



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR  
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

JACQUELINE COSMO ANDRADE

**AVALIAÇÃO *In Vitro* DO POTENCIAL MODULADOR DAS  
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COLECALCIFEROL, ALFA-  
TOCOFEROL E MENADIONA**

**CRATO - CE**

**2013**

JACQUELINE COSMO ANDRADE

**AVALIAÇÃO *In Vitro* DO POTENCIAL MODULADOR DAS  
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COLECALCIFEROL, ALFA-  
TOCOFEROL E MENADIONA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós –  
Graduação em Bioprospecção Molecular da  
Universidade Regional do Cariri como requisito  
para obtenção do título de Mestre em  
Bioprospecção Molecular (Linha de pesquisa:  
Bioprospecção de Produtos Naturais e  
Microbiologia).

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

CRATO – CE

2013

JACQUELINE COSMO ANDRADE

**AVALIAÇÃO *In Vitro* DO POTENCIAL MODULADOR DAS  
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COLECALCIFEROL, ALFA-  
TOCOFEROL E MENADIONA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Dissertação apresentada em: 25 / 02 / 2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** (Orientador)  
Departamento de Química Biológica – URCA

---

**Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes** (Avaliador interno)  
Departamento de Química Biológica – URCA

---

**Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araujo** (Avaliador externo)  
Universidade Federal de Sergipe – UFS

---

**Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf** (Avaliador interno-suplente)  
Departamento de Química Biológica – URCA

CRATO – CE

2013

---

Andrade, Jacqueline Cosmo.  
A553 Avaliação *In Vitro* do potencial modulador das vitaminas lipossolúveis colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona/ Jacqueline Cosmo Andrade. - Crato-CE, 2013  
170p.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. Atividade Antimicrobiana; 2. Lipossolubilidade;
3. Modulação; 4. Resistência Microbiana;
5. Vitaminas Lipossolúveis I. Título.

CDD: 615.328

---

Dedico a meus anjos da guarda: minha mãe **Maria José Andrade Lourenço**, a minha tia *Damiana Andrade Lourenço*, minha avó **Maria das Dores Andrade** (*In memorium*). “*O mais sublime quanto ao sentimento materno é ser integralmente MÃE de filho de ventre alheio.*” E meu marido **Helder Beserra dos Santos**. Sem vocês não conseguiria... Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, a força superior que nos move, nos guia, nos ampara nas horas difíceis, e sempre lembra que nada é impossível. *“Deus, tu podes tudo!”*

A **minha mãe** Maria José Andrade Lourenço e **minha tia** Damiana Andrade Lourenço, pelo carinho, pelas renúncias, pela confiança, dedicação, colo e pelos conselhos. Obrigada pelo amor incondicional e por serem responsáveis por tudo que tenho e sou!

A **meu marido**, Helder Beserra dos Santos pelo amor, companheirismo, apoio, incentivo, amizade e por sempre acreditar que consigo. Eu te Amo!

A **minha Família**, pelo apoio empenhado em cada iniciativa tomada e cada caminho escolhido.

A **meu orientador**, Dr. Henrique Melo Coutinho, por me dar a oportunidade, de participar de um dos seus projetos. Por toda a atenção, confiança, ensinamento, paciência e amizade.

Ao Professor Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, pelas contribuições e pela disponibilidade.

A banca de defesa: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araujo e Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça pela disponibilidade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelos conhecimentos transmitidos!

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, à Coordenadora Profa. Dra. Marta Maria Almeida de Souza e Vice-Coordenadora Profa. Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva. E às secretárias Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, por todos os serviços prestados.

Aos **meus amigos**, por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, pela amizade.

**Aos meus amigos do LMBM**, Saulo Relison, Audilene Freitas, Elba Sobral, Edinaldo, Katiúcia Santos, Liscássia Beatriz, Nadghia Leite, Natália Gondim, Francisco Cunha, Ivanildo Pinho, Dara Isabel, Karyzia Lima, Rosimeire Sabino e João Victor pela ótima convivência, pela amizade, apoio e pelas horas de descontração no laboratório. Em especial Flaviana Moraes e Glaucia Guedes pela amizade, disponibilidade de me ajudar sempre, incentivo, sábios conselhos e competência. Adoro cada um!

A Gillena Maria pelo carinho, disponibilidade, apoio, lealdade, amizade e ensinamentos. Uma grande amiga.

Aos amigos do Mestrado, pela amizade, e todo enriquecimento pessoal e profissional, em especial Anita Oliveira e Renata Sampaio.

A FUNCAP, CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento das pesquisas.

A URCA por ceder o espaço para a realização deste trabalho.

Sem o apoio de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

*Muito Obrigada.*

*"De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que ele estava sempre começando,  
A certeza de que era preciso continuar e  
A certeza de que seria interrompido antes de terminar.  
Fazer da interrupção um caminho novo.  
Fazer da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada, do sono uma ponte,  
Da procura um encontro".*

*Fernando Sabino*



## RESUMO

Vitaminas são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades e de extrema importância para o funcionamento do organismo, são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis. As vitaminas lipossolúveis têm merecido destaque em relação a suas atividades biológicas. O caráter lipossolúvel dessas vitaminas pode modificar a permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antimicrobianas, sendo uma possível alternativa para modificação da resistência bacteriana. Alguns estudos relatam que compostos menos polares são mais efetivos, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à presença de cadeias polissacarídeos, que atuam como barreira para compostos hidrofóbicos ativos na membrana. Neste estudo, as vitaminas lipossolúveis: Colecalciferol (vitamina D), Alfa-tocoferol (Vitamina E) e Menadiona (Vitamina K), foram utilizadas com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana bem como seu potencial modulador, dependente de dose. Além de comparar sua ação moduladora com o colesterol e ergosterol. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a atividade antibacteriana e antifúngica, frente às linhagens padrões fúngicas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* e as bacterianas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade moduladora realizada em associação com aminoglicosídeos e antifúngicos contra as linhagens fúngicas padrões e as multiresistentes *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para todos os microrganismos foi  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , com exceção a menadiona frente às bactérias, com CIM de  $64 \mu\text{g/mL}$ . Foi possível observar a potencialização dos antibióticos, principalmente quando a concentração das vitaminas era aumentada. Entretanto não houve modulação dos antifúngicos. As soluções de colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona demonstraram resultados clinicamente relevantes, à modulação de aminoglicosídeos, sobre bactérias multiresistentes. O que representa uma alternativa interessante contra a crescente resistência bacteriana, uma vez que as vitaminas lipossolúveis estão presentes na alimentação, e não apresentam toxicidade ao organismo humano. Sobretudo, estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para verificar a biodisponibilidade e os mecanismos de ação envolvidos nessa interação.

**Palavras-chave:** Atividade Antimicrobiana, Lipossolubilidade, Modulação, Resistência Microbiana, Vitaminas lipossolúveis.

## ABSTRACT

Vitamins are organic substances present in many foods in small quantities and of extreme importance for the functioning of the body, they are classified into fat soluble and water soluble. Fat-soluble vitamins have been highlighted in relation to their biological activities. The lipid-soluble nature of these vitamins can modify the plasma membrane permeability on microorganisms, making them more susceptible to penetration of substances, especially antimicrobial, being a possible alternative to modification of bacterial resistance. Some studies report that less polar compounds are more effective against gram-positive and gram-negative bacteria due to the presence of polysaccharide chains, which act as a barrier to hydrophobic compounds active on the membrane. In this study, fat-soluble vitamins: Cholecalciferol (vitamin D), Alpha-tocopherol (Vitamin E) and Menadione (Vitamin K), were used to evaluate the antimicrobial activity as well as its potential modulator, depending on the dose. Besides comparing their modulating action with cholesterol and ergosterol. The broth microdilution method was used to determine the antibacterial and antifungal activity, compared to the standard fungal strains of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* and bacterial *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. And the modulating activity performed in combination with aminoglycosides and antifungal agents against standard fungal strains and multiresistant *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* and *E. coli* 27. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of all microorganisms was  $\geq 1024$  mg / mL, the only exception being the menadione on the bacteria, with MICs of 64 mg / mL. It was possible to observe the potentiation of antibiotics, especially when the concentration of vitamins was increased. However there was no modulation of antifungals. The solutions of cholecalciferol, alpha-tocopherol and menadione demonstrated clinically relevant results to the modulation of aminoglycosides on multiresistant bacteria. This represents an interesting alternative against the increasing bacterial resistance, since the fat-soluble vitamins are present in the feed, and do not exhibit toxicity to the human body. Above all, preclinical and clinical studies are required to assess the bioavailability and the mechanisms of action involved in this interaction.

**Keywords:** Antimicrobial Activity. Liposolubility. Modulation. Microbial Resistance. Fat-soluble vitamins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1:</b> Visão geral da biossíntese dos isoprenóides.....	26
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular plana das três moléculas biologicamente ativas da vitamina – Retinol; 2 – Retinal (trans-retinal) e 3 – Ácido Retinóico.....	27
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular plana do 1 – Colecalciferol ou vitamina D <sub>3</sub> , 2 – Ergocalciferol ou vitamina D <sub>2</sub> .....	28
<b>Figura 4:</b> Produção e Metabolismo da vitamina D.....	29
<b>Figura 5:</b> Estrutura molecular plana das isoformas dos grupos 1- Tocoferol e 2- Tocotrienóis.....	31
<b>Figura 6:</b> Estrutura molecular plana do $\alpha$ – tocoferol (Vitamina E).....	32
<b>Figura 7:</b> Estrutura molecular plana das formas biologicamente ativas da vitamina K: 1- Filoquinona, 2- Menadiona, 3- Menaquinona.....	34
<b>Figura 8:</b> Estrutura molecular plana do Colesterol.....	36
<b>Figura 9:</b> Resumo da Via Biossintética do Colesterol.....	37
<b>Figura 10:</b> Resumo da Via Biossintética do Ergosterol.....	38
<b>Figura 11:</b> Estrutura molecular plana do Ergosterol.....	39
<b>Figura 12:</b> Modelo do mosaico fluido das membranas biológicas. Eucariótica (1); Procariótica (2) ausência de esteroides.....	42
<b>Figura 13:</b> Diferenças morfológicas das bactérias Gram-negativas e Gram-positiva.....	45
<b>Figura 14:</b> Imagens bactérias: A) <i>Staphylococcus aureus</i> ; B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; C) <i>Escherichia coli</i> ; D) <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	49
<b>Figura 15:</b> Leveduras gênero <i>candida</i> : A) <i>Candida albicans</i> ; B) <i>Candida krusei</i> ; C) <i>Candida tropicalis</i> .....	52
<b>Figura 16:</b> Mecanismos Genéticos de Transferência da Resistência Bacteriana 1) Transformação, 2) Conjugação, 3) Transdução.....	55
<b>Figura 17:</b> Mecanismos bioquímicos da resistência bacteriana.....	56
<b>Figura 18:</b> Representação da placa do teste Concentração Inibitória Mínima (CIM), sentido numérico para preenchimento, variação de concentrações (512 a 8 $\mu\text{g/mL}$ ), leitura através da mudança de coloração: azul: inibição de crescimento, rosa: crescimento.....	64

<b>Figura 19:</b> Representação da placa do teste de modulação de aminoglicosídeos, sentido alfabético para preenchimento, variação de concentrações (2500 a 2,5 µg/mL), leitura através da mudança de coloração: azul: inibição de crescimento, rosa: crescimento.....	65
5.1 Uso de colecalciferol como agente modulador de aminoglicosídeos frente à linhagens bacterianas multiresistentes.	
<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular plana de Colecalciferol.....	70
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular plana do 1. Colesterol e 2. Ergosterol.....	71
<b>Figura 3:</b> Comparação do número de eventos modulador das concentrações subinibitórias MIC/8, MIC/4, MIC/2 entre as soluções de Colecalciferol, colesterol e ergosterol.....	75
5.2 Análise “ <i>in vitro</i> ” da modulação de aminoglicosídeos por alfa-tocoferol frente à linhagens bacterianas multiresistentes	
<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular plana do Alfa-tocoferol.....	85
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular plana do 1. Colesterol e 2. Ergosterol.....	86
<b>Figura 3:</b> Comparação do número de eventos modulador das concentrações subinibitórias MIC/8, MIC/4, MIC/2 entre as soluções de Alfa-tocoferol, colesterol e ergosterol.....	90
5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora de menadiona sobre cepas bacterianas multiresistentes	
<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular plana do Menadiona.....	101
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular plana do 1. Colesterol e 2. Ergosterol.....	101
<b>Figura 3:</b> Comparação do número de eventos modulador das concentrações subinibitórias MIC/8, MIC/4, MIC/2 entre as soluções de menadiona, colesterol e ergosterol.....	106
5.4 Efeito modulador das vitaminas lipossolúveis sobre <i>candida</i> spp	
<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular plana das Vitaminas Lipossolúveis.....	115
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular plana do 1. Colesterol e 2. Ergosterol.....	116

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades químicas das vitaminas lipossolúveis Colecalciferol, (+)- $\alpha$ Tocoferol, Menadiona e do colesterol e ergosterol.....	60
<b>Tabela 2:</b> Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência das bactérias a antibióticos.....	61
5.1 Uso de colecalciferol como agente modulador de aminoglicosídeos frente à linhagens bacterianas multiresistentes.	
<b>Tabela 1:</b> Perfil de resistência das bactérias a antibióticos.....	80
<b>Tabela 2:</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) de colecalciferol, vitamina D <sub>3</sub> sobre cepas microbianas originárias da ATCC.....	81
<b>Tabela 3:</b> Atividade moduladora do colecalciferol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	81
<b>Tabela 4:</b> Atividade moduladora do colesterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	82
<b>Tabela 5:</b> Atividade moduladora do ergosterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	82
5.2 Análise “ <i>in vitro</i> ” da modulação de aminoglicosídeos por alfa-tocoferol frente à linhagens bacterianas multiresistentes	
<b>Tabela 1:</b> Perfil de resistência das bactérias a antibióticos.....	96
<b>Tabela 2:</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) de alfa-tocoferol, vitamina E sobre cepas microbianas originárias da ATCC.....	96
<b>Tabela 3:</b> Atividade moduladora do alfa-tocoferol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	97
<b>Tabela 4:</b> Atividade moduladora do colesterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	97
<b>Tabela 5:</b> Atividade moduladora do ergosterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	98
5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora de menadiona sobre cepas bacterianas multiresistentes	
<b>Tabela 1:</b> Perfil de resistência das bactérias a antibióticos.....	110
<b>Tabela 2:</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) de menadiona, vitamina K <sub>3</sub> sobre cepas microbianas originárias da ATCC.....	110
<b>Tabela 3:</b> Atividade moduladora do menadiona associado com aminoglicosídeos	

nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	111
<b>Tabela 4:</b> Atividade moduladora do colesterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	111
<b>Tabela 5:</b> Atividade moduladora do ergosterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	112
5.4 Efeito modulador das vitaminas lipossolúveis sobre <i>candida</i> spp	
<b>Tabela 1:</b> Atividade moduladora do Colecalciferol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	123
<b>Tabela 2:</b> Atividade moduladora do Alfa-tocoferol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	124
<b>Tabela 3:</b> Atividade moduladora do Menadiona nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	124
<b>Tabela 4:</b> Atividade moduladora do Colesterol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	125
<b>Tabela 5:</b> Atividade moduladora do Ergosterol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2.....	125

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

g – gramas(s)

® – Marca registrada

mm/Hg – milímetros de mercúrio

h - horas

°C - graus Celsius

mg/mL – miligramas de soluto por mililitro de solvente

µg/mL - microgramas de soluto por mililitro de solvente

mL – mililitro(s)

µL - microlitro(s)

% - porcentagem

DNA – ácido desoxirribonucléico

LDL – lipoproteína de baixa densidade

UV- ultravioleta

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

DHRN - Doença Hemorrágica do recém-nato

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion* (Caldo de coração e cérebro)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM/8 – Concentração subinibitória

CIM/4 - Concentração subinibitória

CIM/2 - Concentração subinibitória

DMSO – Dimetilsulfóxido

*et al* – e outros; e colaboradores (latim)

HIA – Heart infusion Agar

LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

NCCLS – *National Comitee for Clinical Laboratory Standards* 13

UFC: Unidade formadora de colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

URCA – Universidade Regional do Cariri

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Vitaminas Lipossolúveis.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Vitamina A.....	26
3.1.2 Vitamina D.....	28
3.1.3 Vitamina E.....	30
3.1.4 Vitamina K.....	33
<b>3.2 Colesterol.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Ergosterol.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 Fluidez das Membranas Biológicas.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Microrganismos e Infecção.....</b>	<b>43</b>
3.5.1 Bactérias.....	44
3.5.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
3.5.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
3.5.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	47
3.5.1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	48
3.5.2 Fungos.....	49
3.5.2.1 Gênero <i>Candida</i> .....	50



<b>3.6 Resistência Microbiana.....</b>	<b>52</b>
3.6.1 Mecanismos da Resistência Bacteriana.....	53
3.6.1.1 Mecanismos genéticos.....	53
3.6.1.2 Mecanismos bioquímicos.....	55
3.6.2 Resistência à aminoglicosídeos.....	56
3.6.3 Resistência Fúngica.....	57
<b>3.7 Potencial Modulador.....</b>	<b>58</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Substâncias.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2 Linhagens Utilizadas.....</b>	<b>61</b>
<b>4.3 Meios de Cultura.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 Drogas e Reagentes.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Preparação da Solução Teste.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6 Teste Concentração Inibitória Mínima.....</b>	<b>63</b>
<b>4.7 Teste de modulação da ação de antibióticos e antifúngicos.....</b>	<b>64</b>
<b>4.8 Análise Estatística.....</b>	<b>65</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Uso de colecalciferol como agente modulador de aminoglicosídeos frente a linhagens bacterianas multiresistentes.....</b>	<b>68</b>
<b>5.2 Análise “in vitro” da modulação de aminoglicosídeos por alfa-tocoferol frente a linhagens bacterianas multiresistentes.....</b>	<b>83</b>
<b>5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora de menadiona sobre cepas bacterianas multiresistentes.....</b>	<b>99</b>
<b>5.4 Efeito modulador das vitaminas lipossolúveis sobre <i>Candida</i> sp.....</b>	<b>113</b>
<b>5.5 Patente: Avaliação da Atividade Moduladora de vitaminas lipossolúveis</b>	

caracterizada por menadiona (vitamina K), Alfa-Tocoferol (Vitamina E) e Colecalciferol (Vitamina D) frente a bactérias multiresistentes.....	126
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>148</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>167</b>
ANEXO A - FORMULÁRIO PARA DEPÓSITO E PEDIDO DE PATENTE.....	168
ANEXO B - PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	172

# INTRODUÇÃO

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

Durante séculos se tem apostado na investigação e descoberta científica de novas atividades biológicas presentes em produtos naturais. Produtos esses que além de alimentar, são amplamente utilizados na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividades benéficas a saúde.

Os produtos naturais, tanto de origem vegetal quanto animal, possuem a presença de um conjunto de compostos químicos, que podem ser administrados como recursos terapêuticos, o que tem chamado a atenção e o interesse científico para o desenvolvimento de novos fármacos. (SIMÕES *et al.*, 2010).

Muitos dos produtos naturais estão incluídos na alimentação, apresentando propriedades benéficas além das nutricionais, sendo chamados de alimentos funcionais, nos quais são encontradas substâncias biologicamente ativas como: probióticos, prebióticos, derivados sulfurados e nitrogenados, pigmentos, vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras (MORAIS, COLLA, 2006).

Vitaminas são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades e de extrema importância para o funcionamento do organismo (PAIXÃO, STAMFORD, 2004). Devido as suas propriedades fisiológicas e físico-químicas são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis.

As vitaminas lipossolúveis têm merecido destaque em relação a suas atividades biológicas como a intensificação da atividade antimicrobiana, mediada por peptídeos endógenos (catelicidina e defensina), anticancerígena, antioxidante, além de atuar na modulação da sinalização celular e na homeostase, participando do metabolismo ósseo e do crescimento celular (MARTINEAU *et al.*, 2011; MUSZKAT *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2007; KLACK, CARVALHO, 2006), justamente por isso, são apontadas como nutracêuticos, ou seja, parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças (PAIXÃO, STAMFORD, 2004; MORAIS, COLLA, 2006).

