a utilização do espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, medindo a absorvância das culturas (Dosagem óptica do crescimento – Dog) no comprimento de onda de 620 nanômetros.

Os experimentos foram realizados em duplicata, com um n total de três experimentos para cada composto e extrato testado.

3.4 Determinação do potencial bactericida

Os compostos heterocíclicos e extratos que apresentaram atividade inibitória nas amostras testadas nos testes de CMI em placa de microtitulação foram também submetidos à avaliação do seu potencial bactericida.

A partir dos poços das placas de microtitulação nos quais se encontravam os compostos e extratos em que foi observada atividade inibitória, foram semeados cinco *spots* de 10 µL em placas de TSA. Após incubação por 24h a 35 °C, a avaliação do crescimento bacteriano nos *spots* foi realizada visualmente.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de CMI em placa de microtitulação

Adicionalmente ao que é determinado pelo CLSI, neste estudo exclusivamente foi definido como critério para a determinação da CMI a inibição de 90% do crescimento bacteriano em relação ao controle negativo de inibição do crescimento (MHB + inóculo), ou semelhante ao Branco (apenas MHB), segundo análise espectrofotométrica.

Dentre os compostos heterocíclicos, não foi observada interferência dos compostos no crescimento de *S. aureus* (Tabela 1). O composto isoniazida e o derivado BTI 026 apresentaram algum grau de inibição em *E. coli* (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 1 – Avaliação do crescimento da amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 exposta à isoniazida e seus derivados.

Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
Compostos	BR	CN	1000	333	111	37	12,4	4,1
Isoniazida	-	+	+	+	+	+	+	+
BTI 026	-	+	+	+	+	+	+	+
PFTI 00712	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: BR - Branco (controle de esterilidade); CN – Controle Negativo de inibição do crescimento.

As concentrações dos compostos encontram-se em μM .

CMI dos controles de inibição: tetraciclina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ampicilina 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Categorias: Crescimento sem inibição: + (igual ou >80% do CN), inibição parcial: / (entre 10% e 80% do CN), inibição total do crescimento: - (<10% do CN ou semelhante a BR).

Tabela 2 - Avaliação do crescimento da amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922 exposta à isoniazida e seus derivados.

Crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								
Compostos	BR	CN	1000	333	111	37	12,4	4,1
Isoniazida	-	+	/	+	+	+	+	+
BTI 026	-	+	/	+	+	+	+	+
PFTI 00712	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: BR - Branco (controle de esterilidade); CN – Controle Negativo de inibição do crescimento.

As concentrações dos compostos encontram-se em μM .

CMI dos controles de inibição: tetraciclina 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ampicilina 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Categorias: Crescimento sem inibição: + (igual ou >80% do CN), inibição parcial: / (entre 10% e 80% do CN), inibição total do crescimento: - (<10% do CN ou semelhante a BR).

Figura 2 – Gráficos de absorbância do crescimento da cepa 25922 de *Escherichia coli* em presença de concentrações de isoniazida (A) e do derivado BTI 026 (B) (a barra de erros indica o desvio padrão das médias de três experimentos independentes).

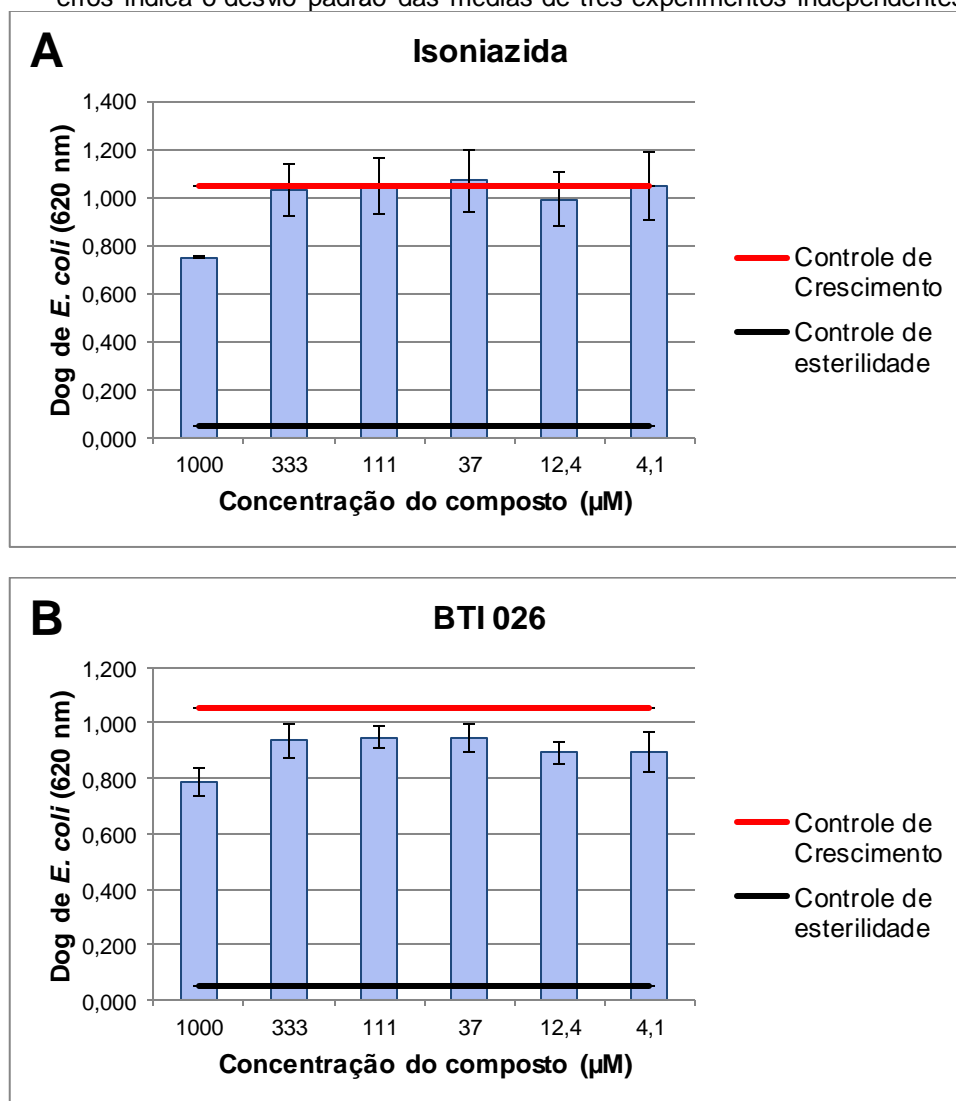


Tabela 3 – Avaliação do crescimento da amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 exposta à atorvastatina e seus derivados.

Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
Compostos	BR	CN	1000	333	111	37	12,4	4,1
Atorvastatina	-	+	+	+	+	+	+	+
P9	-	+	+	+	+	+	+	+
P10	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: BR - Branco (controle de esterilidade); CN – Controle Negativo de inibição do crescimento.

As concentrações dos compostos encontram-se em μM .

CMI dos controles de inibição: tetraciclina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ampicilina 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Categorias: Crescimento sem inibição: + (igual ou >80% do CN), inibição parcial: / (entre 10% e 80% do CN), inibição total do crescimento: - (<10% do CN ou semelhante a BR).

Tabela 4 - Avaliação do crescimento da amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922 exposta à atorvastatina e seus derivados.

Crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								
Compostos	BR	CN	1000	333	111	37	12,4	4,1
Atorvastatina	-	+	+	+	+	+	+	+
P9	-	+	+	+	+	+	+	+
P10	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: BR - Branco (controle de esterilidade); CN – Controle Negativo de inibição do crescimento.

As concentrações dos compostos encontram-se em μM .

CMI dos controles de inibição: tetraciclina 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ampicilina 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Categorias: Crescimento sem inibição: + (igual ou >80% do CN), inibição parcial: / (entre 10% e 80% do CN), inibição total do crescimento: - (<10% do CN ou semelhante a BR).

Dentre os extratos naturais, foi observada inibição do crescimento na cepa de *S. aureus* apenas pelos musgos *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*, sendo o extrato etanólico deste último o único dentre o universo amostral a apresentar inibição total do crescimento (CMI), na concentração de 0,01 mg/mL (Tabela 5; Figura 3; Figura 4). Não foi observada interferência dos extratos no crescimento de *E. coli* (Tabela 6).

Tabela 5 – Avaliação do crescimento da amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 exposta ao extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum*, e aos extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos dos musgos *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata*.

Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
EA	BR	CN	3	1	0,33	0,11	0,04	0,01
<i>C. glutiniferum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. laevifolia</i>	-	+	/	/	/	/	/	+
<i>L. laevifolium</i>	-	+	/	/	/	/	/	/
<i>S. uncinata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
EH								
<i>H. laevifolia</i>	-	+	+	+	+	/	/	+
<i>L. laevifolium</i>	-	+	+	/	/	/	/	+
<i>S. uncinata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
EE								
<i>H. laevifolia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. laevifolium</i>	-	+	+	+	/	/	-	-
<i>S. uncinata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: BR - Branco (controle de esterilidade); CN – Controle Negativo de inibição do crescimento; EA – Extrato aquoso; EH – Extrato hidroalcoólico; EE – Extrato etanólico;

As concentrações dos extratos encontram-se em mg/mL.

CMI dos controles de inibição: tetraciclina 30 µg/mL; ampicilina 0,05 µg/mL.

Categorias: Crescimento sem inibição: + (igual ou >80% do CN), inibição parcial: / (entre 10% e 80% do CN), inibição total do crescimento: - (<10% do CN ou semelhante a BR).

Figura 3 – Gráficos de absorvância do crescimento da cepa 25923 de *Staphylococcus aureus* em presença de concentrações dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico do musgo *Holomitriopsis laevifolia* (a barra de erros indica o desvio padrão das médias de três experimentos independentes).

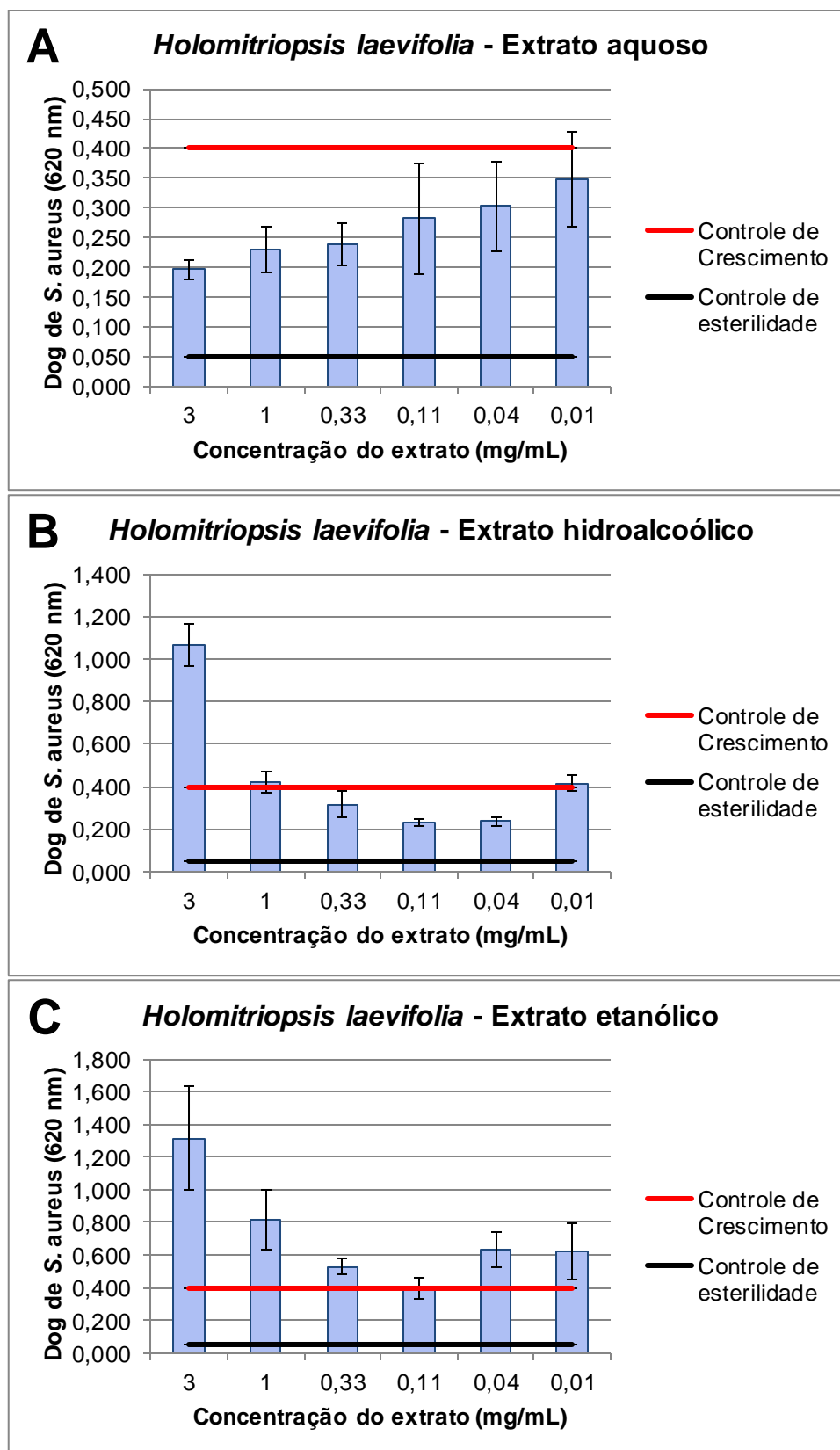


Figura 4 – Gráficos de absorvância do crescimento da cepa 25923 de *Staphylococcus aureus* em presença de concentrações dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico do musgo *Leucobryum laevifolium* (a barra de erros indica o desvio padrão das médias de três experimentos independentes).