O caráter lipossolúvel dessas vitaminas pode modificar a permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antimicrobianos. Alguns estudos relatam que compostos menos polares são mais efetivos, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à presença de cadeias polissacarídeos, que atuam como barreira para compostos hidrofóbicos ativos na membrana (PRETTO *et al.*, 2004; GIBBONS, 2004; NICOLSON *et al.*, 1999).

O colesterol é fundamental para as células animais, participa de inúmeros processos biológicos, entre eles a formação de membranas, a síntese hormonal e a produção de ácidos biliares necessários à absorção de gordura pelo intestino, é um precursor dos hormônios esteróides e da vitamina D, além de auxiliar o metabolismo das outras vitaminas lipossolúveis (LEANÇA *et al.*, 2010). Nos fungos o componente lipídico encontrado na membrana é o ergosterol, derivado do colesterol, responsável por inúmeras características físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez. (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

As bactérias não possuem colesterol nem ergosterol na sua estrutura, os mesmos foram utilizados por serem complexos lipossolúveis, podendo assim agir sobre o mosaico fluido da membrana bacteriana e fúngica, sendo possível colacionar com a ação das vitaminas lipossolúveis nas membranas microbianas.

O desenvolvimento de infecções bacterianas em humanos inclui uma variedade de bactérias. Dentre elas o *Staphylococcus aureus* é a espécie mais importante causadora de infecções e diferentes tipos de intoxicações, representa o agente etiológico mais comum de infecções na pele, pulmões, ossos e no sistema sanguíneo (DEURENBERGER *et al.*, 2007; GELATTI *et al.*, 2009). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, possui toxinas e enzimas na sua estrutura que propocionam significativo aumento na sua virulência, tornando-a resistentes a antibióticos, agredindo o trato urinário, ouvidos e olhos (MURRAY *et al.*, 2008). *Escherichia coli* é a espécie mais comum do gênero *Escherichia*, associado a infecções graves do trato urinário, meningite e gastroenterite (TORTORA *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2010). *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno de infecções hospitalares, responsável por surtos em unidades de internação intensiva. Ocasionalmente causa um tipo grave de pneumonia em humanos imunocomprometidos (TORTORA *et al.*, 2008; DIPERSIO, 2005)

Dentre as principais patologias fúngicas oportunistas podemos citar a candidíase. Candidíase ou candidose é uma infecção profunda ou superficial, com localização cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica, causada pelo gênero *Candida*, principalmente por *Candida albicans*, (ZARDO, MEZZARI, 2004; MARTINS *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2008). Estas leveduras estão presentes na microbiota normal, apresentando-se patogênicas quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico (MARTINS *et al.*, 2002).

É cada vez mais presente a busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana. Nas últimas décadas, entre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em

populações bacterianas e fúngicas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Durante muitas décadas, foram desenvolvidos fármacos visando combater, de modo eficiente, infecções bacterianas, ocasionando a redução da mortalidade causada por doenças microbianas (SILVEIRA *et al.*, 2006). No entanto, a utilização demasiada desses antibióticos fez com que os microrganismos desenvolvessem defesas relativas aos agentes antimicrobianos, com o conseqüente aparecimento de resistência.

Atualmente o problema da resistência microbiana tornou-se mais grave devido às dificuldades para a descoberta e o lançamento de novos antimicrobianos no mercado o que impõe sérios obstáculos às opções para o tratamento de infecções, representando uma ameaça para a saúde pública (FERRONATTO *et al.*, 2007).

Para conseguir combater a resistência microbiana recentemente estão sendo utilizadas combinações múltiplas de drogas. Essas combinações vêm sendo utilizadas também entre antibiótico, produtos naturais e substâncias isoladas com o propósito de alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO *et al.*, 2008).

Tendo em vista a potencialidade das atividades biológicas que as vitaminas lipossolúveis possuem, sua presença na alimentação e seu baixo índice de toxicidade, o objetivo do presente estudo foi verificar a atividade antimicrobiana e moduladora, averiguando principalmente se devido a sua lipossolubilidade as vitaminas conseguem agir na modulação de antimicrobianos sobre a resistência microbiana.

# OBJETIVOS

---

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana das vitaminas lipossolúveis: Colecalciferol (vitamina D), Alfa-tocoferol (Vitamina E) e Menadiona (Vitamina K), bem como avaliar o seu potencial modulador de drogas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona, para cepas padrões de bactérias e fungos.
- Verificar a interação de colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona quando combinados com antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e antifúngicos, contra cepas de bactérias multiresistentes e fungos.
- Analisar o efeito modulador dependente de dose de colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona (CIM/4 e CIM/2)
- Comparar a ação da atividade moduladora das vitaminas com o colesterol e ergosterol.



# REFERENCIAL TEÓRICO

---

---

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Vitaminas Lipossolúveis

Vitaminas (*vita*: vida; *amina*: grupo de composto nitrogenado) são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades, distintas das proteínas, dos glicídios e lipídios e de extrema importância para o funcionamento do organismo, tendo por finalidade a participação em variadas reações metabólicas controladas por enzimas e coenzimas, na forma de co-fatores (CHORILLI *et al.*, 2007).

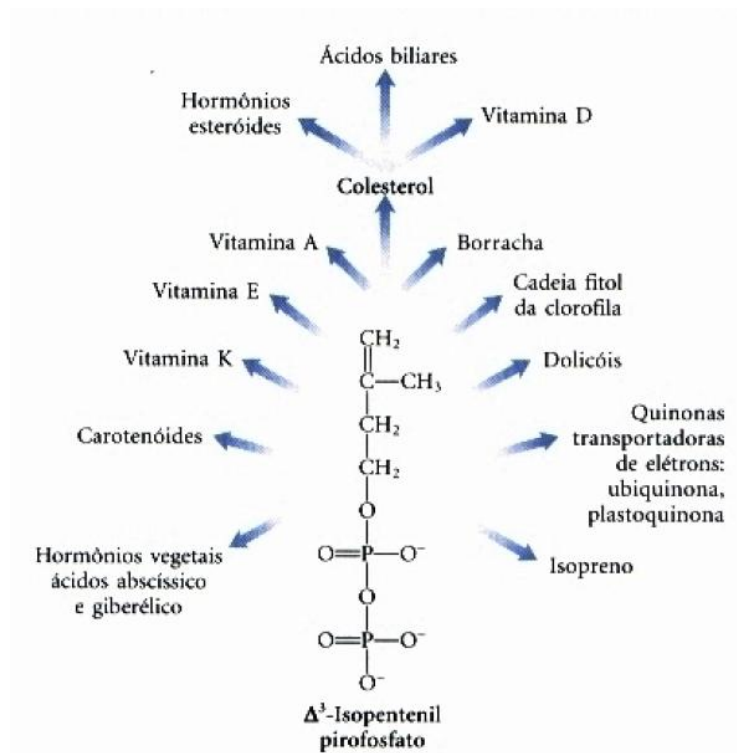
A ausência de vitaminas ou absorção e utilização imprópria na dieta resultam, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento de deficiências e outras perturbações orgânicas, sendo característico de carência ou também denominado de avitaminose (ausência de vitamina), o que pode desencadear sintomatologia específica com uma série de reações adversas (MARCUS, COULSTON, 2003; SIERRA *et al.*, 2007).

A maioria dos organismos animais, independente dos fatores ambientais, é incapaz de sintetizá-las por via anabólica, por essa razão, as vitaminas precisam ser incluídas nas dietas. Em geral, são necessárias em pouca quantidade e em função da idade, sexo, estado fisiológico, metabólico e atividade física do indivíduo. A necessidade é aumentada nos processos de crescimento, gestação, lactação, condições de esforços intensos e na ocorrência de determinadas doenças (PAIXÃO, STAMFORD, 2004; KLACK, CARVALHO, 2006).

As vitaminas lipossolúveis conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, divididos em quatro grupos de vitamina, A, D, E e K, se destacam por suas atividades biológicas e o suprimento destes micronutrientes são essenciais ao crescimento, desenvolvimento e outras funções biológicas do organismo (PAIXÃO, 1998; CHORILLI *et al.*, 2007).

Os quatro grupos de vitaminas lipossolúveis (Figura 1) são compostos isoprenóides, sendo o isopentenil pirofosfato seu precursor ativo, como também precursor de um grande espectro de biomoléculas como colesterol, possuindo mecanismos de polimerização similar em todas as vias biossintéticas (LEHNINGER, 2006).

**Figura 1:** Visão geral da biossíntese dos isoprenóides.



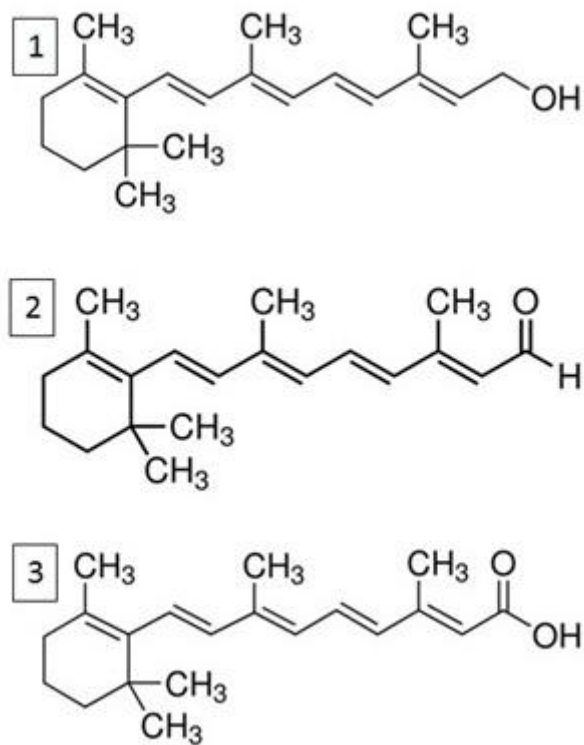
Fonte: LEHNINGER, 2006.

### 3.1.1 Vitamina A

A vitamina A foi a primeira vitamina lipossolúvel a ser identificada, em 1913, isolada de óleo de fígado de peixe. É o termo genérico usado para descrever o retinol e todos os carotenóides dietéticos que têm atividade biológica de trans-retinol. A vitamina A natural se apresenta na forma de ésteres de retinil de cadeia longa. As formas metabolicamente ativas incluem o retinal (aldeído) e ácido retinóico (ácido) (Figura 2), (GOMES *et al*, 2005).

Como visto a vitamina A é um álcool (retinol) isoprenóide lipossolúvel e insaturado, encontrado em alimentos de origem animal, no fígado, ovos, leite integral e manteiga, na forma de ésteres. Estando também presente em plantas, na forma de carotenóides, precursores de retinol, com atividade de pró-vitamina A, são eles:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, encontrados em especial em vegetais e frutas alaranjadas, e vegetais verdes folhosos (CHAGAS *et al*, 2003; LEHNINGER, 2006).

**Figura 2:** Estrutura molecular plana das três moléculas biologicamente ativas da vitamina A, 1 – Retinol; 2 – Retinal (trans-retinal) e 3 – Ácido Retinóico.



Fonte: ANDRADE, J.C.

A vitamina A exerce inúmeras funções no organismo, dentre estas, destacam-se por sua relevância, a manutenção da visão, o retinal é o pigmento dos cones e bastonetes da retina, que inicia a resposta à luz, produzindo um sinal neuronal ao cérebro. Além de ser essencial a preservação e ao funcionamento normal dos tecidos epiteliais, assim como o crescimento e ao desenvolvimento, da função imunológica e da reprodução (CHAGAS *et al.*, 2003; LEHNINGER, 2006; LIRA, DIMENSTEIN, 2010). Comprovadamente, a vitamina A é um excelente antioxidante (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Capaz de atua na defesa do organismo contra os radicais livres, que estão implicados na patogenia de muitas enfermidades, alguns estudos ressaltam a relação da vitamina A contra o câncer e isquêmica coronária (MÁRQUEZ *et al.*, 2002).

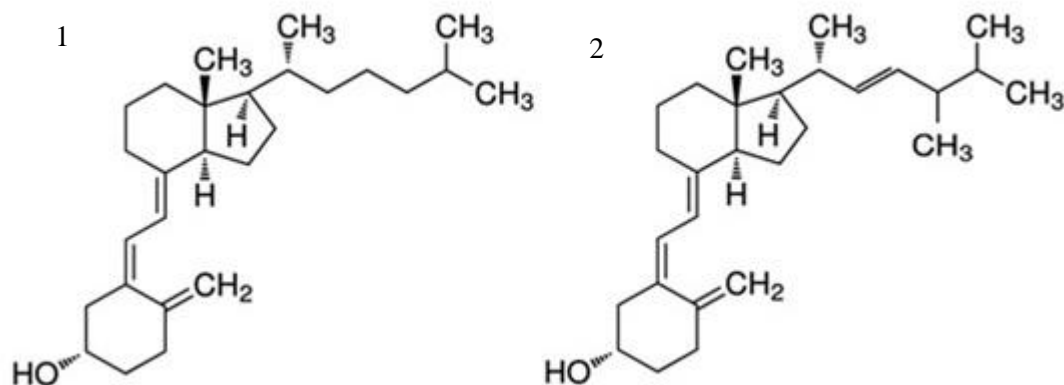
A carência de vitamina A leva a uma variedade de sintomas no organismo humano, destacando, ressecamento na pele, olhos e membranas mucosas, desenvolvimento e crescimento retardado, além de cegueira noturna que representa o sintoma de diagnostico da deficiência de vitamina A (CHAGAS *et al.*, 2003).

### 3.1.2 Vitamina D

É uma vitamina lipossolúvel indispensável a vários processos fisiológicos. A vitamina D é um hormônio esteroidal, que interage com ossos, glândulas paratireóides, rins e intestinos, cuja principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea (BARRETT, BARRETT, 2003; CARVALHO, BARGE, 2011). Devido ao papel da vitamina D no metabolismo do cálcio, ela tem sido utilizada na prevenção e tratamento da osteoporose e osteomalácia.

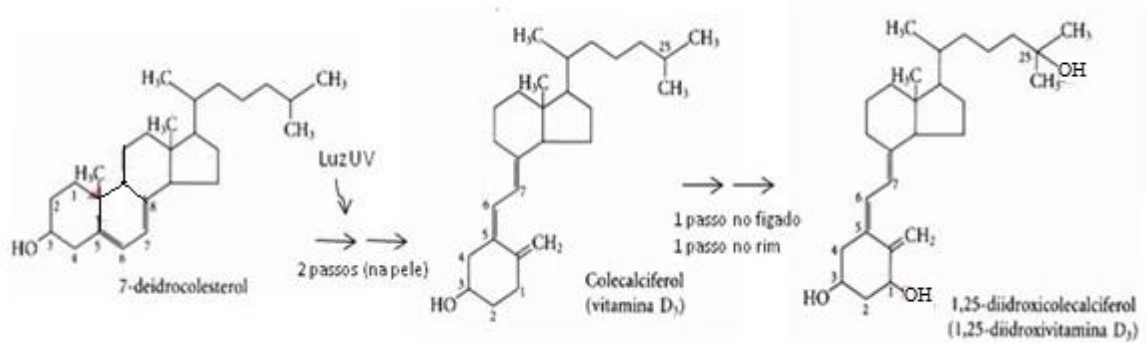
A vitamina D ocorre através de duas formas: a vitamina D<sub>3</sub> (Figura 3), também chamada de colecalciferol, produzida através de uma reação fotoquímica, catalisada pela radiação ultravioleta (UV) da luz solar sobre o 7-deidrocolesterol presente na pele. A vitamina D<sub>3</sub> não é biologicamente ativa, mas enzimas do fígado e dos rins convertem-na em 1,25-diidroxicolecalciferol, hormônio que regula a absorção do cálcio no intestino e o seu nível nos rins e ossos, através da expressão gênica, evidenciada na Figura 4 (LEHNINGER, 2006; BARRAL *et al.*, 2007).

**Figura 3:** Estrutura molecular plana do 1 – Colecalciferol ou vitamina D<sub>3</sub>, 2 - Ergocalciferol ou vitamina D<sub>2</sub>.



Fonte: ANDRADE, J.C.

A vitamina D<sub>2</sub>, o ergocalciferol (Figura 3), é um produto comercializado sintetizado a partir da radiação da luz ultravioleta sobre o ergosterol de leveduras, possui semelhanças na estrutural com vitamina D<sub>3</sub>, com algumas alterações na cadeia lateral, ambas têm os mesmos efeitos biológicos (LEHNINGER, 2006; DANTAS *et al.*, 2009).

**Figura 4:** Produção e Metabolismo da vitamina D.

Fonte: LEHNINGER, 2006.

A principal fonte da vitamina D é representada pela formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta B (DANTAS *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010). A maioria dos humanos depende de uma adequada exposição ao sol para satisfazer suas necessidades diárias.

No entanto o processo de síntese da vitamina D é influenciado por vários fatores, principalmente os que diminuem a sua produção, dentre eles pode-se citar pessoas que vivem em latitudes mais a norte, em locais de maior poluição, de pele morena, que desenvolva atividades em locais fechados, que usam roupas que cobrem quase toda a superfície corporal ou usam protetor solar, visto que a exposição à radiação solar está limitada. Sobretudo a síntese desta vitamina está diminuída no inverno e durante a noite. (WAGNER *et al.*, 2008; CARVALHO, BARGE, 2011)

No entanto existe outra fonte alternativa e menos eficaz de se obter vitamina D, através da dieta, com consumo de produtos com suplementação. Por meio da alimentação é possível adquirir a partir de fontes vegetais, o ergocalciferol (ou vitamina D<sub>2</sub>) e, a partir de fontes animais, colecalciferol (ou vitamina D<sub>3</sub>). São especialmente ricos em vitamina D os peixes gordos, óleo de peixe e gema de ovo (DANTAS *et al.*, 2009).

Além do seu papel na homeostase do cálcio, vários estudos relatam que a forma ativa da vitamina D apresenta atividade biológica e efeitos mais complexos em relação ao organismo, que contribuem para prevenção, tratamento e aumento da imunidade contra algumas doenças, principalmente as autoimunes (MARQUES *et al.*, 2010). Sobretudo uma das atividades biológicas da vitamina D que vem se destacando é a intensificação da atividade antimicrobiana, mediada por peptídeos endógenos (catelicidina e defensina), em monócitos,

neutrófilos e outras linhagens celulares. Por exemplo, a vitamina D permite a erradicação do *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos humanos através da indução do sistema imune inato, levando à produção de catelicidina (DANTAS *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010; MARTINEAU *et al.*, 2011; MUSZKAT *et al.*, 2010).

Evidências apontam que a vitamina D apresenta efeito imunomodulador sobre as células do sistema imunológico, principalmente linfócitos T, como na produção e na ação de diversas citocinas. A ação conjunta da vitamina D com o sistema imunológico vem sendo alvo de muitas pesquisas, principalmente relacionando a deficiência de vitamina D com várias doenças autoimunes (DANTAS *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010).

A carência da vitamina D é um problema existente, entretanto é pouco identificado, devido as manifestações clínicas dessa deficiência surgir apenas em uma fase tardia. (GORDON *et al.*, 2008). A diminuição da vitamina D leva a uma redução da absorção intestinal do cálcio, gerando hipocalcemia, desenvolvimento de raquitismo e aumento do risco de osteoporose (KULIE *et al.*, 2009).

Recentemente outras doenças estão sendo associadas à deficiência de vitamina D como: distúrbios musculares, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 1, infecções micobacterianas, esquizofrenia, pré-eclâmpsia, asma, rinite e doenças autoimunes, incluindo: diabetes mellitus insulino-dependente, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (DANTAS *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010; MUSZKAT *et al.*, 2010; CARVALHO, BARGE, 2011). Ainda, estudos apontam o aumento do surgimento de neoplasias no cólon-retal, mama e próstata devido à deficiência de vitamina D (BANDEIRA *et al.*, 2006, MIMOUNI, SHAMIR, *et al.*, 2009). É importante salientar que muitas destas doenças incidem apenas na idade adulta, entretanto a disponibilidade de vitamina D durante os primeiros anos de vida é essencial para evitar o seu desenvolvimento (CARVALHO, BARGE, 2011).