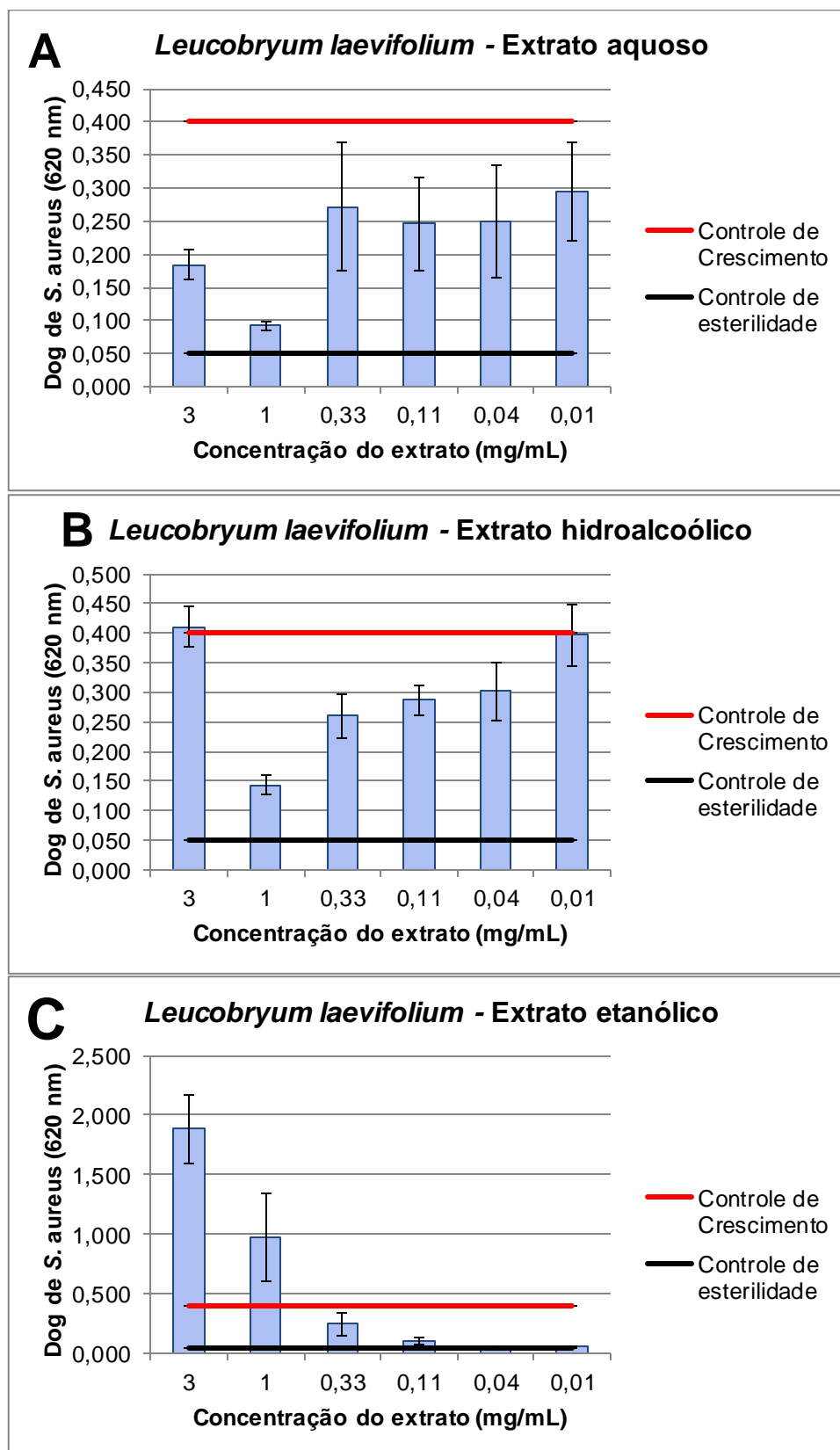


Tabela 6 – Avaliação do crescimento da amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922 exposta ao extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum*, e aos extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos dos musgos *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata*.

Crescimento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								
EA	BR	CN	3	1	0,33	0,11	0,04	0,01
<i>C. glutiniferum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. laevifolia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. laevifolium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. uncinata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
EH								
<i>H. laevifolia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. laevifolium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. uncinata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
EE								
<i>H. laevifolia</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. laevifolium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. uncinata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: BR - Branco (controle de esterilidade); CN – Controle Negativo de inibição do crescimento; EA – Extrato aquoso; EH – Extrato hidroalcoólico; EE – Extrato etanólico;

As concentrações dos extratos encontram-se em mg/mL.

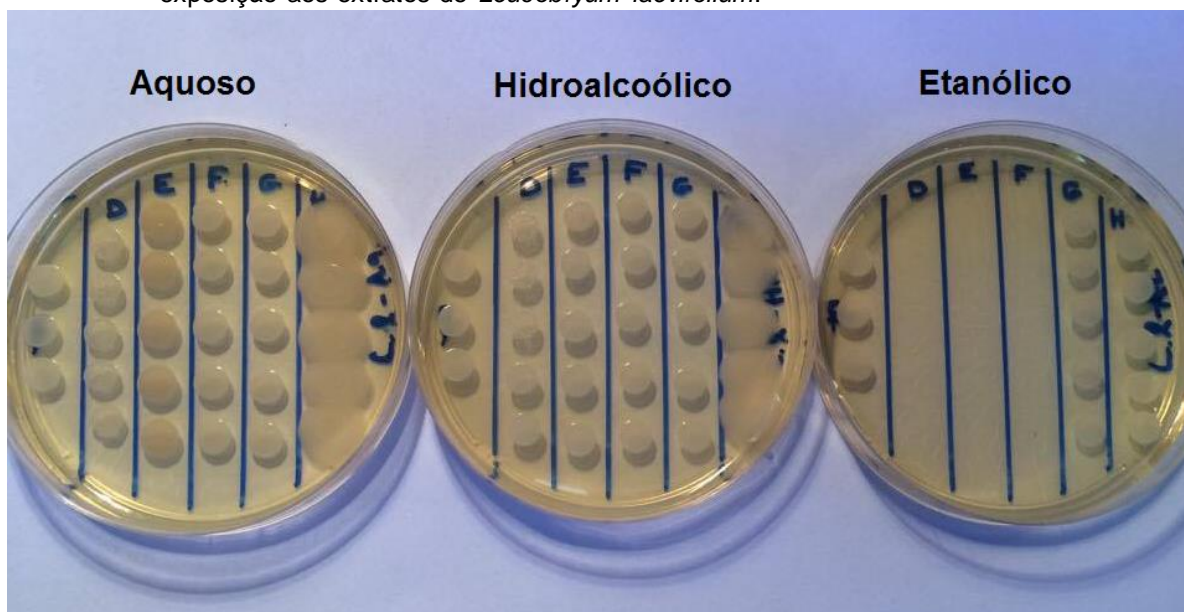
CMI dos controles de inibição: tetraciclina 0,3 µg/mL; ampicilina 3 µg/mL.

Categorias: Crescimento sem inibição: + (igual ou >80% do CN), inibição parcial: / (entre 10% e 80% do CN), inibição total do crescimento: - (<10% do CN ou semelhante a BR).

4.2 Avaliação do potencial bactericida

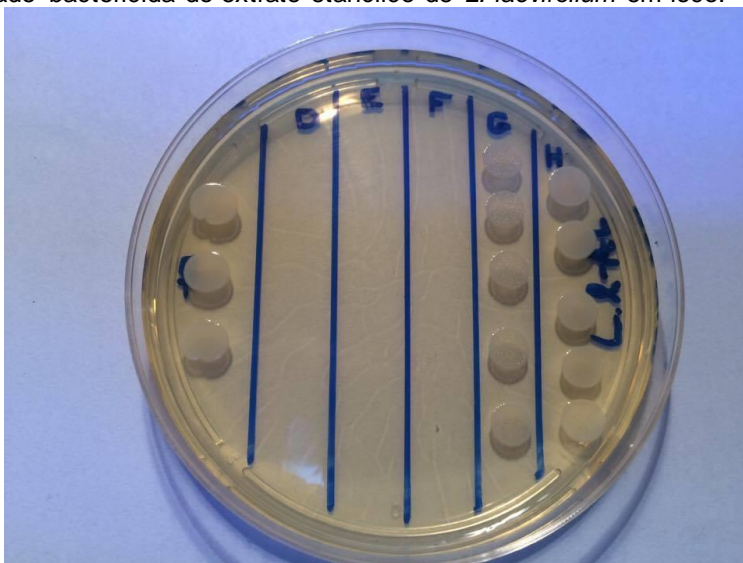
Foram selecionados para este experimento os extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico do musgo *Leucobryum laevifolium*, além dos extratos etanólicos de *Holomitriopsis laevifolia* e *Sanionia uncinata*.

Figura 5 – Comparação de culturas de *Staphylococcus aureus* semeadas em spots após exposição aos extratos de *Leucobryum laevifolium*.



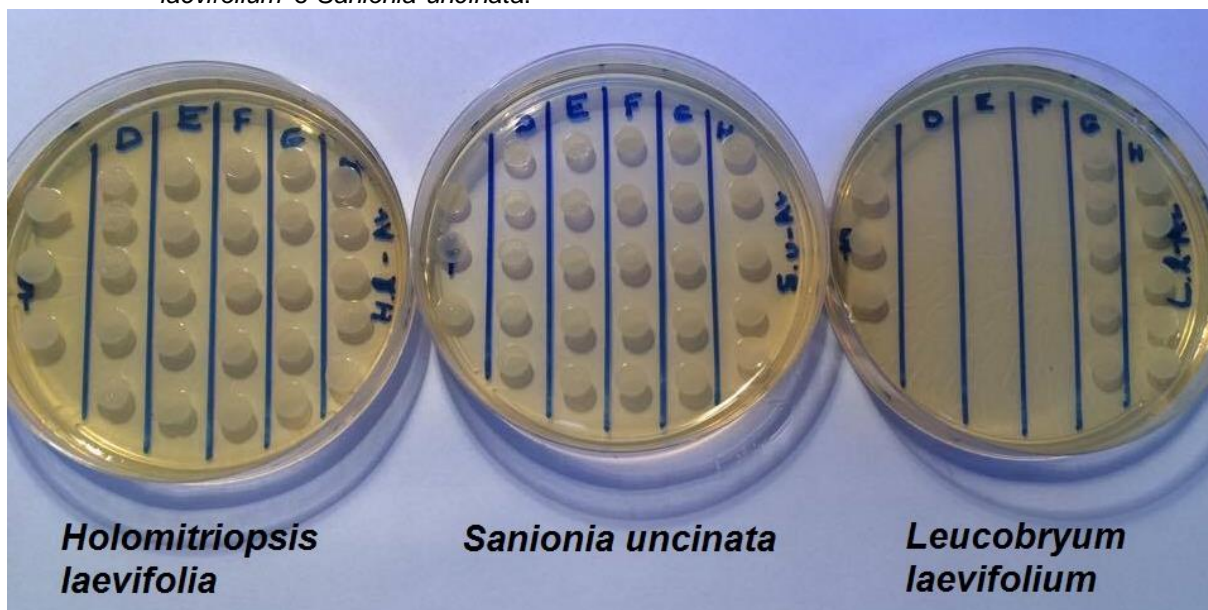
Legenda: 1ª coluna: CT – Controle positivo de crescimento. Concentrações (2ª coluna em diante): D – 1 mg/mL; E – 0,33 mg/mL; F – 0,11 mg/mL; G – 0,04 mg/mL; H – 0,01 mg/mL.

Figura 6– Atividade bactericida do extrato etanólico de *L. laevifolium* em foco.



Legenda: 1ª coluna: CT – Controle positivo de crescimento. Concentrações (2ª coluna em diante): D – 1 mg/mL; E – 0,33 mg/mL; F – 0,11 mg/mL; G – 0,04 mg/mL; H – 0,01 mg/mL.

Figura 7 - Comparação de culturas de *Staphylococcus aureus* semeadas em spots após exposição aos extratos etanólicos de *Holomitriopsis laevifolia*, *Leucobryum laevifolium* e *Sanionia uncinata*.