### 3.1.3 Vitamina E

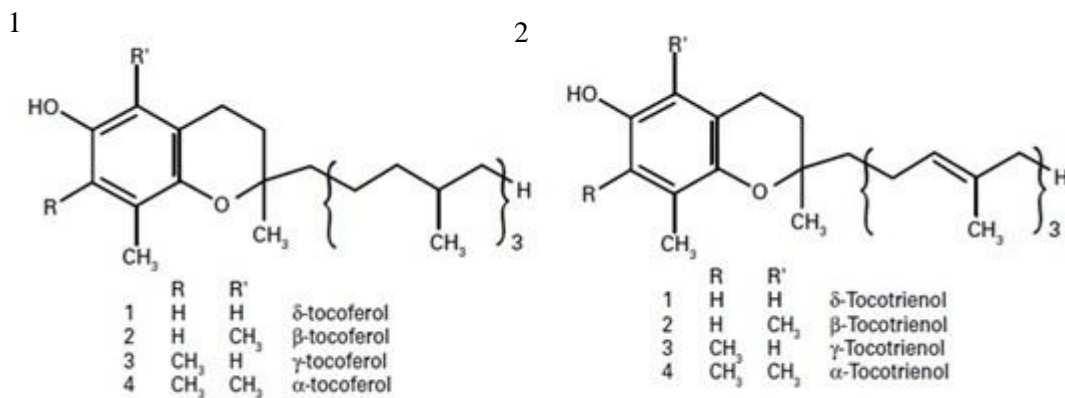
Foi isolada pela primeira vez em 1936 a partir do óleo essencial de gérmen de trigo, sendo uma substância insolúvel em água. A síntese foi realizada posteriormente, em 1938, pelo químico suíço Paul Karrer (CHORILLI *et al.*, 2007).

A vitamina E, descrita como vitamina da fertilidade, é a principal vitamina encontrada no plasma e na partícula de LDL, podendo se apresentar, na natureza, em oito isoformas

lipossolúveis, que são divididas em dois grupos: tocoferol e tocotrienóis (BATISTA *et al.*, 2007). O processo de metabolização desses compostos é diferenciado, embora o processo de absorção intestinal seja o mesmo. Tal diferenciação ocorre no fígado (GUINAZI, 2004; BATISTA *et al.*, 2007).

Os grupos tocoferol (alfa, beta, gama e delta-tocoferol) e tocotrienóis (alfa, beta, gama e delta- tocotrienóis) (Figura 5), apresentam uma longa cadeia lateral isoprenóide saturada e insaturada, respectivamente, com anel aromático substituído, que determina o tipo de isoforma (LEHNINGER, 2006).

**Figura 5:** Estrutura molecular plana das isoformas dos grupos 1- Tocoferol e 2- Tocotrienóis.



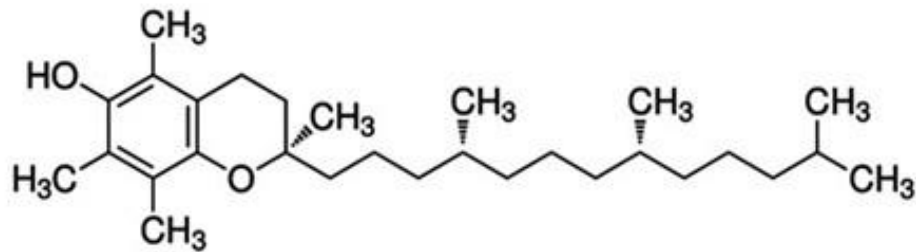
Fonte: BATISTA *et al.*, 2007

Todos os tocoferóis ocorrem à temperatura ambiente, na forma de um óleo viscoso amarelo-pálido. São insolúveis em água, solúveis em gorduras, óleos e solventes orgânicos (éter, acetona, clorofórmio, metanol, álcool etílico e metílico). São pouco sensíveis ao calor, luz e ácido, e sensíveis à oxidação e bases. Por serem hidrofóbicos, os tocoferóis interagem-se a membrana celular, depósitos lipídicos e lipoproteínas do sangue (LEHNINGER, 2006).

A isoforma mais abundante, biologicamente ativa e mais potente antioxidante deste micronutriente é o alfa-tocoferol (Figura 6), sendo também a isoforma mais explorada, e a única que atende as exigências nutricionais para humanos (MÁRQUEZ *et al.*, 2002; CATANIA *et al.*, 2009; DIMENSTEIN *et al.*, 2011).



**Figura 6:** Estrutura molecular plana do  $\alpha$  – tocoferol (Vitamina E)



Fonte: ANDRADE, J.A.

A vitamina E pode ser encontrada naturalmente em diversos alimentos de origem vegetal, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no germe de trigo, ocorrendo uma diferenciação entre os isômeros da vitamina E em cada vegetal. Além de alimentos de origem animal, como gema de ovo e fígado (BATISTA *et al.*, 2007).

Existe um interesse cada vez maior pela vitamina E devido as suas atividades biológicas, especialmente, pelas funções que esta desempenha no organismo como antioxidante biológico, sendo capaz de retardar o envelhecimento e proteger o organismo de doenças crônicas não transmissíveis, como Parkinson, Alzheimer, quadros infecciosos e reumáticos, câncer e enfermidades cardiovasculares. Além de proteger as membranas celulares, oferecendo proteção contra os efeitos da superdosagem de vitamina A (MÁRQUEZ *et al.*, 2002; CHORILLI *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2007; BERG, 2010).

Como antioxidante a vitamina E protege os tecidos adiposos do ataque de radicais livres, sendo capaz de inibir o crescimento das células malignas (SAMPAIO, ALMEIDA, 2009). A indústria alimentícia tem empregado a vitamina E como um antioxidante natural, em seus produtos, tentando assim diminuir o emprego de antioxidantes sintéticos em alimentos que causam efeitos deletérios ao organismo humano (BATISTA *et al.*, 2007).

O anel aromático presente na estrutura da vitamina E, associa-se com as formas reativas dos radicais de oxigênio e outros radicais livres destruindo-os, protegendo os lipídeos da membrana e os ácidos graxos insaturados e contra a oxidação, evitando assim danos oxidativos que geram a fragilidade celular (LEHNINGER, 2006)

Além da sua ação antioxidante, são discutidas as propriedades não-antioxidantes da vitamina E, que atua na modulação da sinalização celular e na transcrição de genes (BATISTA *et al* 2007).

A vitamina E é fundamental para o ser humano. Sua deficiência não é comum, mesmo em pessoas que seguem dietas pobres desta vitamina, mas pode se desenvolver em casos de má absorção de gordura, fibrose cística e em algumas formas de doença hepática crônica e congênita (DIMENSTEIN *et al.*, 2011).

Alguns estudos evidenciam que a carência de alfa-tocoferol tem como principal sintoma a fragilidade dos eritrócitos, além de contribuir na patogênese da arterosclerose, diabetes e alguns tipos de câncer, bem como na modulação da inflamação e resposta imune. Podendo ainda causar anemia hemolítica e afetar o desenvolvimento do sistema nervoso central, especialmente em recém-nascidos prematuros por conta das concentrações mais baixas de tocoferol no plasma (LEHNINGER, 2006; ROMEU-NADAL, *et al.*, 2006; DIMENSTEIN *et al.*, 2011).

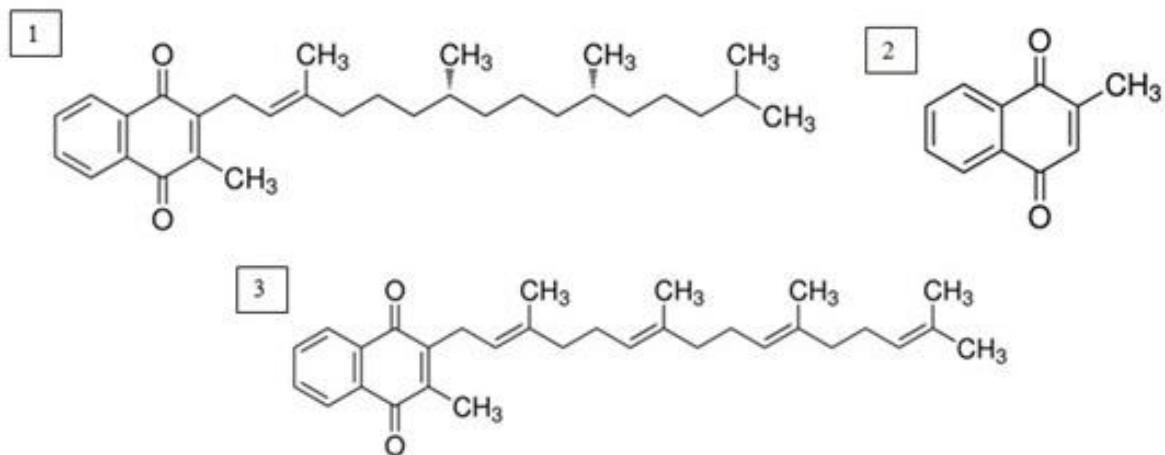
#### 3.1.4 Vitamina K

A vitamina K foi descoberta em 1929 por Henrik Dam, como um fator anti-hemorrágico. É o nome genérico dado a um número de compostos altamente relacionados entre si que atuam como co-fatores da enzima  $\gamma$ -glutamylcarboxilase (Gla). A denominação vitamina K provém da primeira letra da palavra dinamarquesa *koagulation* (MOURÃO *et al.*, 2005; KLACK, CARVALHO, 2006).

A vitamina K é amplamente distribuída nos alimentos, sendo que o grupo de vegetais folhosos verde escuro contém a maior concentração, como, por exemplo, espinafre, brócolis e alguns tipos de alface. As segundas maiores fontes são de óleos e gorduras: óleos de soja, canola, algodão, oliva, amendoim e de milho (FERREIRA *et al.*, 2006). A quantidade de vitamina K encontrada nos alimentos é influenciada por diversos fatores como a fertilização e condições do solo, clima, área geográfica, estado de maturação e variação sazonal (DAMON *et al.*, 2005).

As formas da vitamina K (Figura 7) são: - Filoquinona (vitamina K<sub>1</sub>) que é a forma predominante, presente nos vegetais, sendo os óleos vegetais e as hortaliças suas fontes mais significativas. - Menaquinona (vitamina K<sub>2</sub>), sintetizada por bactérias no trato intestinal de humanos e animais, presente em produtos animais e alimentos fermentados. - Menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) que é um composto sintético a ser convertido em K<sub>2</sub> no intestino (KLACK, CARVALHO, 2006; DÔRES *et al.*, 2001).

**Figura 7:** Estrutura molecular plana biologicamente ativas da vitamina K: 1- Filoquinona, 2- Menadiona, 3- Menaquinona.



Fonte: ANDRADE, J.A.

O anel da vitamina K sofre um ciclo de oxidação e redução, para produção da protrombina ativa, proteína encontrada no plasma sanguíneo fundamental para a formação do coágulo sanguíneo, atua na quebra de determinadas ligações peptídicas do fibrinogênio, para transformá-lo em fibrina, proteína fibrosa responsável pela estrutura e forma do coágulo sanguíneo (LEHNINGER, 2006). Em essência, o ciclo de vitamina K, pode ser considerado uma via de recuperação da vitamina, presente em quantidades nanomolares no fígado e em outros tecidos (OLSON, 1999; DÔRES *et al.*, 2001).

O fígado é o local de síntese de proteínas da coagulação dependentes de vitamina K, por isso é considerado o maior órgão de estoque das vitaminas K, porém, o osso cortical possui uma quantidade de vitamina K como o fígado, podendo funcionar como um fornecedor de filoquinona. No plasma o espectro das vitaminas K circulantes é bem menor que nos estoques hepáticos ( DÔRES *et al.*, 2001; KLACK, CARVALHO, 2006 ).

Como citado, a vitamina K é necessária principalmente para o mecanismo da coagulação sanguínea, sendo essencial para a síntese da protrombina. Além de participar, na síntese de proteínas presentes no plasma e rins. A carboxilação da vitamina K está envolvida na homeostase, metabolismo ósseo e crescimento celular (DÔRES *et al.*, 2001).

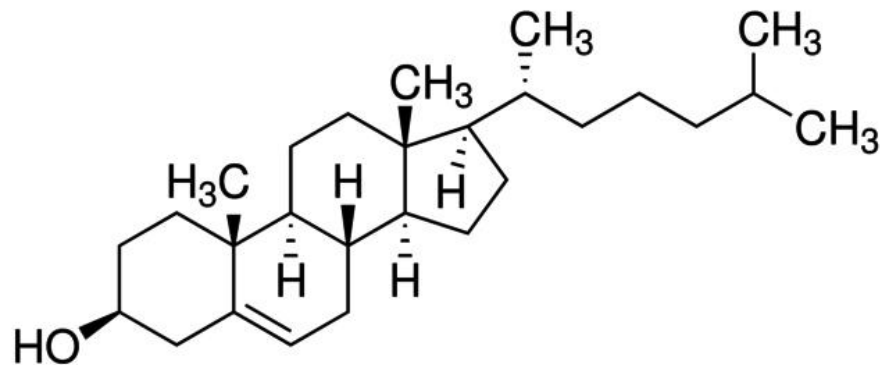
A vitamina K<sub>2</sub> possui efeitos inibitórios do crescimento de várias células neoplásicas, e redução do risco de eventos mutagênicos na fase de proliferação celular rápida em fetos e recém-nascidos (KLACK, CARVALHO, 2006).

Muitos fatores contribuem na proteção contra deficiência de vitamina K como: a distribuição ampla de vitamina K nos alimentos, o ciclo endógeno da vitamina e a própria flora intestinal (DÔRES *et al.*, 2001). No entanto, algumas causas de deficiência de vitamina K se destacam, dentre elas: inadequação dietética, devido baixa ingestão da vitamina; doença hemorrágica do recém-nato - DHRN (SUTTIE, 1996), ocorre em recém nascidos com imaturidade hepática, luz intestinal estéril e baixo conteúdo de vitamina K no leite materno; Uso de medicamentos, como drogas anticoagulantes e alguns antibióticos; Alterações da absorção intestinal e megadoses de vitaminas A e E antagonizam a vitamina K (OLSON, 1999).

A hipovitaminose K como responsável por manifestações de hemorragia, como sangramento nasal ou oral, equimoses na virilha, garganta e nas pernas; sinais hemorrágicos sob unhas ou na conjuntiva; melena; hematúria e hematêmese, além de hemorragia retroplacentária de abortamentos habituais e osteoporose (OLSON, 2000; DÔRES *et al.*, 2001).

### **3.2 Colesterol**

O colesterol é uma substância complexa do tipo lipídio-esteróide, indispensável no organismo humano, todas as células são capazes de sintetizá-los a partir de um simples precursor, sendo assim, não há necessidade de sua presença em dietas. Encontra-se em todos os tecidos animais, mas especialmente concentrado no fígado, nos rins, nas glândulas supra-renais e no cérebro. (BRANDÃO *et al.*, 2005; LEHNINGER, 2006). Sua estrutura molecular (Figura 8) composta por 27 átomos de carbonos são fornecidos por um único precursor o acetato, e unidades de isoprenóides que é intermediário na via de biossíntese da produção do colesterol.

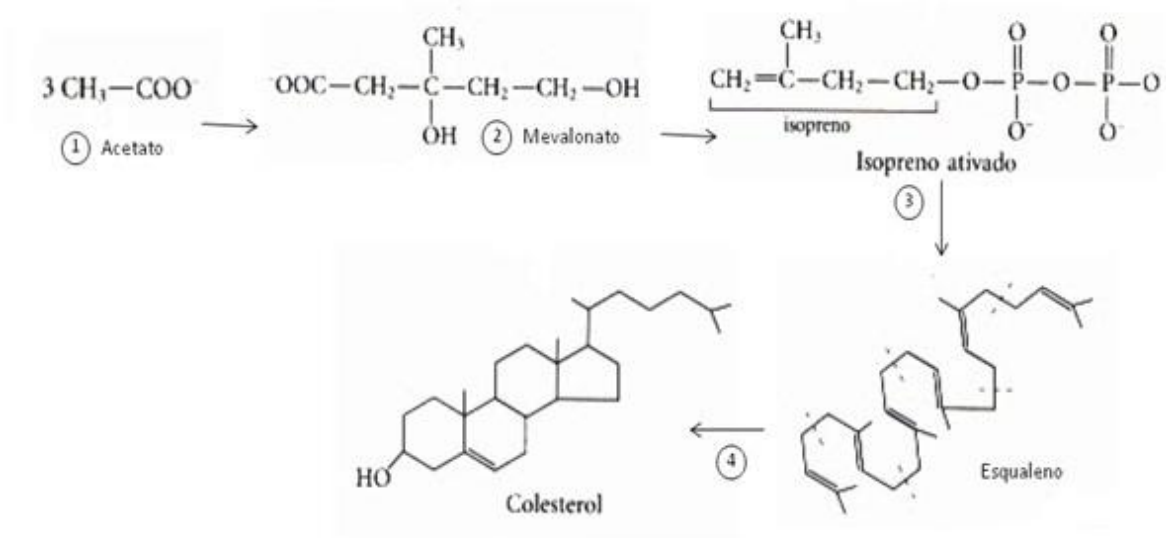
**Figura 8:** Estrutura molecular plana do Colesterol.

Fonte: ANDRADE, J.C.

A maior parte da síntese do colesterol, nos vertebrados, ocorre no fígado. O colesterol sintetizado é exportado em três formas: colesterol biliar, ácidos biliares, ajudam na digestão de lipídeos, e ésteres do colesterol. O colesterol é composto vital para o organismo, participa de inúmeros processos biológicos, entre eles a síntese de membranas, de alguns órgãos (glândula adrenal e gônadas), nos tecidos nervosos, desempenha papel isolante, semelhante ao da capa de fios elétricos, além de ser utilizado como precursor para produção dos hormônios esteróides e da vitamina D (BRANDÃO *et al.*, 2005; LEANÇA *et al.*, 2010).

A síntese do colesterol (Figura 9) é um processo complexo com grande consumo de energia. As células sintetizam colesterol a partir de acetil-CoA. Resumidamente, o processo de produção ocorre em quatro etapas: 1- Três unidades de acetato condensam-se para formar o melavonato, intermediário da síntese com seis carbonos. 2- O mevalonato converte-se em unidades de isopreno ativo. 3- Ocorre à formação do esqualeno não-cíclico, através da polimerização de seis unidades de isopreno. 4- Clivagem do esqualeno, formando quatro anéis do núcleo esteróide e uma cadeia lateral, acontecendo ainda uma série de mudanças como oxidação, remoção ou migração de grupos metila que levam ao produto final: colesterol (LEANÇA *et al.*, 2010).

Nos mamíferos a síntese de colesterol está sob controle hormonal, é regulada pelos hormônios glucagon e insulina e pode ser inibida pela concentração de colesterol intracelular, e é transportado no plasma sanguíneo como lipoproteínas (LEHNINGER, 2006).