Legenda: 1ª coluna: CT – Controle positivo de crescimento.
Concentrações (2ª coluna em diante): D – 1 mg/mL; E – 0,33 mg/mL; F – 0,11 mg/mL; G – 0,04 mg/mL; H – 0,01 mg/mL.

5 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus e *Escherichia coli* são patógenos associados a uma grande diversidade de doenças nosocomiais, sendo frequentemente isolados de feridas cirúrgicas e de infecções envolvendo a colonização por estes de dispositivos médicos implantáveis como cateteres intravasculares e até próteses (RIBEIRO et al., 2012).

O uso indiscriminado e errôneo de antimicrobianos propicia a formação de populações destas e de outras espécies de bactérias que sejam resistentes aos tratamentos farmacológicos usuais. Esse efeito é potencializado no meio hospitalar e de cuidados domiciliares, onde os pacientes em geral se encontram debilitados, possivelmente imunodeprimidos e passando por tratamento medicamentoso. A vulnerabilidade destes pacientes em conjunto com a existência de populações de patógenos com amplo espectro de resistência à antimicrobianos resulta em um grande problema para a saúde pública, visto que a taxa de mortalidade destes quadros é alta, assim como o custo das internações e dos tratamentos (WHO, 2015).

Durante o período que estes pacientes estão hospitalizados é comum que esteja sendo realizada a administração de diferentes tipos de fármacos para os mais diversos fins, substâncias estas que podem interagir com a microbiota do paciente, assim como com o agente de uma infecção que esteja em curso no indivíduo através de efeitos pleiotrópicos do fármaco (LIAO; LAUFS, 2005). Essas interações podem ser de natureza neutra, não alterando o prognóstico do paciente, prejudicial, favorecendo o desenvolvimento do processo infeccioso ou benéfica, auxiliando na prevenção e/ou combate das infecções. O anti-inflamatório Diclofenaco de Sódio, por exemplo, estudado por VIANA et al., 2015, é capaz de exercer atividade antimicrobiana em *S. aureus*, porém provoca o estímulo da produção de biofilme quando em concentrações subinibitórias.

É importante que se tenha conhecimento das interações destes fármacos com as bactérias para que o tratamento dos pacientes seja mais seguro e eficiente, melhorando seu prognóstico e diminuindo tanto os gastos das internações, quanto a taxa de mortalidade destes casos (WHO, 2017).

Em paralelo aos fármacos, também é comum na população o uso de produtos de origem natural, em especial extratos de vegetais, para o tratamento dos mais variados males, ainda que muitas destas aplicações não possuam embasamento científico, apenas cultural. Em geral estes extratos são utilizados de forma bruta, não sendo realizados processos de purificação ou sequer tendo conhecimento das substâncias presentes, de dosagem e de possíveis efeitos adversos, podendo representar um risco à saúde quando empregados de forma irrestrita. No entanto, o estudo aprofundado de produtos de origem etnofarmacológica é uma vertente de grande interesse para a indústria farmacêutica e para a saúde de forma geral, tendo em vista o potencial destes como novas alternativas de tratamento, inclusive no âmbito de combate às infecções bacterianas (ELISABETSKY, 2003).

De acordo com este panorama, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano de uma seleção de representantes da classe de fármacos dos compostos heterocíclicos e de uma seleção de extratos de origem vegetal.

O teste de Concentração Mínima Inibitória em placas de microtitulação foi empregado neste estudo por ser considerado um modelo adequado para investigar o efeito de diferentes diluições de um determinado interferente sobre o crescimento de uma cultura bacteriana (CLSI, 2005). O resultado pode ser analisado tanto visualmente, quando espectrofotometricamente, sendo que a leitura espectrofotométrica analisa com maior precisão o quanto o crescimento daquela estirpe foi afetado por determinada concentração de interferente.

Neste estudo, foram empregadas duas cepas bacterianas de referência e alta relevância, representantes de grupos distintos, a gram-positiva ATCC 25923 de *S. aureus* e a Enterobacteriaceae gram-negativa ATCC 25922 de *E. coli*. Estes representantes foram selecionados para que fosse realizada a comparação da eficácia dos interferentes em duas espécies com características distintas, auxiliando estudos posteriores na identificação dos mecanismos de ação e aplicabilidade destas substâncias.

A Tetraciclina e a Ampicilina foram utilizadas como controle positivo da inibição do crescimento. As CMI's obtidas corresponderam aos valores de referência das amostras ATCC 25923 de *S. aureus* (TTC: 30 µg/mL; AMP: 0,05

µg/mL) (JAPONI et al., 2010; FOXLEY et al., 2016) e ATCC 25922 de *E. coli* (TTC: 0,3 µg/mL; AMP: 3 µg/mL) (EUROFINS, 2017).

A isoniazida, bem como seus derivados, não exerceu influência sobre o crescimento das culturas de *S. aureus*. A isoniazida é uma linezolidina utilizada como antimicrobiano no sistema RIPE de tratamento para a tuberculose, doença causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Cadernos de Atenção Básica, 2002), e este composto atua impedindo indiretamente a síntese dos ácidos micólicos, componente principal da parede celular destes micro-organismos. A não ocorrência de inibição do crescimento de *S. aureus* pode estar ligada à ausência de ácidos micólicos na constituição de sua parede celular, caracterizando, portanto, uma resistência intrínseca a este fármaco. Seguindo esta linha, o mesmo resultado era esperado em *E. coli*, porém a isoniazida e seu derivado BTI 026 exerceram inibição parcial do crescimento na concentração de 1000 µM. Este fenômeno é concordante com o observado por BRANCO, 2015, onde estes compostos apresentaram efeito tóxico em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, outra espécie membro das Enterobacteriaceae.

As Estatinas são medicamentos amplamente utilizados por uma grande parcela da população no combate à hipercolesterolemia, e possuem uma série de efeitos pleiotrópicos incluindo potenciais antifúngico (GALGÓCZY et al., 2011) e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* (JERWOOD; COHEN, 2008) e *E. coli*, sendo este efeito observado com maior intensidade na atorvastatina (MASADEH et al., 2012). Um estudo anterior de ARAUJO-LIMA, 2014, aponta os derivados P9 e P10 como sendo citotóxicos para *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, em teste de Ames. A atorvastatina, assim como seus derivados, não exerceu influência sobre o crescimento das culturas de *S. aureus* e de *E. coli* no presente estudo, informação esta que se mostra discordante da literatura mencionada acima.