**Figura 9:** Resumo da Via Biossintética do Colesterol.

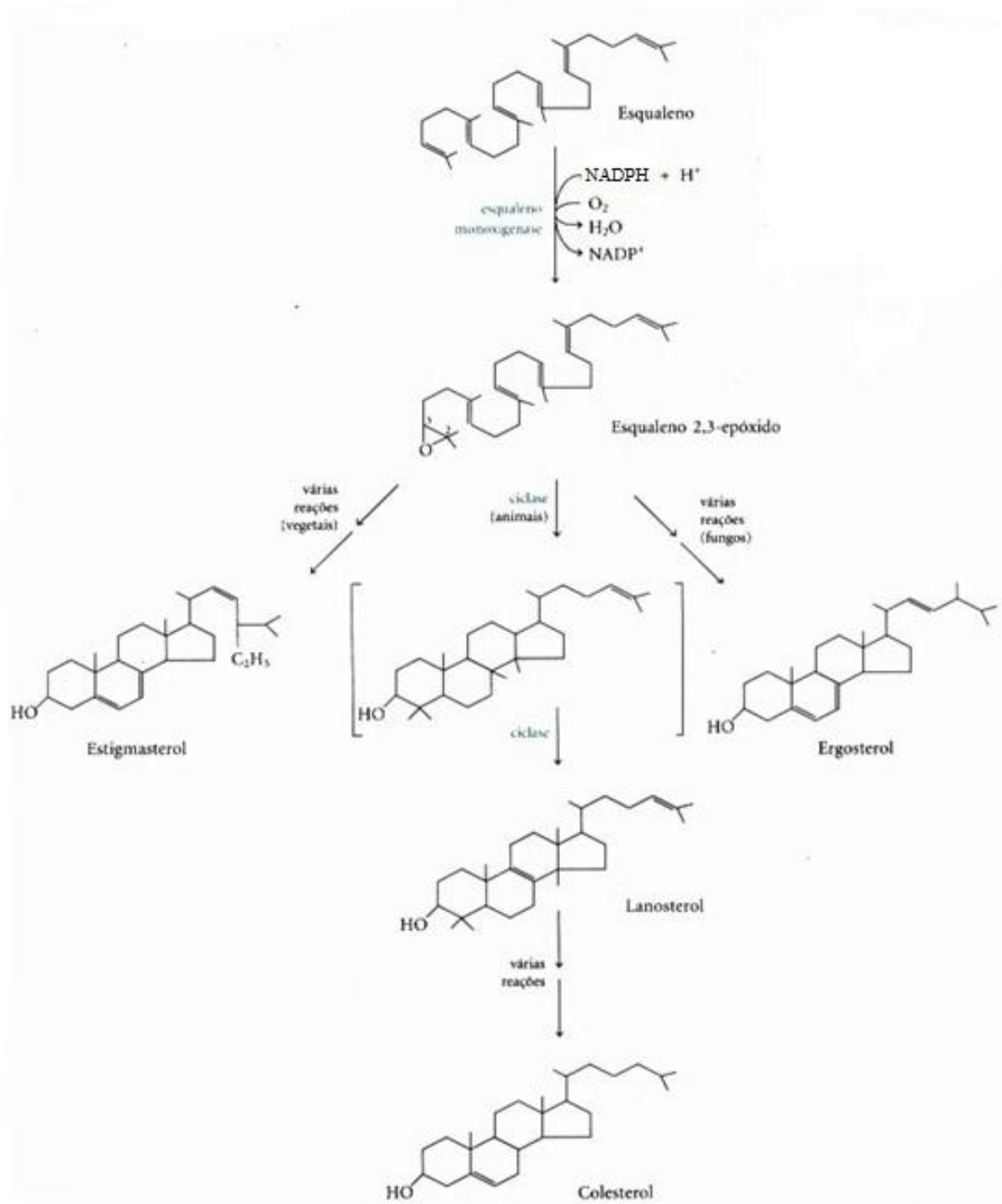
Fonte: LEHNINGER, 2006

É importante salientar, que a estrutura das membranas das células e organelas são constituídas por uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol presentes, e danos desta camada lipídica produzem efeitos dramáticos, tendem a diminuir e/ou aumentar a fluidez da membrana (MAFRA *et al.*, 1999; HAKOMORI, 2004).

### 3.3 Ergosterol

O colesterol é o esteroide característico das células animais, mas os vegetais, os fungos e parasitas, sintetizam outros esteróides, intimamente relacionados com o colesterol, utilizando a mesma via biossintética, até o passo do esqualeno (Figura 10). Nessa etapa as vias se modificam ligeiramente e outros esteróides são produzidos, nos vegetais, o estigmasterol e nos fungos o ergosterol (LEHNINGER, 2006).

**Figura 10:** Via Biossintética do Ergosterol



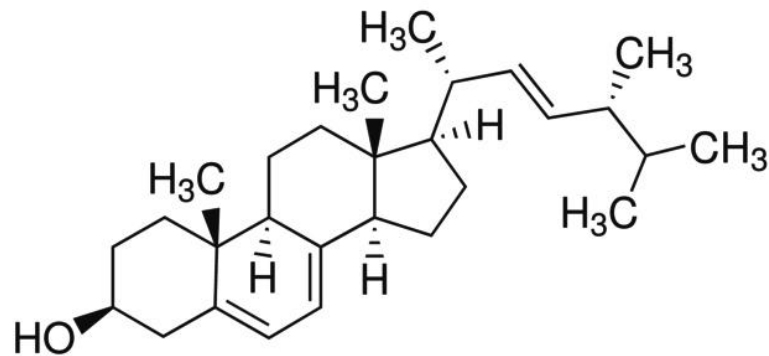
Fonte: LEHNINGER, 2006.

O ergosterol (Figura 11) é o componente lipídico fúngico, derivado do colesterol. Específico e responsável por várias características físicas importantes para viabilidade celular, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez das membranas, e tem um papel

importante na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (BOSSCHE *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006; ARGENTA, 2008; UBINA, 2009)

A inibição da síntese do ergosterol pode causar alterações na permeabilidade da membrana plasmática e inibição da proliferação de todas as fases do ciclo de vida (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006; UBINA, 2009). Além disso, sua ausência afeta o citocromo C oxidase nas mitocôndrias, e aumenta a síntese de quitina, principal componente da parede celular dos fungos, resultando em uma destruição irregular da mesma (MORETTI, 2003; ARGENTA, 2008). A atividade de várias vias metabólicas é alterada conforme os níveis de ergosterol são modificados (ARGENTA, 2008).

**Figura 11:** Estrutura molecular plana do Ergosterol.



Fonte: ANDRADE, J.A.

O processo de biossíntese do ergosterol é alvo de alguns antifúngicos, devido principalmente aos eventos de modificações na membrana celular, essas drogas, geralmente, altamente lipossolúveis, combinam-se com o esteróis da membrana, rompendo e alterando a capacidade da célula de realizar suas funções de transporte e permeabilidade (CARVALHO, 2004; SARTORI, 2005).

### 3.4 Fluidez das Membranas Biológicas

A passagem de agentes químicos ou substâncias através das membranas biológicas, com constituição proteica e lipídica, será influenciada pela sua maior ou menor lipossolubilidade. Os compostos lipossolúveis atravessam rapidamente as membranas e o contrario ocorre com os de baixa lipossolubilidade (BONAMICI, 2009).



Quando uma molécula do agente químico ou substância possui elementos estruturais que possibilitam a formação de pontes de hidrogênio com água, ocorrerá a diminuição da lipossolubilidade e o aumento das propriedades hidrofílicas ou polares (ASHFORD, 2005).

A lipossolubilidade da molécula é determinada pela presença de grupos lipofílicos (hidrofóbicos) ou apolares, representa a facilidade com que uma substância pode penetrar em uma membrana biológica (DEZANI, 2010).

Além da lipossolubilidade, para absorção ocorrer de modo eficiente através da membrana, é necessário que a substância ou agente possua uma adequada solubilidade aquosa. Solubilidade refere-se ao processo pelo qual as moléculas da substância são liberadas da fase sólida e entram na fase de solução, onde estará disponível para ser absorvida (ASHFORD, 2005; BONAMICI, 2009).

As membranas biológicas são fronteiras da célula, definem o limite externo das células e regulam o transporte molecular, são flexíveis, auto-selantes e seletivamente permeáveis a solutos polares, essas atividades biológicas devem-se a suas propriedades físicas. A membrana dos procariotos difere quimicamente da membrana dos eucariotos, especialmente pela ausência de esteróis. Como principais funções podemos destacar o transporte de solutos, produção de energia por transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, biosíntese de componentes, secreção de enzimas e comunicação célula-célula (SCHECHTER *et al.*, 2002).

A estrutura das membranas biológicas das bactérias Gram-positivas protege sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa, denominadas de camadas de peptidoglicano, que impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido à presença de açúcares e aminoácidos. Nas bactérias Gram-negativas a membrana é formada por uma dupla camada lipídica: camada interna formada de fosfolipídeos e uma externa contendo lipopolissacarídeos e proteínas. A membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos (SILVA *et al.*, 1999; SCHECHTER *et al.*, 2002; VOET *et al.*, 2008).

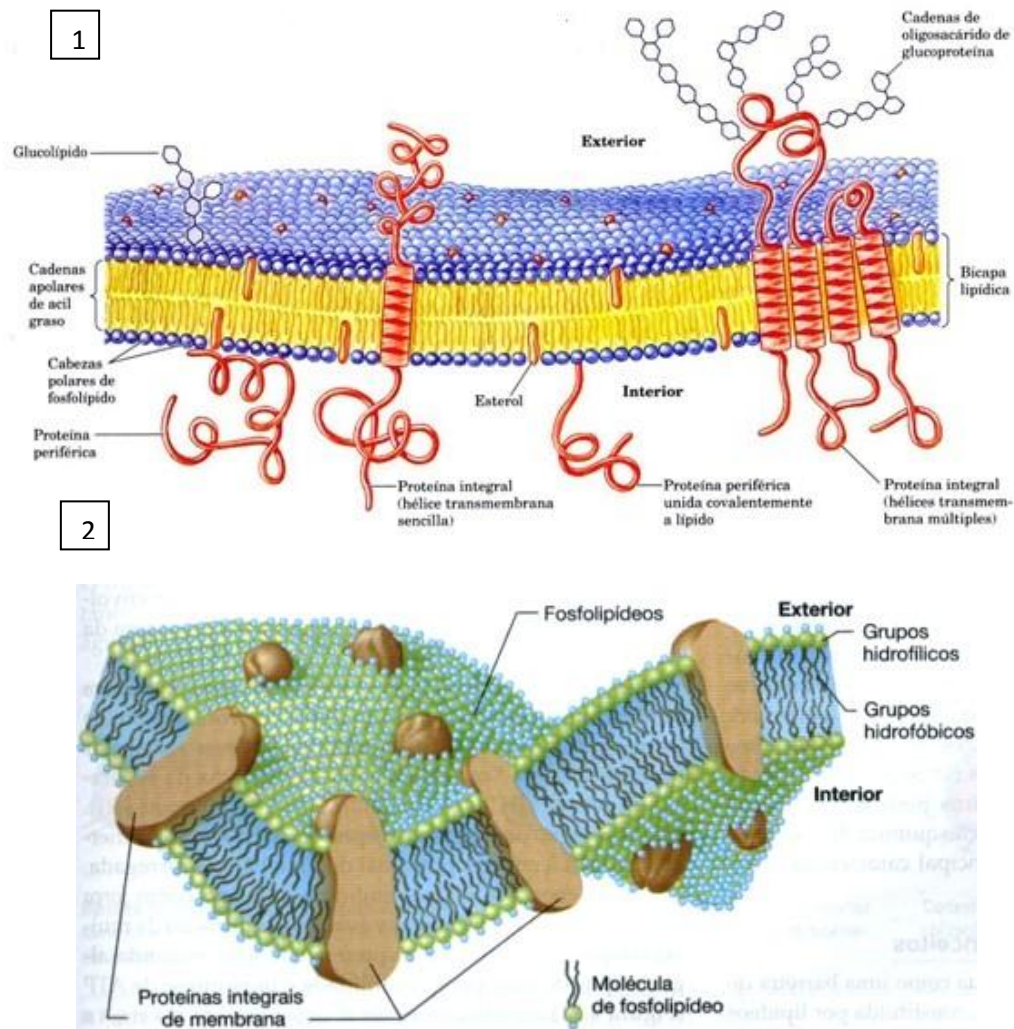
As membranas biológicas das bactérias conferem a elas uma permeabilidade seletiva responsável por controlar a passagem de substâncias e nutrientes para o interior da célula e a saída de dejetos resultantes de catabolismo. Alterações físico-químicas da membrana causam um rompimento da permeabilidade seletiva, provocando a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano e saída de elementos vitais a célula (TRABULSI *et al.*, 1999).

As membranas são impermeáveis à maioria dos solutos polares, mas permeáveis a compostos não-polares. O grau de fluidez depende da composição lipídica e da temperatura da membrana. Quanto maior a proporção de grupos lipídicos, maior a fluidez. Em

temperaturas baixas ocorre pouca movimentação lipídica e a bicamada toma uma forma quase paracristalina, já temperaturas elevadas, contribuem para uma grande movimentação dos lipídeos, e a camada paracristalina se modifica para fluida. Os esteróis presentes nas membranas dos eucarióticos tendem a moderar os extremos de solidez e fluidez das membranas (CAMPBELL, 2000; LEHNINGER, 2006).

Os compostos lipossolúveis conseguem penetrar mais facilmente nas membranas biológicas, e a concentração aumentada de lipídeos modifica o mosaico fluido da membrana (Figura 12), tornando-a mais permeável, aumentando assim sua fluidez, permeabilidade e instabilidade (GIBBONS, 2004).

**Figura12:** Modelo do mosaico fluido das membranas biológicas. Eucariótica (1); Procariótica (2) ausência de esteroides.



Fonte: LEHNINGER, 2006.

### 3.5 Microrganismos e Infecções

O mundo possui uma grande variedade biológica de microrganismos. Basicamente podem ser encontrados em todos os ambientes, estando presentes sobre o interior e exterior do organismo humano, desde o nascimento até a morte. Constituinte a microbiota normal ou flora (TORTORA *et al.*, 2008).

Microrganismos são seres vivos microscópicos, individualmente pequenos para serem vistos a olho nu. Devido a seu arranjo celular e estrutural são classificados em procarióticos e eucarióticos. Apresentam uma diversidade de formas celulares e diferentes tipos de reações químicas. O grupo de microrganismos inclui bactérias, fungos (leveduras e mofo), protozoários, algas microscópicas e vírus (VERMELHO *et al.*, 2006; TORTORA *et al.*, 2008).

Segundo Tortora *et al.* (2008) a minoria dos microrganismos é patogênica, responsáveis por muitas infecções. Entretanto a maioria realiza a manutenção do equilíbrio entre os organismos vivos e os compostos químicos do ambiente, contribuindo para o bem-estar dos habitantes do mundo.

A manutenção dos organismos é realizada através da microbiota normal, que desempenha benefícios, protege contra doenças, evita o crescimento de micróbios nocivos, além de produzir substâncias necessárias ao organismo como vitamina K e B. Infelizmente, quando a microbiota normal sai de seu nicho ela pode causar doenças (TRABULSI, *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2008).

As doenças infecciosas tem sido a causa de morte de milhares de pessoas em todo o mundo. Quando um patógeno invade um hospedeiro suscetível, seu processo, ou parte do seu ciclo vital ocorre dentro do hospedeiro e como resultado, frequentemente doenças surgem (MURRAY *et al.*, 2010).

Em meio aos diferentes grupos de patógenos causadores de infecções hospitalares estão bactérias, fungos e vírus. Contudo, o grupo que mais se destaca é o das bactérias que compõem a flora humana e que normalmente não trazem riscos a indivíduos saudáveis, embora possam causar infecções em indivíduos com estado clínico comprometido (CAMARGO, 2010).

### 3.5.1 Bactérias

As bactérias são células procarióticas, relativamente simples, com grande diversidade de espécies. Apresentam, geralmente, morfologia diversificada dentre elas, esférica ou ovalada, bastonetes curtos, e curvada com tamanhos que variam em média de 1µm a 2µm por 1µm a 4µm (SARTORI, 2010; CAMARGO, 2010).

As espécies bacterianas podem ser caracterizadas por diversos aspectos, como morfologia, composição química da parede celular, necessidades nutricionais, atividades bioquímicas e fonte de energia (TRABULSI, *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2008).

A célula bacteriana possui uma variedade de estruturas, algumas essenciais, presente em todas as espécies e outras encontradas em determinadas espécies (SCHAECHTER *et al.*, 2002). A membrana citoplasmática é uma estrutura essencial, situada no interior da parede celular, serve como uma barreira seletiva. Composta basicamente de fosfolipídeos e proteínas, entretanto glicéroglicolipídeos, hopanóides e outros tipos de lipídios também podem ser encontrados. Suas principais funções são produção de energia por transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, duplicação do DNA, biossíntese de componentes e secreção de enzimas. (TRABULSI, *et al.*, 2004; VERMELHO *et al.*, 2006 PRETTO, 200).

As bactérias são envolvidas por uma parede celular, estrutura complexa semi-rígida, responsável pela forma da célula, composta praticamente por um complexo de carboidrato e proteína denominado peptidoglicana. A presença dessa parede confere a manutenção da forma bacteriana, previne a ruptura da célula, além de desempenhar um importante papel na divisão celular. Clinicamente, a parede celular é importante, pois contribui para a patogenicidade de algumas espécies e por também ser o local de ação de alguns antibióticos (TORTORA *et al.*, 2008).

De acordo com a composição química da parede celular as bactérias são classificadas em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas.

Nas bactérias gram-positivas, a parede celular é composta por muitas camadas de peptidoglicana, que impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido a presença de açúcares e aminoácidos, formando uma estrutura espessa e rígida. Além de possuir na sua constituição, ácidos teicóicos, que consistem principalmente em um álcool (glicerol ou ribitol) e fosfato (SCHAECHTER *et al.*, 2002; TORTORA *et al.*, 2008).

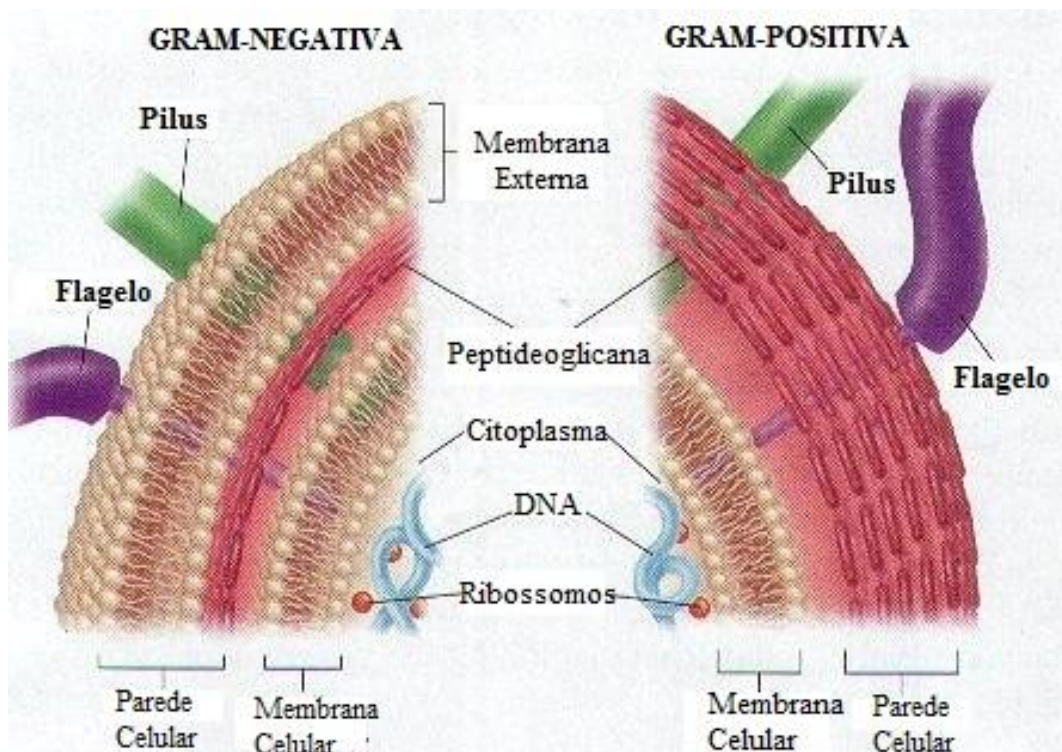
Ao contrario, a parede celular das bactérias Gram-negativas consiste de uma ou poucas camadas de peptidoglicana e uma membrana externa. Por vez, devido à pequena quantidade de peptidoglicana as bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis ao

rompimento mecânico. A membrana externa formada basicamente por lipopolissacarídeos, lipoproteína e fosfolípídios desempenha várias funções especializadas, confere uma barreira para certos antibióticos (penicilina), enzimas digestivas (lisozima), os detergentes, os metais pesados, os sais biliares e certos corantes (TORTORA *et al.*, 2008).

Por conta das características lipossolúveis da membrana externa, as bactérias desenvolveram canais especiais, chamados de porinas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons (SCHAECHTER *et al.*, 2002; TORTORA *et al.*, 2008).

Os agentes antimicrobianos penetram mais facilmente através da parede celular das Gram-positivas, porém devem atravessar os canais de porinas nas gram-negativas (TRABULSI, *et al.*, 2004). A Figura 13 apresenta um esquema representativo das diferenças entre os dois grupos de bactérias.

**Figura 13:** Diferenças morfológicas das bactérias Gram-negativas e Gram-positiva.



Fonte: [http://www.reefcorner.org/forum/topic.asp?TOPIC\\_ID=83813](http://www.reefcorner.org/forum/topic.asp?TOPIC_ID=83813). Acesso em 17 de setembro de 2012.

### 3.5.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compete à família Micrococcae, ao lado dos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, destas 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (SANTOS *et al.*, 2007). Normalmente, esse gênero faz parte da microbiota normal da pele humana, além de estar presente nas fossas nasais, garganta e intestinos. Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização (CAVALCANTI *et al.*, 2005). A espécie estafilocócica de maior interesse é o *Staphylococcus aureus* (Figura 14), designada assim por causa da pigmentação amarela das colônias (*aureus* = Dourado). Atualmente é um dos microorganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (CASSETTARI *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2008).

*Staphylococcus aureus* bactéria Gram-positiva, apresenta-se como cocos esféricos, com aproximadamente 0,5 a 1,5µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e na maioria das vezes não-encapsulados (TRABULSI *et al.*, 2005). Os membros desta espécie são germes anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento em torno de 30 a 37°C (BRESOLIN *et al.*, 2005). A bactéria *S. aureus* é expressivamente muito resistente, sendo capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira, o que contribui para sua ampla distribuição (SANTOS *et al.*, 2007). Além de produzir uma série de enzimas e toxinas (enterotoxinas, a esfoliatina) extracelulares que aumentam sua patogenicidade, através do desenvolvimento de resistência a antibióticos (SILVA *et al.*, 2007; TORTORA *et al.*, 2008).

As infecções provocadas pelo *S. aureus* podem ocorrer devido a vários fatores, dentre estes, a colonização direta dos tecidos, a bacteremia primária ou, as toxinas produzidas (ANDRIOLO, 2005). Dentre essas infecções podem ser citadas infecções na pele e no tecido subcutâneo tais como foliculite, furunculose, carbúnculo e impetigo, de acordo com a localização e outras características; infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia (GONÇALVES, MAGALHÃES, 1998; LOWY, 1998). Além das infecções, *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, seja por conta de um processo infeccioso ou não, como intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (SILVA *et al.*, 2007)

### 3.5.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* foi subdivido em vários outros gêneros. Possuindo ainda 2 mil espécies, pertencentes a família Pseudomonadaceae. A principal espécie é *Pseudomonas aeruginosa* (MANDELL *et al.*, 2010).

*P. aeruginosa* (Figura 14) é um bacilo Gram-negativo aeróbico, não-esporulado, não-fermentador de glicose e móvel, devido à presença de um flagelo polar (FERREIRA, LALA, 2010). Uma das características da espécie é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, designado piocianina e pioverdina. São comuns no solo, água, vegetais e ambientes hospitalares, e ainda faz parte da microbiota normal do ser humano, encontrado na pele, orofaringe, períneo, mucosa nasal, sendo o trato gastrointestinal sua principal área de colonização (MURRAY *et al.*, 2010).

A bactéria *P. aeruginosa* é invasiva e toxigênica. Possui muitos fatores de virulência, dentre eles merecem destaque os componentes estruturais, toxinas e enzimas, entretanto o papel de cada um ainda não foi definido, porém acredita-se que a patogenicidade das infecções causadas por *P. aeruginosa* seja multifatorial (POLLACK, 2000).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* variam desde lesões superficiais na pele até septicemias fulminantes. Este microrganismo causa infecções tipicamente oportunistas, em queimaduras, processos cirúrgicos, cateterização urinária, meningites, endocardites e pneumonias, especialmente após processo de entubação, o que pode resultar em bacteremias severas (MURRAY *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007).

As fontes de maior contaminação são os aparelhos de respiração, sistemas de hemodiálise, pias e artefatos de limpeza (CARMELI *et al.*, 1999; MANDELL *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* destaca-se como um patógeno hospitalar devido sua relativa resistência aos antibióticos e a suscetibilidade diminuída aos antissépticos e desinfetantes (ANDRADE *et al.*, 2003).

### 3.5.1.3 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies, pertence à família Enterobacteriaceae. Do ponto de vista clínico, a espécie que apresentar maior destaque é a *Escherichia coli* (MURRAY *et al.*, 2010).



*E. coli* (Figura 14) encontram-se na forma de bastonetes gram-negativos, não esporulados, tamanho entre 1,1-1,5 µm por 2-6 µm. São microrganismos anaeróbicos facultativos, uma vez que, possuem o metabolismo respiratório e fermentativo, com temperatura de crescimento entre 18° - 44° C. Normalmente encontradas na microbiota intestinal do homem, especificamente no intestino grosso de seres endotérmicos (VOGT, *et al.*, 2005; FORTES, 2008).

A bactéria *E. coli* é considerada inofensiva e um patógeno versátil, as agentes de infecções são designadas *E. coli* enterovirulenta, dividindo-se em quatro classes: *E. coli* patogênica (gastroenterites com diarreia aquosa e sanguinolenta, dominante em crianças com menos de um ano), *E. coli* enterotoxigênica (doença diarreica em indivíduos de todas as idades), *E. coli* enterohemorrágica (enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades) e *E. coli* invasora (diarreia sanguinolenta ou não, com presença de leucócitos e muco) (TRABULSI *et al.*, 2004).

Além da crescente resistência, *E. coli* possui também fatores intrínsecos que contribuem para sua virulência, como antígenos de superfície K, produção de *pili*, que fixa o microrganismo a vários tecidos do hospedeiro; produção de colicinas, inibem outras bactérias no mesmo nicho; síntese de hemolisinas e sideróforos, obtêm ferro do organismo possibilitando a multiplicação nos fluido orgânicos; e produção de citotóxicas, denominadas de verotoxinas (ASSIS, SANTOS, 2005; NARCISO *et al.*, 2010; MURRAY *et al.*, 2010).

Os quadro clínicos de colite hemorrágica, cistite, nefrite, infecção diferida cirúrgicas, septicemia e sobretudo da síndrome uremia-hemolítica estão associados a uma variedade de cepas de *E.coli* (TORTORA *et al.*, 2008; GERMANO P. GERMANO M., 2011)

#### 3.5.1.4 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* é composto por fundamentais patógenos humanos, pertence à família Enterobacteriaceae, que se destaca devido a seus potentes mecanismos de resistência, são encontrados comumente no solo ou na água. Os membros desse gênero que ocorrem com maior frequência são *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* (SOULI, *et al.*, 2008; MURRAY *et al.*, 2010).

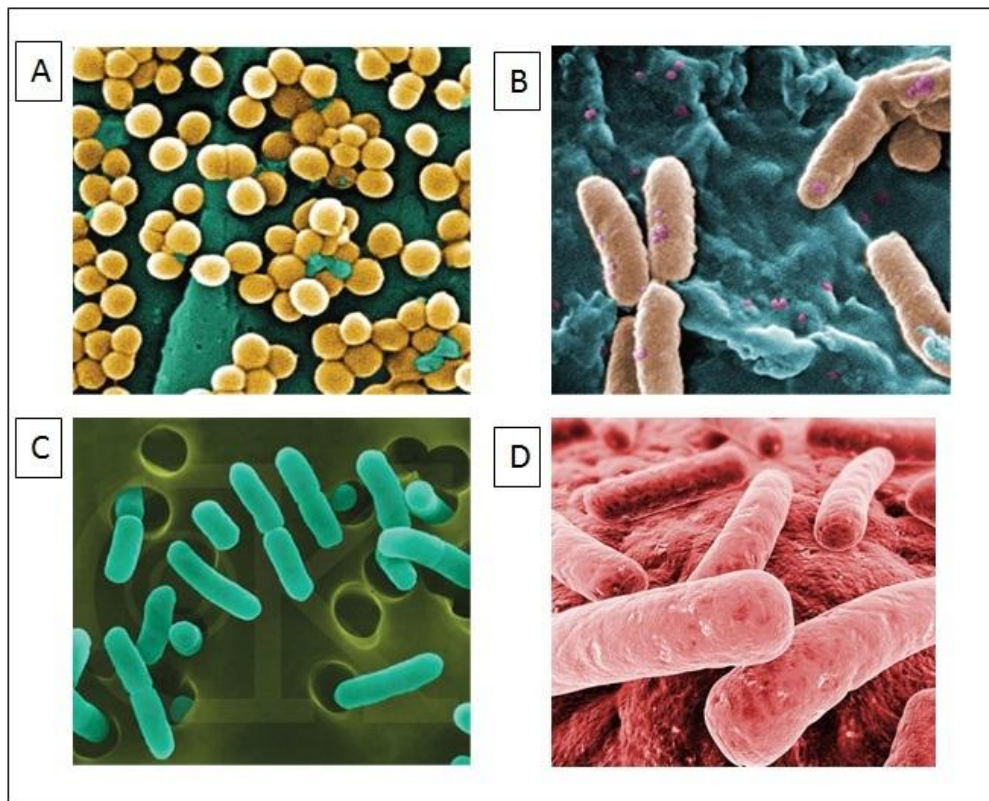
*Klebsiella pneumoniae* (Figura 14) é um bacilo Gram-negativo, encontrado na microbiota humana, especialmente no trato gastrointestinal. É um patógeno de infecções hospitalares, responsável por surtos em unidades de internação intensiva. Ocasionalmente



causa um tipo grave de pneumonia em humanos imunocomprometidos (TORTORA *et al.*, 2008; DIPERSIO, 2005)

Esta bactéria possui uma cápsula proeminente que confere uma maior virulência ao microrganismo, além de produz enzimas betalactamases de espectro expandido, o que contribui para o aumento da resistência às cefalosporinas, utilizadas para o tratamento de indivíduos (MENEZES, *et al.*, 2007; MURRAY *et al.*, 2010).

**Figura 14:** Imagens bacterianas: A - *Staphylococcus aureus*; B - *Pseudomonas aeruginosa*; C- *Escherichia coli*; D - *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: LIGHT, 2010; <http://www.bioquell.com/technology/microbiology/klebsiella-pneumoniae>. Acesso em 28 de setembro de 2012.

### 3.5.2 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos) e seres ubíquos, sendo encontrados em diversos ambientes, como água, terra, ar ou em parasitismo (ALMEIDA, 2008). Seu núcleo é bem definido por

uma membrana nuclear, constituída por lipídeos, glicoproteínas e esteróis, similar a membrana das células animais, um aspecto que representa um sério problema no tratamento das infecções fúngicas (SCHAECHTER *et al.*, 2002; TORTORA *et al.*, 2008).

A membrana plasmática representa uma barreira semipermeável, composta por uma porção hidrofóbica e uma hidrofílica, com constituição química de esteróis, principalmente o ergosterol, responsável por inúmeras características físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006). A parede celular é uma barreira protetora essencial para o crescimento e viabilidade fúngica, constituída principalmente por quitina (SARTORI, 2005; SIDRIN, ROCHA, 2010).

As infecções fúngicas oportunistas têm aumentado nos últimos anos, ocorrendo principalmente em ambientes hospitalares e em indivíduos imunocomprometidos. As mais comuns, superficiais e invasivas são as causadas por leveduras, especialmente pelo gênero *Candida* (SIDRIN, ROCHA, 2010).

### 3.5.2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é composto por cerca de vinte espécies patogênicas e entre estas se destacam *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (ZARDO, MEZZARI, 2004; MARTINS *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2008). Estas leveduras estão presentes na microbiota normal, encontradas geralmente na vagina e trato gastrointestinal, apresentando-se patogênicas quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico, geralmente resultante de fatores fisiológicos e imunológicos, ocorrendo um aumento na multiplicação e/ou invasão destes microrganismos em tecidos, instalando-se a candidíase ou candidoses (MARTINS *et al.*, 2002).

A candidíase pode ocorrer em dois estágios: superficiais ou profundas, com localização cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica. Na candidíase cutânea são atingidos os tecidos da mucosa vaginal e mucosa oral, na sistêmica o fungo pode atingir vários órgãos causando candidíase pulmonar, endocardite, fungemia e nefrite (LACAZ *et al.*, 2002; ALMEIDA, 2008).

*Candida albicans* (Figura 15), principal levedura do gênero *Candida*, cresce frequentemente nas membranas mucosas da boca, do trato intestinal e geniturinário. As

infecções são geralmente resultado do supercrescimento oportunista, quando a flora competidora é suprimida por antibióticos ou outros fatores (TORTORA *et al.*, 2008).

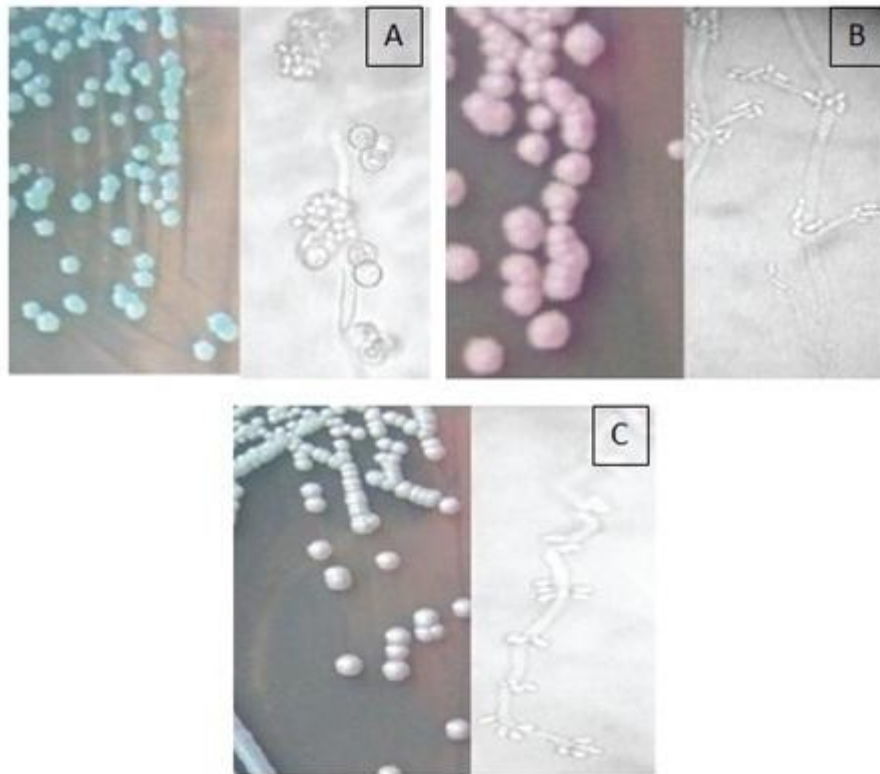
É considerado o patógeno oportunista mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe. Para dar início ao processo de infecção, a *C. albicans* expressa fatores de virulência tais como: adesividade, alterações fenotípicas e morfológicas que resultam no sucesso do processo infeccioso. Além de desenvolver proteção contra lise osmótica (parede celular); liberação de proteases que facilitam sua entrada no epitélio do hospedeiro; formação de hifas para aumentar a capacidade nutricional e fixação ao tecido (CALDERONE; FONZI, 2001; ROSSI *et al.*, 2011).

*Candida krusei* (Figura 15) corresponde atualmente a 50% das infecções invasivas, frequentemente é encontrada no trato gastrointestinal, trato respiratório superior e trato urinário (HURLEY WINNER, 1966; ODDS, 1988; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003). Dentre as Infecções causadas por *C. krusei* destacam-se, endoftalmia, artrite e endocardite (SAMARANAYAKE Y., SAMARANAYAKE L., 1994). Alguns estudos relatam o amplo repertório de resistência de *C. krusei* aos antifúngicos, especialmente ao fluconazol, anfotericina B e a 5-fluorocitosina (BARBEDO, SGARBI, 2010).

*Candida tropicalis* (Figura 15) é uma levedura oportunista encontrada na pele e no trato digestivo de hospedeiros humanos saudáveis (ODDS, 1998). É considerada a segunda espécie mais isolada e um dos agentes etológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias (NUCCI, COLOMBO, 2007). As infecções causadas por *C. tropicalis* geralmente são restritas aos hospedeiros imunocomprometidos, provocando candidíase disseminada, endocardite, meningite, pielonefrite, vaginite e esofagite (LACAZ *et al.*, 2002; PRETTO, 2005).

Entre as espécies de *Candida*, a resistência aos antifúngicos tem sido um problema crescente, o que dificulta o tratamento da candidíase e de outras infecções causadas por leveduras (ARAÚJO *et al.*, 2005). Alguns fatores de virulência do gênero *Candida*, contribuem com aumento dessa resistência, como a formação do micélio que propicia maior aderência, dificultando a ação fagocitária do sistema imune. O mecanismo switching, uma significativa alteração fenotípica na morfologia das colônias das leveduras do gênero *Candida*, além de contribuir para mudanças na sensibilidade à drogas. Normalmente existem várias diferenças entre as colônias que apresentam *switching* e as demais, incluindo mudança no formato, estruturas de superfície celular e germinação a 37°C, o que parece torná-las mais virulentas (RIBEIRO *et al.*, 2004; ÁLVARES *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2011)

**Figura 15:** Leveduras gênero *Candida*: A) *Candida albicans*; B) *Candida krusei*; C) *Candida tropicalis*



Fonte: AGARWAL *et al.*, 2011.

### 3.6 Resistência Microbiana

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os microrganismos data desde o início da era microbiana. Devido à introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica. As bases para o tratamento farmacológico das infecções por microrganismos são de 1936, com a utilização clínica de sulfamidas em humanos e a produção de benzilpenicilina em 1941. O que contribuiu, nas três décadas seguintes, para o aumento de oito anos da perspectiva média de vida da população (DIAS, MONTEIRO, 2009).

Entretanto, a larga eficácia dos antibióticos foi o fio condutor para o cenário atual da resistência microbiana. Através da sua utilização intensiva, originou-se uma série de problemas dentre eles o desequilíbrio da ecologia humana e uma pressão seletiva crescente no meio, acelerando o desenvolvimento de formas de adaptação e resistência pelos microrganismos aos mecanismos de ação dos antimicrobianos (DIAS, MONTEIRO, 2009; QUEIROZ, FERREIRA, 2010).

A resistência microbiana a diversos antimicrobianos e agentes quimioterápicos impõe sérios obstáculos às opções para o tratamento de infecções, representando uma ameaça para a saúde pública. Ela é uma inevitável consequência do uso indiscriminado e de maneira maciça dessas drogas em humanos e animais, associado a fatores como doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada, esquemas terapêuticos curtos, baixa penetração no local da infecção e do conhecimento indevido das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco para escolha terapêutica (SILVEIRA *et al*, 2006; COUTINHO *et al* 2010).

Mundialmente existem cada vez mais microrganismos resistentes, principalmente cepas bacterianas, resistentes a múltiplas drogas, com número maior de ocorrência em meio hospitalar, aumentando a morbidade, os custos inerentes às prestações dos cuidados de saúde, bem como as taxas de mortalidade por infecções. Justamente por isso é necessário ressaltar que antibiótico é um medicamento capaz de tratar algumas infecções e salvar vidas, porém podem causar danos irreversíveis quando utilizados de forma não apropriada (TRAVASSOS, MIRANDA, 2010).

### 3.6.1 Mecanismos da Resistência Bacteriana

A resistência de uma bactéria a um determinado antibiótico é determinada, quando ocorre crescimento, *in vitro*, em concentrações mais altas que a maior concentração alcançada pela droga no sítio da infecção (TRABULSI, ALTHERTHUM, 2005; TORTORA *et al.*, 2008). Os dois principais fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antibióticos em bactérias são a pressão seletiva e a presença de genes de resistência (WITTE, 2000). Esta resistência pode ser transmitida entre gerações de bactérias. Geralmente os microrganismos adquirem resistência através de mecanismos genéticos, as mutações, e muitas vezes através dos mecanismos bioquímicos, que incluem a síntese de enzimas que inativam a droga (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

#### 3.6.1.1 Mecanismos Genéticos

A resistência desenvolvida por muitas bactérias pode ser determinada pelo genoma bacteriano, que codifica a expressão de mecanismos bioquímicos capazes de neutralizar os

efeitos dos antibióticos (FERREIRA, 2007). Os mecanismos genéticos básicos são mutação, transformação, conjugação, transposição e transdução (Figura 16).