O extrato aquoso do vegetal *Cyrtopodium glutiniferum* não exerceu influência sobre o crescimento das culturas de *S. aureus* e *E. coli*. Este resultado é concordante com COSCARELLA, 2015, onde este mesmo extrato foi submetido ao Teste de Ames e não apresentou efeito tóxico nas cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Embora extratos vegetais do gênero *Cyrtopodium* sejam comercializados em forma de pomada pelo seu efeito anti-

inflamatório e recomendados para o tratamento de furúnculos, enfermidade esta causada por *S. aureus* (IBLER; KROMANN, 2014), não foi constatada atividade antimicrobiana associada a este extrato.

Em relação ao musgo amazônico *Holomitriopsis laevifolia*, foi observada inibição parcial do crescimento de *S. aureus* nos extratos aquoso, concentrações de 0,04 mg/mL a 3 mg/mL, e hidroalcoólico, concentrações de 0,04 mg/mL e 0,11 mg/mL. FERNANDES, 2015, observou atividade citotóxica nos extratos hidroalcoólico e etanólico desta espécie em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, porém não no extrato aquoso, Na Figura 3 é possível observar que a curva de absorvância dos extratos hidroalcoólico e etanólico desta espécie não se comportam de maneira típica, reta crescente, e sim formam uma parábola positiva decorrente do alto valor de densidade óptica das diluições mais concentradas dos extratos. Este fenômeno ocorre devido à uma incapacidade do aparelho utilizado em diferenciar, neste comprimento de onda, a turbidez causada pela densidade celular do meio (crescimento bacteriano) da forte coloração esverdeada dos extratos mais concentrados. Levando este fenômeno em conta, é provável que tenha ocorrido inibição parcial do crescimento também nas concentrações de 0,33 mg/mL a 3 mg/mL nos extratos hidroalcoólico e etanólico. Não foi observado qualquer efeito inibitório em *E. coli*.

O segundo representante dos musgos amazônicos, *Leucobryum laevifolium*, foi o mais promissor, sendo observada inibição parcial do crescimento de *S. aureus* em todas as concentrações do extrato aquoso (0,01 mg/mL a 3 mg/mL), e nas concentrações de 0,04 mg/mL a 1 mg/mL do extrato hidroalcoólico. No extrato etanólico, ocorreu inibição parcial do crescimento em 0,11 mg/mL e 0,33 mg/mL, e inibição total do crescimento em 0,01 mg/mL e 0,04 mg/mL, obtendo-se a CMI em 0,01 mg/mL. O mesmo fenômeno de distorção da curva espectrofotométrica mencionado anteriormente ocorre também nos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *L. laevifolium* (Figura 4), levando a crer que também tenha ocorrido inibição do crescimento bacteriano em 3 mg/mL (EH) e que as concentrações de 0,11 mg/mL a 3 mg/mL (EE) também caracterizem inibição total. O teste de investigação do potencial bactericida destes extratos revelou que o efeito é dependente da dose e da forma de extração do musgo. Estes resultados são concordantes

com FERNANDES, 2015, quanto aos extratos hidroalcoólico e etanólico, nos quais foi observado efeito citotóxico, no entanto discordam quanto a atividade antimicrobiana do extrato aquoso. Nos extratos aquoso e hidroalcoólico de *L. laevifolium* foi observado um estímulo do crescimento bacteriano na concentração mais baixa testada, 0,01 mg/mL (Figura 5). Este fenômeno provavelmente se deve a presença de resíduos de glicose nestes extratos, estimulando o aumento da população bacteriana. Nas concentrações maiores, ainda que a glicose também esteja presente, o(s) componente(s) do extrato com atividade inibitória superam este estímulo. No extrato etanólico de *L. laevifolium* foi observado crescimento bacteriano apenas nas duas concentrações mais baixas, 0,01 mg/mL e 0,04 mg/mL (Figura 6). Esse dado em conjunto com a espectrofotometria mostra que nestas duas concentrações menores ocorre efeito bacteriostático, enquanto nas concentrações a partir de 0,11 mg/mL este extrato alcoólico exerce efeito bactericida. A comparação entre os extratos alcoólicos dos três musgos utilizados neste estudo revelam que o efeito inibitório não está associado à metodologia aplicada (Figura 7). Não foi observado qualquer efeito inibitório em *E. coli*.

O musgo de origem Antártica, *Sanionia uncinata*, não exerceu efeito inibitório em nenhum dos seus extratos, tanto em *S. aureus*, quanto em *E. coli*. Supõe-se que esta divergência em relação aos musgos amazônicos esteja ligada ao ecossistema nativo destas espécies. Por estarem inseridos em um habitat mais diversificado e, portanto, de maior competição entre espécies, os musgos amazônicos teriam sido direcionados evolutivamente para a produção de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de micro-organismos, a exemplo do que ocorre com os fungos do gênero *Penicillium* (ACS, 2017).

Acerca da ineficácia dos extratos dos musgos *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* em inibir o crescimento de *E. coli*, diferentemente do que foi observado em *S. aureus*, supõe-se que esta divergência esteja associada à composição das paredes celulares destas duas espécies. As bactérias gram-positivas possuem uma parcela muito maior de sua parede composta por peptídeoglicanos, enquanto nas gram-negativas este componente está presente em proporção muito menor. Esta diferença pode influenciar tanto diretamente, tornando ineficaz o interferente, ou indiretamente, agindo como barreira física para impedir a entrada do interferente na célula.

6 CONCLUSÕES

- Os compostos heterocíclicos atorvastatina e seus respectivos derivados, bem como o derivado PFTI 00712 de isoniazida e o extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum* não demonstraram atividade bacteriostática ou bactericida relevantes detectável com a metodologia aplicada nas condições de teste.
- A isoniazida e seu derivado BTI 026 foram capazes de provocar inibição parcial do crescimento de *E. coli* na concentração de 1000 µM.
- Foi observada inibição parcial do crescimento de *S. aureus* nos extratos aquoso e hidroalcoólico, de 0,04 mg/mL a 3 mg/mL, e no extrato etanólico, de 0,33 mg/mL a 3 mg/mL do musgo *Holomitriopsis laevifolia*.
- O extrato aquoso do musgo *Leucobryum laevifolium* demonstrou inibição parcial do crescimento de *S. aureus* em todas as concentrações testadas, de 0,01 mg/mL a 3 mg/mL.
- O extrato hidroalcoólico do musgo *Leucobryum laevifolium* demonstrou inibição parcial do crescimento de *S. aureus* nas concentrações de 0,04 mg/mL a 3 mg/mL.
- O extrato etanólico do musgo *Leucobryum laevifolium* demonstrou atividade **bacteriostática** nas concentrações de 0,01 mg/mL e 0,04 mg/mL, e atividade **bactericida** nas concentrações de 0,11 mg/mL a 3 mg/mL, sendo a CMI obtida em 0,01 mg/mL.
- Os extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico do musgo *Sanionia uncinata* não exerceram atividade inibitória do crescimento bacteriano.
- Nenhum dos extratos naturais exerceu efeito inibitório em *E. coli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Chemical Society, Discovery and Development of Penicillin.