A mutação é um mecanismo caracterizado pelo grande número de divisões que ocorre na bactéria, resultando na troca de bases nitrogenadas durante a síntese do DNA, levando a alterações nas características genéticas da célula bacteriana. A resistência adquirida através deste mecanismo corresponde apenas a um tipo de antibiótico (JACOB, 2005; TORTORA *et al.*, 2008).

Na transformação a bactéria captura do meio, DNA cromossomal ou plasmidial, de uma bactéria que sofreu lise, adquirindo assim suas características. Segundo Rouveix (2007), esse fenômeno tem pouca relevância clínica na passagem de resistência nas condições naturais. Além de acontecer somente entre bactérias da mesma espécie, sendo constatada entre hemófilos, neissérias, estafilococos e estreptococos (TORTORA *et al.*, 2008).

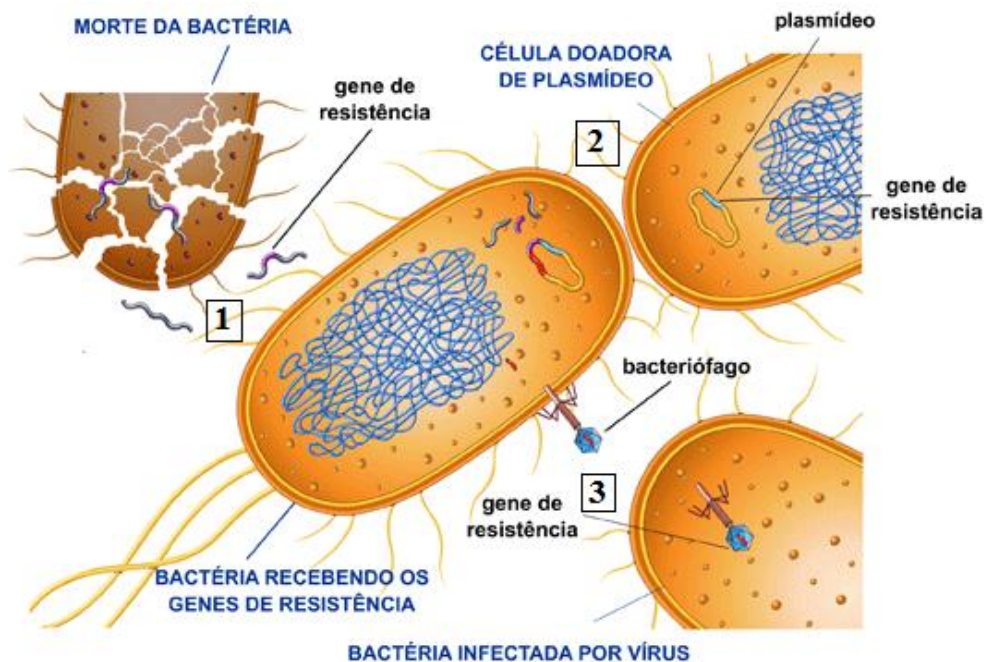
Plasmídeos transportam genes independentes do DNA cromossômico, que não são essenciais para a vida. Por meio da conjugação podem ser transferidos de uma bactéria para outra, codificando características genéticas inexistentes na célula receptora. Normalmente, os plasmídeos possuem genes que atribuem à bactéria resistência a antibióticos, permite à sobrevivência bacteriana mesmo na presença de substâncias nocivas. A conjugação é considerada um importante mecanismo relacionado à transferência de resistência a antibióticos (SOUSA JR *et al.*, 2004).

Os plasmídeos possuem um conjunto de genes denominado transposons, que são transferidos de um plasmídeo para outro, essa transferência é denominada de transposição (SRINIVASAN *et al.*, 2002). Frequentemente está envolvida na importação dos genes causadores do fenômeno da resistência transferível (TAVARES, 2000; BOMONO, SZABO, 2006; MIN *et al.*, 2007).

Transdução é um mecanismo de transferência do material genético do cromossomo ou do plasmídeo de uma bactéria para outra mediada pelos bacteriófagos. (JACOBY, 2005). A transdução de genes da resistência bacteriana não apresenta importância prática, pois raramente, sucede a incorporação de fragmentos de DNA cromossômico com genes de resistência no fago. Sobretudo, o fragmento transferido pode não se combinar corretamente com o cromossomo da bactéria infectada, assim ser hidrolisado ou permanecer no citoplasma sem se replicar, vindo a desaparecer com a contínua multiplicação da bactéria (ROUVEIX, 2007). Entretanto há controvérsias no âmbito de transferência de resistência por transdução, pois o principal mecanismo de aquisição de resistência dos estafilococos, é a transdução por

plasmídeo, que pode ser simples (contra penicilina G) ou múltipla (contra a canamicina, eritromicina, penicilina e tetraciclina) (FERREIRA, 2007; TORTORA *et al.*, 2008).

**Figura 16:** Mecanismos genéticos de transferência da resistência bacteriana 1) Transformação, 2) Conjugação, 3) Transdução.



Fonte: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mec\\_animacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm). Acesso em 15 de outubro de 2012.

### 3.6.1.2 Mecanismos Bioquímicos

As bactérias podem adquirir resistências aos antibióticos, através do desenvolvimento de mecanismos bioquímicos, que impossibilitam o antibiótico de realizar o seu mecanismo de ação dentro da célula bacteriana.

Essencialmente os mecanismos bioquímicos possuem três mecanismos de ação contra o antibiótico (Figura 17): 1) Inativação do antibiótico por enzimas, resultando na modificação química da estrutura da droga, e no aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete; 2) Alteração do sítio alvo do antibiótico, de forma que a ligação da droga ou a inibição da função não ocorrem; 3) barreira de permeabilidade, podendo ocorrer diminuição da permeabilidade da célula bacteriana o que impede a droga alcançar o seu alvo em uma concentração crítica, além do efluxo do antibiótico, impossibilitando o seu transporte para

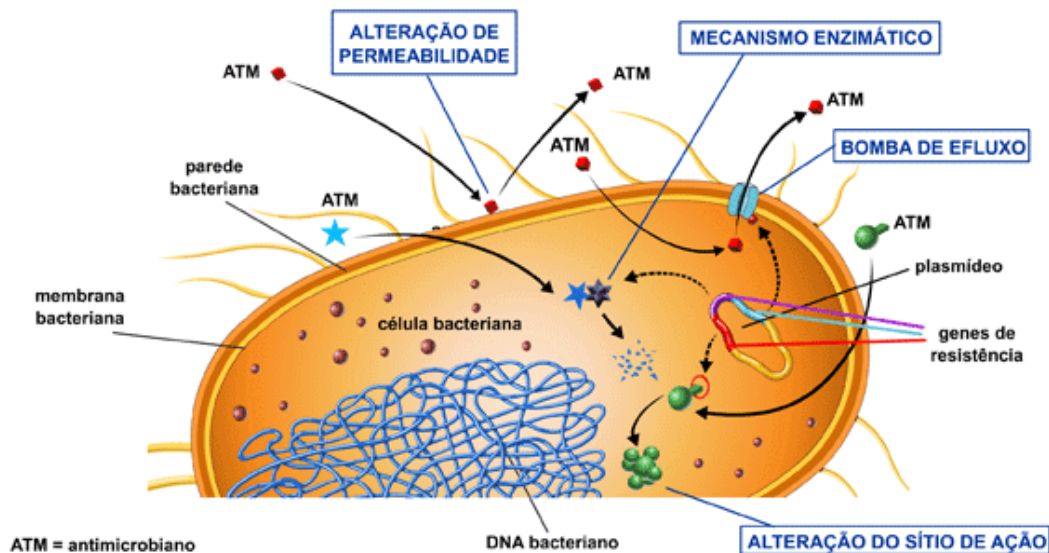


dentro da célula (DAZA *et al.*, 1998; HOOPER, 2005; MIN *et al.*, 2007; VERMELHO *et al.*, 2007)

Os mecanismos bioquímicos podem acontecer concomitantemente em uma mesma cepa bacteriana, além de desenvolver uma resistência cruzada contra diferentes antibióticos (CHOPRA *et al.*, 2002).

Um grupo pequeno de espécies bacterianas produz endósporos, uma estrutura que contribui para a sobrevivência em condições de estresse, principalmente no calor, na radiação, na falta de nutrientes e umidade, sendo apontado como um mecanismo de resistência (VERMELHO *et al.*, 2007; TORTORA *et al.*, 2008).

**Figura 17:** Mecanismos bioquímicos da resistência bacteriana.



Fonte: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/mec\\_animacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm). Acesso em 15 de outubro de 2012.

### 3.6.2 Resistência à aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antibióticos inibidores da síntese protéica, exibem atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismo como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, micobactérias e protozoários (PINSETTA, 2010), são geralmente utilizados no tratamento de bacteriemias, septicemias, endocardites em associação com vancomicina e tuberculose (KATZUNG, 2010).



O grupo de aminoglicosídeos é isolado de *Streptomyces* spp. (estreptomicina, neomicina e trombamicina), ou *Micromonospora* spp. (gentamicina) ou derivados por semi-síntese (amicacina netilmicina, arbecacina e isepamicina e outros) (DURANTE-MANGONI et al., 2009). São moléculas hidrofílicas, formadas por um anel hexose, que estão ligados a vários açúcares aminados, através de ligações glicosídicas, mas ativos em pH alcalino. O principal mecanismo de resistência estabelecido clinicamente é a produção de uma enzima transferase, que inativa o aminoglicosídeo por adenilação, acetilação ou fosforilação. Outros mecanismos são relatados como a diminuição na concentração de aminoglicosídeo dentro da célula alvo, pela redução da penetração de na célula bacteriana e a alteração ou destruição da proteína 30S, local alvo de ligação do aminoglicosídeo (KATZUNG, 2010).

### 3.6.3 Resistência Fúngica

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas é limitado, ocorrendo falhas na resposta clínica, devido à eficácia e tolerância dos agentes antifúngicos. O que representa um grande desafio para a clínica, devido ao crescente número de cepas fúngicas resistente aos fármacos antifúngicos atualmente comercializados (SCHREIBER *et al.*, 2007).

A resistência fúngica caracteriza-se em dois tipos: a primária ou intrínseca, já presente na fisiologia de certos fungos, ocorre sem exposição prévia a drogas. A secundária ou adquirida, encontrada após exposição a agente antifúngico, desenvolvendo resistência as cepas devido principalmente a expressão do gene alterado (KANAFANI, PERFECT, 2008)

Dentre os vários mecanismos bioquímicos de resistência fúngica a antifúngicos, a redução da concentração intracelular dos mesmos realizada por transportadores de efluxo é o principal. Além de ser identificada a modificação ou degradação da droga no interior da célula, mudanças na interação da droga com o seu sítio alvo ou ainda a interação com outras enzimas (BERGOLD, GEORGIADIS, 2004; SEGATO, 2008).

São vários os fatores que contribuem para o aparecimento, cada vez maior, da resistência fúngica, principalmente o uso indiscriminado da terapia antifúngica incluindo a profilaxia e auto-medicação (SCHREIBER *et al.*, 2007).

### 3.7 Potencial Modulador

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) ou substâncias isoladas ou sintéticas que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (GIBBONS, 2004; COSTA *et al*, 2008).

Atualmente combinações múltiplas de drogas estão sendo utilizadas no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Relatos indicam que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicadas em clínicas são comuns, é o caso da combinação de penicilina com a gentamicina. Essa combinação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal que vai alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO *et al.*, 2008).

Quando a substância, utilizada na combinação, intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON, ONOFRE, 2010).

Segundo Katzung (2010) o sinergismo antimicrobiano possui três mecanismos importantes: 1) Bloqueio das fases sequenciais em sequência metabólicas, 2) Inibição das enzimas de inativação e 3) Aumento da absorção do agente antimicrobiano. Justamente por isso as combinações sinérgicas entre antimicrobianos, produto natural e substância isolada se mostram, na maioria das vezes, mais efetivas do que a monoterapia com componentes individuais. Sendo relatado poucos casos de antagonismo.

A modulação de drogas ocorre na maioria das vezes por substâncias com caracter lipofílico, devido principalmente à facilidade da interação dessas substâncias com as membranas biológicas dos microrganismos. Contudo, Nicolson e colaboradores, 1999 ressaltam que bactérias Gram-negativas aparentemente são mais suscetíveis a compostos apolares, provavelmente devido à presença de cadeias polissacarídeos, que servem como barreira para compostos hidrofóbicos ativos na membrana.

Testes modulatórios realizados, entre antibióticos e óleos essenciais, demonstram muitos mecanismos pelos quais os óleos essenciais podem potencializar o efeito dos antibióticos, devido principalmente seu caracter lipossolúvel. Envolvendo diferentes

interações entre os compostos presentes no óleo e a membrana procariótica (BURT, 2004). O timol e carvacrol, componentes de óleo essencial, podem ser eficazes contra os microorganismos através de uma ação lipofílica na membrana celular, produzindo uma difusão da cadeia de polipeptídeos da membrana celular e causando dilatação e conseqüente desestabilização da membrana, desnaturando enzimas essenciais, aumento conseqüentemente a permeabilidade celular. Atuando sinergicamente com antibióticos frente a célula contra a qual estão desempenhando a sua atividade (NICOLSON *et al.*, 1999; COWAN, 1999; NOSTRO *et al.*, 2004).

# MATERIAL E MÉTODOS

---

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Substâncias

As vitaminas lipossolúveis utilizadas foram: Cholecalciferol - vitamina D, (+)- $\alpha$ -Tocopherol – Vitamina E e Menadione - Vitamina K (Sigma Co., St. Louis, USA). Como controle e comparação do mecanismo de ação foram utilizados o colesterol e ergosterol (Sigma Co., St. Louis, USA). Algumas propriedades químicas das substâncias citadas estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Propriedades químicas das vitaminas lipossolúveis Colecalciferol, (+)- $\alpha$ -Tocoferol, Menadiona e do colesterol e ergosterol.

<b>PROPRIEDADES QUÍMICAS</b>					
	<b>Colecalciferol</b>	<b>(+)-<math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	<b>Menadiona</b>	<b>Colesterol</b>	<b>Ergosterol</b>
<b>Fonte</b>	Sintética	Óleo vegetal	Sintética	Sintética	Sintética
<b>Biológica</b>					
<b>Fórmula</b>	$C_{27}H_{44}O$	$C_{29}H_{50}O_2$	$C_{11}H_{18}O_2$	$C_{27}H_{46}O$	$C_{28}H_{44}O$
<b>Empírica</b>					
<b>Coloração</b>	Amarelo	Amarelo claro/vermelho	Amarelo	Branco	Amarelo
<b>Peso molecular (g/Mol)</b>	384.64	430.71	172.18	386.65	396.65

### 4.2 Linhagens Bacterianas e Fúngicas

As cepas bacterianas utilizadas no teste de concentração inibitória mínima foram: *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 10536 e *K. pneumonia* ATCC 4362. Já na avaliação da modulação de antibióticos foram utilizadas cepas multiresistentes *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27 com perfil de resistência identificado na Tabela 2.

As cepas fúngicas utilizadas na concentração inibitória mínima e na modulação foram: *C. albicans* 40006, *C. krusei* 6258 e *C. tropicalis* 13803.

Todas as linhagens foram adquiridas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia – UFPB.

**Tabela 2:** Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência das bactérias a antibióticos

<b>Bactéria</b>	<b>Origem</b>	<b>Perfil de Resistência</b>
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast,Ax,Ami,Amox,Ca,Cfc,Cf,Caz,Cip,Clo,Im,Can,Szt,Tet,Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa,Gen,Tob,Ami,Can,Neo,Para,But,Sis,Net
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ast-Aztreonan; Amx- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxicilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacina; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paromomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Com-Cefepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Meropenem.

### 4.3 Meios de Cultura

Nos ensaios biológicos foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Heart Infusion Agar* - HIA (Difco Laboratories Ltda.), *Caldo Brain Heart Infusion* – BHI (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante. Culturas de fungos e bactérias foram mantidas a 4° C em HIA. Antes dos testes, as linhagens foram inicialmente cultivadas em BHI a 3,7, em seguida, incubadas a 35° C por 24 horas para crescimento microbiano. Para os testes as suspensões foram diluídas em BHI a 10% até a obtenção de 10<sup>5</sup> UFC/mL (NCCLS, 2000).

### 4.4 Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas no teste de modulação foram antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, amicacina, gentamicina e neomicina (Sigma Co., St. Louis, USA),

preparados em uma concentração de 5.000 µg/mL. Já os fármacos utilizados como antifúngico foram: anfotericina B, nistatina, mebendazol e benzoilmetronidazol (Sigma Co., St. Louis, USA), com concentração de 1024 µg/mL. Todas as drogas foram dissolvidas em água destilada e estéril.

Para leitura dos testes foi utilizado o reagente resazurina sódica (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) um indicador crescimento bacteriano colorimétrico de óxido-redução. A ocorrência da mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano. Resazurina sódica foi diluída em água destilada e armazenada a 4° C protegida da luz (SALVAT *et al.*, 2001; PALOMINO *et al.*, 2002).

#### **4.5 Preparação da Solução Teste**

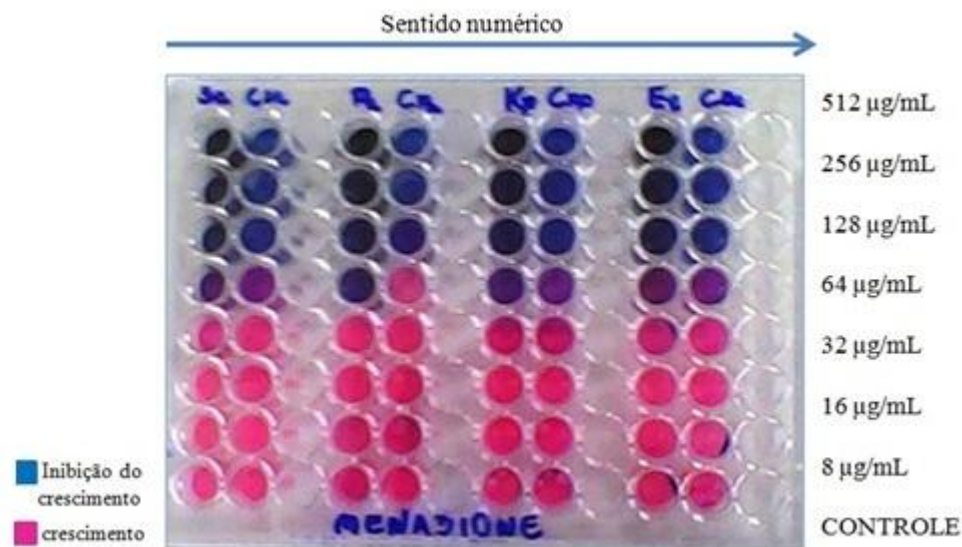
Para o preparo da solução inicial das substâncias, foram pesadas 100 mg de cada e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Darmstadt, Alemanha), obtendo uma concentração inicial de 100 mg/mL. A partir dessa concentração foi feito uma diluição em água destilada estéril para atingir a concentração de 1024 µg/mL, solução utilizada no teste. Diferentemente a substância Menadiona para atingir a concentração 1024 µg/mL, foi novamente diluída em DMSO. O controle com DMSO foi feito para verificar possível interferência nos resultados.

#### **4.6 Teste Concentração Inibitória Mínima**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo o método de microdiluição em caldo. A CIM é definida como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realizá-la foi utilizada uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, e preparado um meio de distribuição em tubos *eppendorf*® contendo uma solução de 1 mL composta por 900 µL de BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana ou fúngica. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido numérico (Figura 18), adicionando 100 µL da solução de distribuição em cada cavidade, posteriormente foi realizada a microdiluição seriada com 100 µL de cada solução teste, com concentrações finais variando de 512 a 8 µg/mL, até a penúltima cavidade, pois a ultima foi destinada ao controle do crescimento microbiano. Em seguida as placas foram incubadas durante 24 h a 35° C (JAVADPOUR *et al.*, 1996).

Para revelação das placas com bactérias, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de resazurina, e após 1 hora em temperatura ambiente foi realizada a leitura. Para os fungos foi observada a turbidez provocada pelo crescimento.

**Figura 18:** Representação da placa do teste Concentração Inibitória Mínima (CIM), sentido numérico para preenchimento, variação de concentrações (512 a 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), leitura através da mudança de coloração: azul: inibição de crescimento, rosa: crescimento.



Fonte: ANDRADE, J.C.

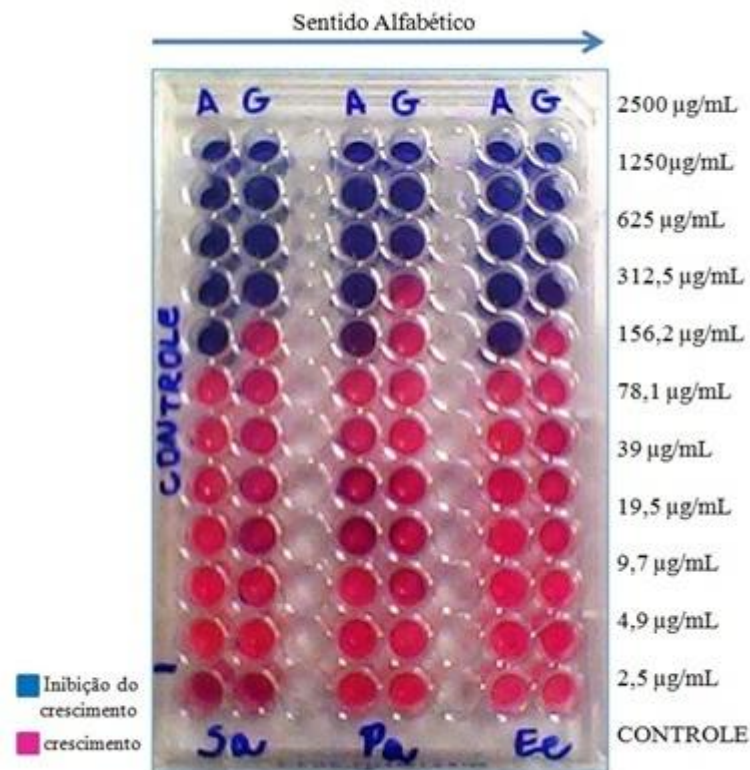
#### 4.7 Teste de modulação da ação de antibióticos e antifúngicos

Para avaliar o potencial das vitaminas lipossolúveis, colesterol e ergosterol como modificadores da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As soluções foram testadas em três concentrações subnibitórias (CIM/8, CIM/4 e CIM/2). O meio de distribuição foi preparado em tubos *ependorf*® contendo cada BHI 10% + 150  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ou fúngica + substâncias, atingindo 1,5 mL de solução. Para controle, as solução de 1,5 mL possuía apenas BHI 10% + 150  $\mu\text{L}$  de suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido alfabético (Figura 19), adicionando 100  $\mu\text{L}$  da solução de distribuição em cada cavidade, em seguida fazendo microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100  $\mu\text{L}$  da droga (antibiótico e antifúngico), até a penúltima cavidade, posteriormente as placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. As



concentrações de aminoglicosídeos e antifúngicos variavam gradualmente de 5000 a 2,44  $\mu\text{g/mL}$  e 1024 a 8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A leitura foi realizada da mesma maneira do teste de CIM.

**Figura 19:** Representação da placa do teste de modulação de aminoglicosídeos, sentido alfabético para preenchimento, variação de concentrações (2500 a 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ), leitura através da mudança de coloração: azul: inibição de crescimento, rosa: crescimento.



Fonte: ANDRADE, J.C.

#### 4.8 Análise Estatística

O número de eventos (antagonismo ou sinergismo) foi avaliado e as diferenças foram estimadas por meio da análise de variância (ANOVA) e expressos em gráficos.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da atividade antimicrobiana e potencialização de drogas pelas vitaminas lipossolúveis: colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona, frente a bactérias multiresistentes e leveduras. Até então não se tinha nenhum registro da utilização das mesmas como modulador de antimicrobianos, concomitante com outras drogas.

O estudo feito com as vitaminas originou quatro artigos, a serem submetidos, encontrando-se em processo de tradução e uma patente, depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, aguardando número de registro.

### LISTA DE PRODUÇÕES

5.1 Uso de colecalciferol como agente modulador de aminoglicosídeos frente a linhagens bacterianas multiresistentes.

5.2 Análise “*in vitro*” da modulação de aminoglicosídeos por alfa-tocoferol frente a linhagens bacterianas multiresistentes.

5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora de menadiona sobre cepas bacterianas multiresistentes.

5.4 Efeito modulador das vitaminas lipossolúveis sobre *Candida* spp.

5.5 Patente: Avaliação da Atividade Moduladora de vitaminas lipossolúveis caracterizada por menadiona (vitamina K), Alfa-Tocoferol (Vitamina E) e Colecalciferol (Vitamina D) frente a bactérias multiresistentes.

## 5.1 USO DE COLECALCIFEROL COMO AGENTE MODULADOR DE AMINOGLICOSÍDEOS FRENTE À LINHAGENS BACTERIANAS MULTIRESISTENTES

### RESUMO

Este é o primeiro relato da atividade moduladora por colecalciferol. Neste estudo, a solução de colecalciferol foi avaliada contra linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multiresistentes. Quando associado com aminoglicosídeos, devido ao seu caráter lipossolúvel, sugere-se que o colecalciferol, atuou através de uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, modulando mais efetivamente *P.aeruginosa* e *E.coli*, quando comparado com *S. Aureus*. O colesterol e ergosterol compostos lipídico foram utilizados para verificar a similaridade dos seus mecanismos de ação com o colecalciferol. Não se tem registro da utilização de colesterol e ergosterol como modificadores da ação de antibióticos nem de qualquer outra droga, sendo esse o primeiro estudo realizado neste âmbito. Sendo possível averiguar a analogia do mecanismo de ação modulador entre o colesterol, ergosterol e colecalciferol.

**Palavras-chave:** Aminoglicosídeos, Colecalciferol, permeabilidade, Modulação, Resistência bacteriana.

**Uso de colecalciferol como agente modulador de aminoglicosídeos frente à linhagens bacterianas multiresistentes.**

J.C. Andrade<sup>1</sup>, M.F.B. Morais Braga<sup>1</sup>, G.M.M.Guedes<sup>1</sup>, S.R. Tintino<sup>1</sup>, M.A. Freitas<sup>1</sup>, C.E. Sobral-Souza<sup>1</sup>, N.F. LEITE<sup>1</sup>, I. R. A. Menezes<sup>2</sup>, H.D.M.Coutinho<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, <sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil;

\* Autor Correspondente:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

## **INTRODUÇÃO**

O aumento considerável do número de microrganismos que desenvolveram resistência aos antibióticos representa um obstáculo e impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública.

A resistência bacteriana pode ser transferida por vários mecanismos, incluindo: alteração da estrutura molecular dos antibióticos, enzimas de inativação, alteração das proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, plasmídeos de resistência, mutações de permeabilidade (bomba de efluxo) e modificações ribossômicas (FILE Jr *et al.*, 2000; CATÃO *et al.*, 2005; PIDDOCK, 2006; COUTINHO *et al.*, 2008).

Produtos naturais e sintéticos têm sido avaliados não apenas pela sua atividade antibacteriana, mas para verificação de seu potencial modificador contra resistência a diversas drogas, como os aminoglicosídeos, encontrados no perfil de resistência de muitas bactérias, podendo muitas vezes ocorrer uma possível modificação no nível de resistência (OLIVEIRA *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2010).

Compostos lipossolúveis são citados como modificadores da permeabilidade da membrana plasmática das bactérias (PRETTO *et al.*, 2004; GIBBONS, 2004; NICOLSON *et al.*, 1999). Frente a isso, o caráter lipossolúvel do colecalciferol pode demonstrar alteração na fluidez da membrana bacteriana, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antibióticos.

A vitamina lipossolúvel colecalciferol ou calciferol (Figura 1), vitamina D<sub>3</sub>, é produzido por irradiação da luz ultravioleta B, na pele, ou de forma menos eficaz através da dieta (DANTAS *et al.*, 2009). Além do seu papel na homeostase do cálcio, apresenta atividade biológica e efeitos mais complexos em relação ao organismo, como a intensificação da atividade antimicrobiana, mediada por peptídeos endógenos (catelicidina e defensina), em monócitos, neutrófilos e outras linhagens celulares (DANTAS *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010; MARTINEAU *et al.*, 2011; MUSZKAT *et al.*, 2010).

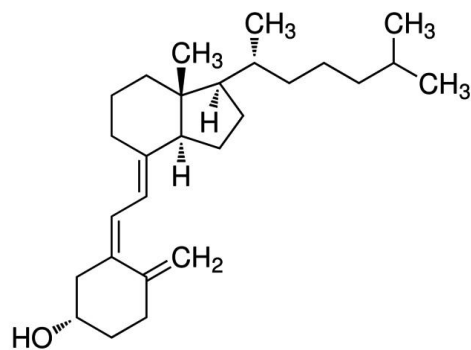


Figura 1: Estrutura molecular plana de Colecalciferol

O colesterol é um componente lipídico, necessário para o funcionamento normal do corpo, desempenha uma importante função estrutural e funcional na membrana plasmática, e nas membranas das organelas, atua na síntese de ácidos biliares necessários à absorção de gordura e vitaminas lipossolúveis pelo intestino; participa da produção de hormônios esteróides e da vitamina E (LUDKE, LÓPEZ, 1999; LEANÇA *et al.*, 2010).

As bactérias não possuem colesterol na formação da sua membrana citoplasmática, nem ergosterol, derivado do colesterol, componente lipídico encontrado na membrana dos fungos, ambos sejam utilizado por serem substâncias complexa do tipo lipídio-esteróide (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006), podendo agir sobre o mosaico fluido da membrana bacteriana, modificando sua fluidez, sendo assim possível colacionar com a ação do colecalciferol na membrana plasmática bacteriana.

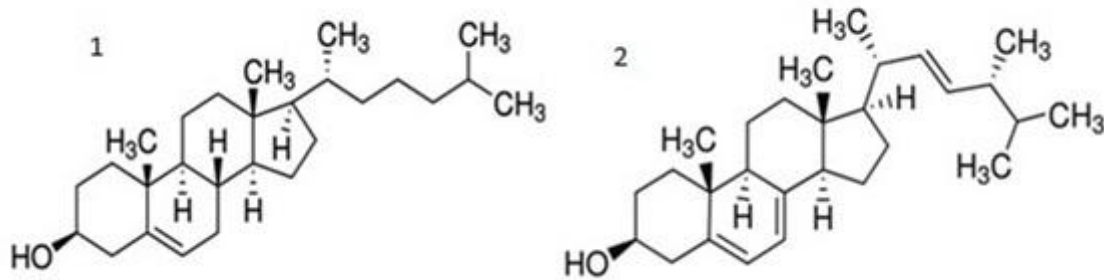


Figura 2: Estrutura molecular plana do 1. Colesterol e 2. Ergosterol.

As bactérias são organismos simples encontrados na maioria dos ambientes naturais, a célula bacteriana apresenta diversas estruturas. Uma estrutura essencial das bactérias é a membrana citoplasmática, que participa de inúmeras funções entre elas a duplicação do DNA, a secreção de enzimas, a biossíntese de componentes, o transporte de solutos e a produção de energia (SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005). A parede celular é uma estrutura que confere a muitas bactérias rigidez, e de acordo com a sua constituição as bactérias são divididas em duas classes: Gram-positivas e Gram-negativas, a diferença entre ambas é devida principalmente as suas propriedades de permeabilidade e aos componentes de superfície (TORTORA *et al.*, 2008; SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005).

Frente ao exposto o objetivo desse trabalho foi analisar o colecalciferol como agente modificador contra a multiresistência das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, utilizando o aumento progressivo da sua concentração subinibitória. Além de verificar a similaridade com o mecanismo de ação moduladora do colesterol e ergosterol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Bacteriano

As bactérias utilizadas no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram às linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, ATCC e *Klebsiella pneumonia* ATCC 4362. Para avaliar a atividade moduladora das soluções, foram utilizadas cepas bacterianas multiresistentes, a partir de isolados clínicos: *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27, com o perfil de resistência demonstrado na Tabela 01. Foram obtidas a partir da coleção de

microrganismos do Laboratório de Micologia – UFPB. Todas as cepas foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco laboratorises Ltda.). Antes do ensaio, as células foram cultivadas à 37° C por 24 h em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, difco Laboratories Ltda.).

## **Drogas**

### **Colecalciferol**

Fornecida pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob um concentração de 100 mg/mL, dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), diluída em água destilada para atingir a concentração de 1024 µg/mL.

### **Colesterol e Ergosterol**

Fornecidos pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob um concentração de 200 mg/mL, dissolvidos em 2 mL de DMSO/Tween 80, após diluída em água destilada até uma concentração de 1024 µg/mL.

### **Antibióticos**

As drogas utilizadas foram da classe dos aminoglicosídeos: amicacina, neomicina e gentamicina (Sigma Co., St. Louis, USA). As mesmas foram diluídas em água destilada, para concentração de 5000 µg/ml.

## **Teste antibacteriano (CIM) e atividade moduladora de antibióticos**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo o método de microdiluição em caldo. O CIM é definido como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realiza-lo o inóculo bacteriano foi diluído em BHI 10% para uma suspensão de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Em uma placa de microdiluição com 96 poços, foi distribuído 100 µL do inóculo em cada poço, em seguida uma diluição seriada foi realizada com 100 µL da solução de colecalciferol, do colesterol e ergosterol, com concentração de 1024 µg/mL. Tendo concentrações finais variando de 1024-8 µg/mL. As placas foram incubadas durante 24 h a 35° C. O MIC bacteriano foi determinado através da revelação com solução de resazurina, 20 µl em cada poço (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Para avaliar o potencial de colecalciferol, do colesterol e ergosterol como modificadores da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As soluções foram testadas em três concentrações subinibitória (CIM/8, CIM/4 e CIM/2). Em uma placa de microdiluição foi distribuído 100 µL de uma solução contendo BHI, inóculo



bacteriano e as soluções em cada poço, sendo posteriormente feita uma diluição com 100 µL das drogas antimicrobianas, as concentrações variaram de 5.000-2,44 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da atividade antibacteriana e potencialização de aminoglicosídeos pelo colecalciferol, frente a bactérias multiresistentes. Até então não se tinha nenhum registro da utilização do colecalciferol como modulador de antibióticos, concomitante com outras drogas.

O interesse por substâncias isoladas com propriedades antibacterianas tem aumentado, devido à falta de eficácia nos tratamentos terapêuticos de muitas das infecções existentes, decorrente do desenvolvimento da resistência bacteriana a antibióticos (KÖHLER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2003, TALEB-CONTINI *et al.*, 2003).

Nos testes da CIM realizados com as linhagens bacterianas padrões, a solução de colecalciferol não apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante, sendo todos os resultados  $\geq 1024$  µg/mL (Tabela 2).

Quando combinado com os antibióticos da classe de amiglicosídeo, foi verificado que o colecalciferol apresentou diminuição da concentração inibitória mínima, com resultados relevantes a partir do CIM/8 quando associado com amicacina e gentamicina reduzindo dois pontos para *Pseudomonas aeruginosa* 03, quando associado com neomicina não ocorreu sinergismo mais sim antagonismo diminuindo a eficácia do antibiótico (Tabela 3).

Quando a substância, utilizada na combinação, intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON, ONOFRE, 2010).

Com o aumento da concentração subinibitória o CIM/4 quando combinada com amicacina e gentamicina diminuindo três pontos para *P.aeruginosa* 03, também houve redução significativa para CIM de amicacina frente a *E. coli* 27. A associação com neomicina para *S. aureus* 358 e *P.aeruginosa* 03 demonstrou antagonismo (Tabela 3). No CIM/2 quando associada com amicacina demonstrou resultados relevantes para todas as cepas multiresistentes utilizadas, apresentando antagonismo quando o colecalciferol foi combinado com neomicina frente a *S. aureus* 358.

A composição de substâncias lipofílicas, como o colecalciferol admite perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana como: redução do potencial de membrana, perda de íons, citocromo C, proteínas e radicais, seguidos de colapso da bomba de prótons e redução de ATP (SIKKEMA *et al.*, 1994; TURINA *et al.*, 2006; HIRAYAMA *et al.*, 2006).

Ao analisar o efeito modificador da resistência bacteriana é notável que o colecalciferol apresentou melhor resultado frente a *P.aeruginosa* 03, efetuando a modulação nas três concentrações subinibitórias utilizadas. Um resultado muito positivo devido ao fato de *P.aeruginosa* ser Gram-negativa, segundo Sartori (2005), muitos microrganismos gram-negativos apresentam nível elevado de resistência intrínseca a muitos antibióticos, utilizando como barreira o sistema de efluxo ativo e sua baixa permeabilidade da membrana externa.

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são mais sensíveis a compostos menos polares, devido à presença de cadeias polissacarídeas na composição desses compostos que atuam como barreiras para substâncias hidrofóbicas ativas na membrana bacteriana (NICOLSON *et al.*, 1999). Isso sugere que o colecalciferol, devido ao seu caráter lipossolúvel atue através de uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, proporcionando um desequilíbrio no mosaico fluido da membrana bacteriana (NOSTRO *et al.*, 2004), modulando mais efetivamente *P.aeruginosa* 03, *E.coli* 27, quando comparado com *S. Aureus* 358. A permeabilização pode atingir membrana externas e internas, facilitando a entrada de antibióticos, além de provocar a lise celular e necrose (KNOWLES *et al.*, 2005; ARMSTRONG, 2006).

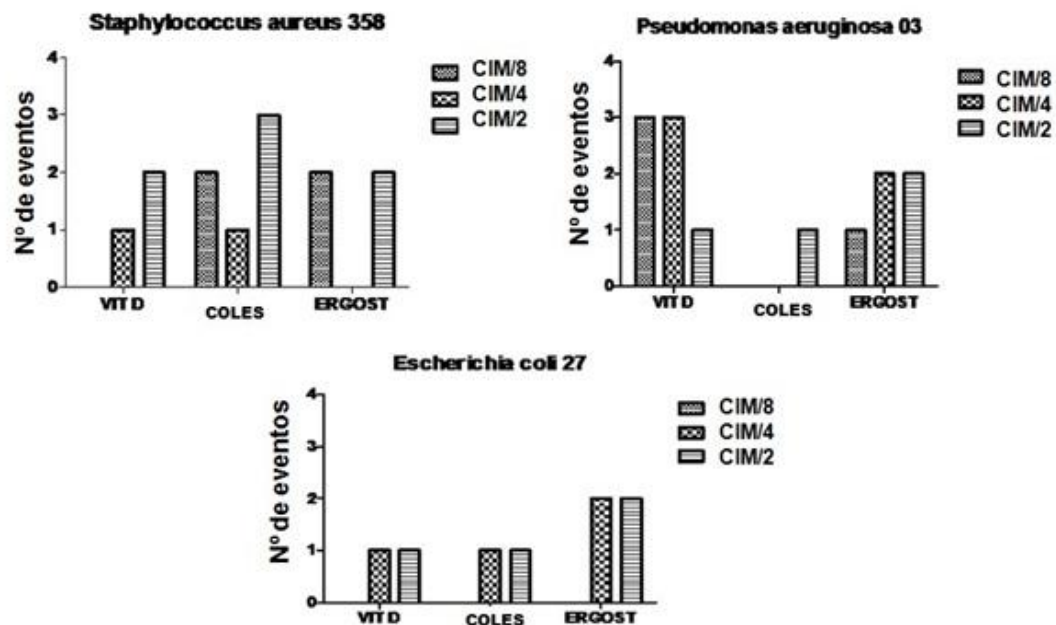
Mesmo sendo evidenciado um resultado efetivo entre as bactérias Gram-negativas, é observada uma diferença entre os eventos modulatórios de *P.aeruginosa* 03 e *E.coli* 27. O que pode ser atribuído a camada lipopolissacarídica (LPs). Lipopolissacarídeo é o componente estrutural da parede de bactérias Gram-negativas, sendo representado pela endotoxina, enzimas que em *E.coli* funcionam como um fator de virulência (CAMPEBELL *et al.*, 2007). *P.aeruginosa* sua presença é intrínseca, aumentando sua virulência e resistência, devido à adaptação fisiológica em respostas a mudanças do ambiente, principalmente com alterações na membrana externa da célula (KURAHASHI *et al.*, 1999; MIYAGI *et al.*, 2000; LINCOPAN, TRABULSI, 2004).