Disponível em:

<<https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>>. Acesso em 12 de maio de 2017.

ANDRADE, S. S.; SADER, H. S.; JONES, R. N.; PEREIRA, A. S.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: Time for local guidelines? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 7, p. 741–748, 2006.

ANVISA. Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. v. 37, p. 58, 2006. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf>.

Acesso em 20 de junho de 2017.

ANVISA. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde(2016-2020). 2016. Disponível em:

<www.anvisa.gov.br>. Acesso em 10 de maio de 2017.

ARAUJO-LIMA, C. F. Investigação da atividade toxicológica de análogos da atorvastatina em modelos experimentais *in vitro*. Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações, 2014. Disponível em:

<http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UERJ_2cb354e2e5e9251f7047f9905741fac3> Acesso em 30 de junho de 2017.

ÁVILA-CAMPOS, M. J.; Beta-lactamases: Sua importância na resistência bacteriana. Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo.

Disponível em: <

http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=57&lang=en>. Acesso em 20 de junho de 2017.

BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: an introduction. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 69, n. 1948, p. 1S–8S, 1990.

BAYER Jovens, Um santo remédio chamado salicina. Disponível em: <
<https://www.bayerjovens.com.br/pt/colunas/coluna/?materia=um-santo-remedio-chamado-salicina>>. Acesso em 10 de maio de 2017.

BENTLEY, R.; MEGANATHAN, R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews*, v. 46, n. 3, p. 241–280, 1982.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 8, p. 4302–4311, 2002.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): principal virulence factors and epidemiology. *Semina: Ciencia Biológica e da Saúde*, v. 28, p. 81–92, 2007.

BRANCO, F. S. C. A Tuberculose e a doença de Chagas. Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro. p. 1–743, 2015.

BRENNER, D.; KRIEG, N.; STALEY, J.; GARRITY, G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria Part B*. 2 ed. Nova Iorque: Springer, p. 607-624, 2005.

Ministério da Saúde - Cadernos de Atenção Básica, 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_controle_tuberculos_e_cab6.pdf>. Acesso em 20 de junho de 2017.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 425–430, abr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200033&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. *Staphylococci*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, n. SUPPL. 3, p. S23–S32, 2007.

CDC - Centers of Disease Control and Prevention. HAI Data and Statistics 2016. Disponível em <<https://www.cdc.gov/hai/surveillance/>>. Acesso em 4 de maio de 2017.

CDC - Centers of Disease Control and Prevention, *E. coli (Escherichia coli)*, 2017. Disponível em <<https://www.cdc.gov/ecoli/index.html/>>. Acesso em 7 de maio de 2017.

CHOI, S.; JUNG, J.; JEON, C. O.; PARK, W. Comparative genomic and transcriptomic analyses of NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp. OJ82 isolated from fermented seafood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 2, p. 807–822, 18 jan. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5436-2>>.

CHRISTENSON, J. C. *Salmonella* Infections. *Pediatrics in Review*, v. 34, n. 9, p. 375–383, 2013. Disponível em: <<http://pedsinreview.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/pir.34-9-375>>.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society of Microbiology, 2005.

- COSCARELLA, I. L.; ARAÚJO-LIMA, C. F.; AIUB, C. A. F.; MACEDO, A. F. Avaliação toxicológica do extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum*. In: 14a. Jornada de Iniciação Científica UNIRIO, 2015, Rio de Janeiro.
- CZIROK, E.; SEMJEN, G.; STEINRUCK, H.; HERPAY, M.; MILCH, H.; NYOMARKAY, I.; STVERTECZKY, Z.; SZENESS, A. Comparison of rapid methods for detection of heat-labile (LT) and heat-stable (ST) enterotoxin in *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 398–402, 1992.
- DE OLIVEIRA, A. C.; DE PAULA, A. O. Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: Indicações, vantagens e limitações. *Texto e Contexto Enfermagem*, v. 21, n. 2, p. 448–457, 2012.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, n. 2, p. 167–19, 2002.
- DOS SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C., FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol. 43, n. 6, 2007.
- ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. *Ciencia e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 35–36, 2003. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252003000300021&script=sci_arttext&tlng=en>.
- Eurofins Pharma Discovery Services, Anti-infective Gram Negative. Disponível em: <<https://www.eurofinspanlabs.com/Catalog/Products/ProductDetails.aspx?prodId=hmcuYEF05c%3D>>. Acesso em 17 de abril de 2017.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47, 590-592. Disponível em:

<<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em 7 de maio de 2017.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47, 590-592. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/allnamesdl.html>>. Acesso em 7 de maio de 2017.

FERNANDES, A. S. Avaliação do potencial fotoprotetor de extratos de musgos e investigação de seus riscos toxicológicos. Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações, 2015. Disponível em: < http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UERJ_eb245b5bfa20fd177ebcdb2ac0717b9a> Acesso em 15 de maio de 2017.

FOXLEY, M. A.; FRIEDLINE, A. W.; JENSEN, J. M.; NIMMO, S. L.; ERIN, M.; KING, J. R.; STRANGE, S.; XIAO, M.; SMITH, B. E.; THOMAS, K. J.; GLATZHOFFER, D. T.; CICHEWICZ, R. H.; RICE, C. V.; NOBLE, R.; LYNN, G.; HALL, C.; OVAL, V. V. HHS Public Access. v. 69, n. 12, p. 871–878, 2016.

FREDERICK, J. E.; QU, Z.; BOOTH, C. R. Ultraviolet Radiation at Sites on the Antarctic Coast. Photochemistry and photobiology, v. 68, n. 2, p. 183–190, 1998.

FREITAS, E. Detecção de Genes de Enterotoxinas de *Staphylococcus spp.* Isolados de Queijo Minas Frescal. FIOCRUZ, p. 1–106, 2005.

GALGÓCZY, L.; NYILASI, I.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. Statins as antifungal agents. World Journal of Clinical Infectious Diseases, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-3176/full/v1/i1/4.htm>>.

- GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. S5, p. S350–S359, jun. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/533591>>.
- GRAZIANO, T. S.; CUZZULLIN, M. C.; FRANCO, G. C.; SCHWARTZ-FILHO, H. O.; DE ANDRADE, E. D.; GROPPPO, F. C.; COGO-MÜLLER, K. Statins and antimicrobial effects: Simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, 2015
- HO, J.; BOOST, M.; O'DONOGHUE, M. Prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* colonising food handlers: does nasal carriage status matter? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 34, n. 11, p. 2177–2181, 2015.
- HOERLLE, J. L. Caracterização da susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus aureus* do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Divina Providência. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- IBLER, K. S.; KROMANN, C. B. Recurrent furunculosis – challenges and management: a review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, vol. 7, p. 59-64, 2014.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Exposição Solar. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/prevencao-fatores-de-risco/exposicao_solar>. Acesso em 15 de maio de 2017.
- JAPONI, A.; ZIYAEEYAN, M.; JMALIDOUST, M.; FARSHAD, S.; ALBORZI, A.; RAFAATPOUR, N.; BADIEE, P. Antibacterial susceptibility patterns and cross-resistance of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolated

from the hospitalized patients in shiraz, iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 567–573, 2010.

JARVIS, W. R.; MARTONE, W. J. Predominant pathogens in hospital infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 29, 1992.

JERWOOD, S.; COHEN, J. Unexpected antimicrobial effect of statins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, n. 2, p. 362–364, 2008.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E. Erythema UV-B exposure near the Antarctic Peninsula and comparison with an equatorial site. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 60, n. 2–3, p. 102–107, 2001.

KOH, C. L.; SAM, C. K.; YIN, W. F.; TAN, L. Y.; KRISHNAN, T.; CHONG, Y. M.; CHAN, K. G. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 13, n. 5, p. 6217–6228, 2013.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*, v. 8, n. 3, p. 1–21, 2016.

KUSKUCU, M. A.; KARAKULLUKCU, A.; AILIKEN, M.; OTLU, B.; METE, B.; AYGUN, G. Investigation of carbapenem resistance and the first identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme among *Escherichia coli* isolates in Turkey: A prospective study. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 14, n. 6, p. 572–576, nov. 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893916301727>>.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. In: *Life Science Journal*. [s.l.: s.n.]6p. 3–32.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 89-118, 2005.

LOPEZ-VAZQUEZ, P.; VAZQUEZ-LAGO, J. M.; FIGUEIRAS, A. Misprescription of antibiotics in primary care: a critical systematic review of its determinants.

Journal of Evaluation in Clinical Practice, v. 18, n. 2, p. 473–484, abr. 2012.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2753.2010.01610.x>>.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, 1983.

MASADEH, M.; MHAIDAT, N.; ALZOUBI, K.; AL-AZZAM, S.; ALNASSER, Z. Antibacterial activity of statins: a comparative study of Atorvastatin, Simvastatin, and Rosuvastatin. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v. 11, p. 13, 2012.

MICHELACCI, V.; PROSEDA, G.; MAUGLIANI, A.; TOZZOLI, R.; SANCHEZ, S.; HERRERA-LEÓN, S.; DALLMAN, T.; JENKINS, C.; CAPRIOLI, A.;

MORABITO, S. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. Clinical Microbiology and Infection, v. 22, n. 3, p. 287.e11-287.e19, mar. 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.025>>.

MOHR, J. F.; MURRAY, B. E. Point: Vancomycin is not obsolete for the treatment of infection caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Clinical Infectious Diseases, v. 44, n. 12, p. 1536–1542, 15 jun. 2007.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/518451>>.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation research*, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 20 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113466>>.

MÜHLDORFER, I.; HACKER, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis*, 1994. .

OBRIG, T. G. *Escherichia coli* shiga toxin mechanisms of action in renal disease. *Toxins*, v. 2, n. 12, p. 2769–2794, 2010.

WHO – World Health Organization, Health care-associated infections FACT SHEET, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf>. Acesso em 03 de maio de 2017.

WHO – World Health Organization, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em 28 de junho de 2017.

PADILHA, A. R. S. Ministério da Saúde, Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em 7 de maio de 2017.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. *Revista de Saude Publica*, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

RIBEIRO, M.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter*, v. 2(4), p. 176-194, 2012.

SILVA, A. G. Os sumarés cicatrizantes da medicina tradicional brasileira ou as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). v. 11, p. 152–154, 2013.

SILVA, C. A. da; YAMANAKA, E. H. U.; MONTEIRO, C. S. Monitoramento microbiológico da água de bicas em parques públicos de Curitiba (PR). Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 22, n. 2, p. 271–275, abr. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522017000200271&lng=pt&tlng=pt>.

SUAREZ, J.; RANGUELOVA, K.; JARZECKI, A. A.; MANZEROVA, J.; KRYMOV, V.; ZHAO, X.; YU, S.; METLITSKY, L.; GERFEN, G. J.; MAGLIOZZO, R. S. An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). Journal of Biological Chemistry, v. 284, n. 11, p. 7017–7029, 2009.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000200015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

UD-DIN, A.; WAHID, S. Relationship among *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. Brazilian Journal of Microbiology, v. 45, n. 4, p. 1131–1138, dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822014000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

VARGAS, T. C.; LIMBERGER, J. B. Tratamento Farmacológico Com Estatinas. *Disciplinarum Scientia*, v. 14, n. 2, p. 175–187, 2013.

VIANA, A. S.; SARAMAGO, C. S. M.; BENTO, C. A. M.; SOUZA, M. J.; SILVA FILHO, R. G.; SILVA, A. A. L. Efeito do Diclofenaco de Sódio sobre a produção de biofilme em amostras de *Staphylococcus aureus*. In: 14a. Jornada de Iniciação Científica UNIRIO, 2015, Rio de Janeiro.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus Aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 1, p. 11–16, 2001.

VOTINTSEVA, A.; FUNG, R.; MILLER, R. R.; KNOX, K.; GODWIN, H.; WYLLIE, D. H.; BOWDEN, R.; CROOK, D. W.; WALKER, S. Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (spa) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 63, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4007515&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

WELLS, B. G.; DIPIRO, J. T.; SCHWINGHAMMER, T. L.; DIPIRO, C. V. *Manual de Farmacoterapia*, São Paulo, SP: Editora McGraw Hill, 9ª ed., 2006.

WOERTHER, P.-L.; ANDREMONT, A.; KANTELE, A. Travel-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae: impact of colonization at individual and community level. *Journal of Travel Medicine*, v. 24, n. suppl_1, p. S29–S34, abr. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jtm/article-lookup/doi/10.1093/jtm/taw101>>.