O colesterol e o ergosterol são componentes importantes das membranas biológicas de eucarióticos, ausentes na membrana das bactérias, responsáveis pela manutenção da permeabilidade das membranas. A célula pode controlar sua fluidez através da regulação do nível de colesterol, ou do grau de saturação das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolípidios

(FRÉZARD, SCHETTINI, 2005). Devido as suas estruturas lipofílicas, análoga a estrutura do colecalciferol, ambos foram utilizados como controle, para verificar e comparar o mecanismo de ação do colecalciferol na membrana bacteriana.

A solução de colesterol e ergosterol não apresentou atividade antimicrobiana com  $CIM \geq 1024 \mu\text{g/mL}$ . No entanto a combinação de ambos com os antibióticos, sobre as bactérias multiresistentes, reduziu a CIM significativamente, conforme a concentração subinibitória era aumentada (Tabela 4 e 5).

Não se tem registro da utilização de colesterol e ergosterol como modificadores da ação de antibióticos nem de qualquer outra droga, sendo esse o primeiro estudo realizado neste âmbito. Assim foi possível averiguar a similaridade do mecanismo de ação modulador entre o colesterol, ergosterol e colecalciferol através do número de eventos da atividade moduladora representado na Figura 3:



**Figura 3:** Comparação do numero de eventos modulador das concentrações subinibitórias CIM/8, cim/4,cim/2 entre as soluções de Colecalciferol, colesterol e ergosterol. \*MIC: Concentração Inibitória Mfínima, VIT D: Vitamina D. COLES: Colesterol. ERGOST: Ergosterol.

Foi possível observar que o colesterol e ergosterol demonstraram aumento no numero de eventos de modulação proporcional ao aumento da concentração subinibitória, assim como o colecalciferol. Entretanto o ergosterol se apresentou mais eficiente do que o colesterol, pois agiu sobre todas as cepas utilizadas, já o colesterol não teve ação significativa sobre a *P.aeruginosa* 03, modulando somente com a maior concentração subinibitória MIC/2.

## CONCLUSÃO

A atividade moduladora frente à aminoglicosídeos apresentada pelo colecalciferol indica a possibilidade de desenvolvimento de uma nova alternativa na terapêutica antibacteriana, contra bactérias multiresistentes a drogas, uma vez que, colecalciferol, vitamina D<sub>3</sub>, já faz parte do organismo humano não apresentando toxicidade ao mesmo.

## REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, J.S. **Mitochondria: a target for câncer therapy**. Br J Pharmacol., London, vol. 147, 239-248, 2006.
- BRAYTON, C. F. **Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review**. *Cornell veterinarian*, v. 76, p. 61-90, 1986.
- CANTON, M.; ONOFRE, S. B. **Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v 20(3): 348-354. 2010.
- CATÃO, R.M.R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C. LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *staphylococcus aureus* e *escherichia coli* multirresistentes**. RBAC, vol. 37(4): 247-249, 2005.
- COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine**. *Chemotherapy*, 54: 328-330, 2008.
- COUTINHO, H.D.M.; VASCONCELLOS, A.; LIMA, M.A.; ALMEIDA-FILHO G.G. ALVES, R.R.N. **Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855)**. BMC Complementary and Alternative Medicine, vol 9(35), 2009.

COUTINHO, H.D.M; COSTA J.G.M.; LIMA, Edeltrudes O.; FALCÃO-SILVA V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. **Increasing of the Aminoglycoside Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant E. coli by Turnera ulmifolia L. and Chlorpromazine.** Biological Research for Nursing, vol. 11(4) 332-335, 2010.

DANTAS, Andréa Tavares; DUARTE, Ângela Luzia Branco Pinto; MARQUES, Cláudia Diniz Lopes. **A vitamina D na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico.** Temas de Reumatologia Clínica, Vol. 10, Nº 2, p.52-59, 2009.

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

FRÉZARD, Frédéric; SCHETTINI, Dante A. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio.** Quim. Nova, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p. 263-277, 2004.

HIRAYAMA, Karin Brocanelli; SPERIDIÃO, Patrícia G. L.; FAGUNDES NETO, Ulysses. **Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.** The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases.v. 10 (3), 2006.

JAVADPOUR, MM; JUBAN, MM; LO, WC; BISHOP, SM; ALBERTY, JB; COWELL, SM; BECKER, CL; MCLAUGHLIN, ML. **De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity.** *J Med Chem*, 39: 3107–3113. 1996.

KLACK, Karin; CARVALHO, Jozélio Freire de. **Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina.** Rev Bras Reumatol, Vol. 46, n.6, p. 398-406, 2006.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. **Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus***

*aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Applied and Environmental Microbiology, Feb., p. 797–803, 2005.

KÖHLER T., Pechére J.-C., and Plésiat P. **Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance.** Cell. Assoc. Mol. Life Sci. **56**, 771-778, 1999.

LEANÇA, Camila Canteiro; PASSARELLI, Marisa; NAKANDAKARE, Edna R.; QUINTÃO, Eder C. R.. **HDL: the yin-yang of cardiovascular disease.** Arq Bras Endocrinol Metab. 54/9, 2010.

LEE, E.W.; CHEN J.; HUDA M.N.; KURODA T.; MIZUSHIMA T.; TSUCHIYA T. **Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*.** Biol. Pharm. Bull. 26, 266-270, 2003.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice; GROPOSO, Cláudia; DRESCHLER-SANTOS, Elisandro Ricardo; FIGUEIREDO, Nívea de F.; GODINHO, Péricles da S.; ABRÃO, Rosana Leon. **A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares.** Biotemas, 19 (2): 17-27, 2006.

LUDKE, Maria do Carmo Mohaupt Marques; LÓPEZ, Jorge. **Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 1, p.181-187, 1999.

MANGIA, Simone Henriques. **Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso de ribavirina e dimetil-sulfóxido (dmso).** 186f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2008.

MARQUES, Cláudia Diniz Lopes; DANTAS, Andréa Tavares; FRAGOSO, Thiago Sotero; DUARTE, Ângela Luzia Branco Pinto. **A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes.** Rev Bras Reumatol; Vol. 50(1): p.67-80, 2010.

MARTINEAU, AR; TIMMS, PM; BOTHAMLEY, GH; et al. **High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial.** The Lancet; Vol. 6736(10): 2011.

MURRAY, PR; ROSENTHAL, KS; KOBAYASHI, GS; PFALLER, MA. **Microbiologia Médica.** 4ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

MUSZKAT, Patricia; CAMARGO, Marilia Brasílio Rodrigues; GRIZ, Luiz Henrique Maciel; LAZARETTI-CASTRO, Marise. **Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D.** Arq Bras Endocrinol Metab. Vol. 54(2): p.110-7, 2010.

NCCLS (2008): *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*: ninth.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. **Potential of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes.** Fems microbiol. Lett, v. 179, p. 233–239, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol.** FEMS Microbiology Letters, v. 230, p. 191-195, 2004.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO J.P.; BURDMANN, E.A. **Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos.** Braz J Cardiovasc Surg, vol. 21(4): 444-452, 2006.

PIDDOC, Laura J. V. **Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance.** Nature Reviews Microbiology, v.4, 629-636, 2006.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Z. **Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae);** Naturforsch, v. 59c, p. 657- 662, 2004.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. **4. Biomembranas. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). A Célula 2001. Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56, 2001.**

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasilensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- universidade Vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. **Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

TALEB-CONTINI, S.H.; SALVADOR, M.J.; WATANABE, E.; ITO I.Y.; DIONÉIA, C.R.O. **Atividade antimicrobiana dos flavonóides e esteróides isolados de duas espécies de *Chromolaena***. *Rev Bras Ci Farm*; 30: 403-408, 2003.

THEVISSSEN, K.; KATHELIJNE, K. A.; FERKET, I.; FRANÇOIS, E. J. A.; CAMMUE, B. P. A. **Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components**. *Peptides*, 24 (11): 1705-1712, 2003.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. **Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning**. *Biophysical Chemistry*, v. 122, p. 101–113, 2006.

Tabela 1: Perfil de resistência das bactérias a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast,Ax,Ami,Amox,Ca,Cfc,Cf,Caz,Cip,Clo,Im,Can,Szt,Tet,Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa,Gen,Tob,Ami,Can,Neo,Para,But,Sis,Net
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ast-Aztreonan; Amx- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxicilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefador; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazididima; Cip-Ciprofloxacina; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Com-Cefepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Meropenem.



Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de colecalciferol, vitamina D<sub>3</sub> sobre cepas microbianas originárias da ATCC.

Bactérias	CIM (µg/mL)
	COLECALCIFEROL
<i>S. aureus</i>	≥1024
<i>P. aeruginosa</i>	≥1024
<i>K. pneumonia</i>	≥1024
<i>E. coli</i>	≥1024

Tabela 3: Atividade moduladora do colecalciferol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Colecalciferol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	39,0625	39,0625	39,0625	39,0625	*4,8828	*78,125
Gentamicina	9,7656	9,7556	9,7656	9,7656	4,8828	2,44
Neomicina	156,25	156,25	#2.500	#156,25	#1.250	#156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	*39,0625	*156,25	*39,0625	*312,5	*9,7656	*78,125
Gentamicina	*9,7656	*39,0625	*4,8828	*39,0625	39,0625	19,53125
Neomicina	#2.500	#78,125	#625	#78,125	156,25	78,125
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	78,125	78,125	*19,53125	*78,125	*4,8828	*78,125
Gentamicina	9,7656	9,7656	9,7656	9,7656	4,8828	9,7656
Neomicina	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	312,5

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

\* Sinergismo, # Antagonismo.

Tabela 4: Atividade moduladora do colesterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

<b>Colesterol</b>						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	78,125	39,0625	39,0625	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*39,0625	*156,25	*4,88	*78,125	*9,7656	*156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	156,25	156,25	39,0625	78,125
Gentamicina	19,53125	39,0625	39,0625	39,0625	*4,88	*19,53125
Neomicina	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*19,53125	*78,125	*39,0625	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,8828	4,88	9,7656
Neomicina	156,25	156,26	78,125	156,25	78,125	78,125

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 5: Atividade moduladora do ergosterol associada com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

<b>Ergosterol</b>						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	78,125	39,0625	9,7656	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*19,53125	*156,25	39,0625	78,125	78,125	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	*39,0625	*156,25	*19,53	*78,125
Gentamicina	*4,88	*39,0625	*9,7656	*39,0625	*4,88	*19,53
Neomicina	312,5	312,5	625	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*9,7656	*78,125	*9,7656	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,88	*2,44	*9,7656
Neomicina	156,25	156,25	*39,0625	*156,25	39,0625	78,125

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.

## 5.2 ANALISE *IN VITRO* DA MODULAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS POR ALFA-TOCOFEROL FRENTE A LINHAGENS BACTERIANAS MULTIRESISTENTES

### RESUMO

Alfa-tocoferol, vitamina lipossolúvel E, é uma das isoformas mais abundante, ativa biologicamente e um potente antioxidante. Encontrada naturalmente em alimentos de origem vegetal e animal. O seu caráter lipofílico pode admitir perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana, permitindo assim o aumento da permeabilidade. Este é o primeiro relato da atividade moduladora por alfa-tocoferol. Neste estudo foi avaliada, a solução de alfa-tocoferol contra linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multiresistentes. Além de verificar a similaridade com o mecanismo da ação moduladora do colesterol e ergosterol. Quando associado com aminoglicosídeos, no teste de microdiluição, alfa-tocoferol possivelmente atuou através de uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, modulando mais efetivamente *P.aeruginosa* e *E.coli*, quando comparado com *S. Aureus*.

**Palavras-chave:** Alfa-tocoferol, Aminoglicosídeos, Bactérias multiresistentes, Modulação, Permeabilidade, Resistência bacteriana, Vitamina Lipossolúvel.

## **Análise “*in vitro*” da modulação de aminoglicosídeos por alfa-tocoferol frente a linhagens bacterianas multiresistentes**

J.C. Andrade<sup>1</sup>, M.F.B. Morais Braga<sup>1</sup>, G.M.M.Guedes<sup>1</sup>, S.R. Tintino<sup>1</sup>, M.A. Freitas<sup>1</sup>, D.I.V. BRITO<sup>1</sup>, A.K.L.S. LAVOR<sup>1</sup>, I. R. A. Menezes<sup>2</sup>, H.D.M.Coutinho<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, <sup>2</sup> Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Autor Correspondente:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

### **INTRODUÇÃO**

Atualmente as infecções bacterianas são foco da saúde pública, devido principalmente a ocorrência do crescimento significativo da resistência bacteriana, sendo cada vez mais necessário o desenvolvimento de novas drogas e esquemas terapêuticos eficazes para o tratamento. (CATÃO *et al.*, 2005; PIDDOCK, 2006; COUTINHO *et al.*, 2008; DIAS, MONTEIRO, 2010).

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são as mais comuns, apresentando uma maior dificuldade no tratamento devido a sua resistência a vários antibióticos, responsável por causar diferentes tipos de intoxicações e uma variedade de infecções na pele e no subcutâneo, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia (LOWY, 1998; TORTORA *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, agredindo a pele, trato urinário, ouvidos e olhos, possui toxinas e enzimas na sua estrutura que propociona significativo aumento na sua virulência, tornando-a resistente a antibióticos (MURRAY *et al.*, 2004). *Escherichia coli* é a espécie mais comum do gênero *Escherichia*, associado a infecções graves do trato urinário, meningite e gastroenterite (MURRAY *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2008).

O fenômeno da resistência bacteriana se deu principalmente devido a utilização intensiva de antimicrobianos que exerceu uma pressão seletiva crescente, antecipando o desenvolvimento da adaptação e resistência as bactérias aos principais antibióticos, ocorrendo ainda uma transferência vertical e horizontalmente por vários mecanismos dessas novas características (DIAS, MONTEIRO, 2010).

Compostos lipossolúveis são citados como modificadores da permeabilidade da membrana plasmática em bactérias (PRETTO *et al.*, 2004; GIBBONS, 2004; NICOLSON *et al.*, 1999). Frente a isso, o caráter lipossolúvel do alfa-tocoferol pode demonstrar alteração na fluidez da membrana bacteriana, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antibióticos.

Alfa-tocoferol (Figura 1) é uma das isoformas mais abundante, biologicamente ativa e potente antioxidante, sendo também a isoforma mais explorada da vitamina lipossolúvel E (MÁRQUEZ *et al.*, 2002; CATANIA *et al.*, 2009). O interesse cada vez maior pela vitamina E é devido as suas atividades biológicas, especialmente como agente antioxidante, sendo capaz de retardar o envelhecimento e proteger o organismo de doenças crônicas não transmissíveis, como Parkinson, Alzheimer, quadros infecciosos e reumáticos, câncer e enfermidades cardiovasculares (BATISTA *et al.*, 2007; BERG, 2010; MÁRQUEZ *et al.*, 2002). Atualmente, é estudada a atuação da vitamina E como modulador da sinalização celular e da transcrição de genes (BATISTA *et al.*, 2007). Além de ser capaz de inibir o crescimento das células malignas (SAMPAIO, ALMEIDA, 2009).

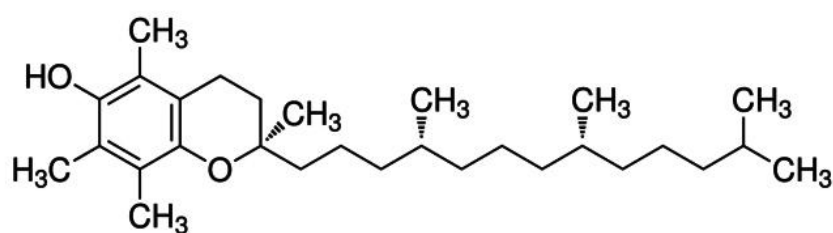


Figura 1: Estrutura molecular plana do Alfa-tocoferol.

A vitamina E ocorre naturalmente em alimentos de origem vegetal e animal, nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais, no germe de trigo, gema de ovo e fígado, respectivamente (BATISTA *et al.*, 2007).

O colesterol (Figura 2) é um componente lipídico, necessário para o funcionamento normal do corpo, desempenha uma importante função estrutural e funcional na membrana plasmática, e nas membranas das organelas, atua na síntese de ácidos biliares necessários à

absorção de gordura e vitaminas lipossolúveis pelo intestino; participa da produção de hormônios esteróides e da vitamina E (LUDKE, LÓPEZ, 1999; LEANÇA *et al.*, 2010).

As bactérias não possuem colesterol na formação da sua membrana citoplasmática, nem ergosterol (Figura 2), derivado do colesterol, componente lipídico encontrado na membrana dos fungos, ambos são utilizado por serem substâncias complexa do tipo lipídio-esteróide, (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006), podendo agir sobre o mosaico fluido da membrana bacteriana, modificando sua fluidez, sendo assim possível colacionar com a ação do colesterciferol na membrana plasmática bacteriana.

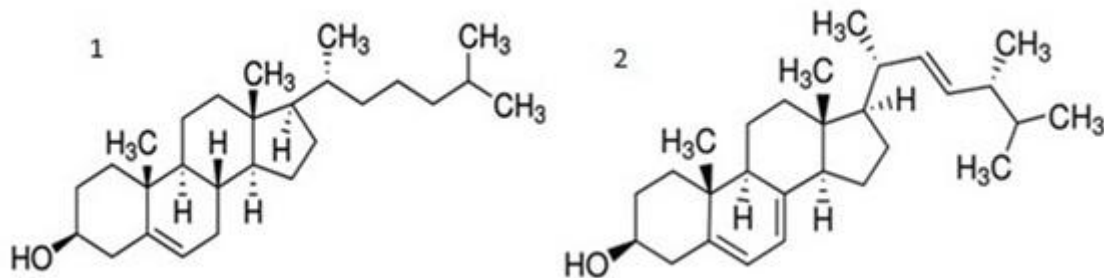


Figura 02: Estrutura molecular plana do Colesterol (1) e Ergosterol (2).

As bactérias são organismos simples encontrados na maioria dos ambientes naturais, a célula bacteriana apresenta diversas estruturas. Uma estrutura essencial da bactéria é a membrana citoplasmática, responsável por inúmeras funções entre elas a duplicação do DNA, a secreção de enzimas, a biossíntese de componentes, o transporte de solutos e a produção de energia (SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005). A parede celular é uma estrutura que confere a muitas bactérias rigidez, e de acordo com a sua constituição as bactérias são divididas em duas classes: gram-positivas e gram-negativas, a diferença entre ambas é devida principalmente as suas propriedades de permeabilidade e aos componentes de superfície (TORTORA *et al.*, 2008; SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005).

Este estudo foi realizado com o objetivo de analisar o efeito modificador do alfa-tocoferol combinado com aminoglicosídeos, contra a multiresistência das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, utilizando o aumento progressivo da sua concentração subinibitória. Além de verificar a similaridade com o mecanismo de ação modulador do colesterol e ergosterol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Bacteriano

As bactérias utilizadas no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram às linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, ATCC e *Klebsiella pneumonia* ATCC 4362. Para avaliar a atividade moduladora das soluções, foram utilizadas cepas bacterianas multiresistentes, a partir de isolados clínicos: *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27, com o perfil de resistência demonstrado na tabela 01. As bactérias foram obtidas a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia – UFPB. Todas as cepas foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco laboratorises Ltda.). Antes do ensaio, as células foram cultivadas à 37° C por 24 h em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, difco Laboratories Ltda.).

### Drugs

#### Alfa-tocoferol

Fornecida pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada na concentração de 100 mg/mL, dissolvidos em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO), diluída em água destilada para atingir a concentração de 1024 µg/mL.

#### Colesterol e Ergosterol

Fornecidos pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob um concentração de 200 mg/mL, dissolvidos em 2 mL de DMSO/Tween 80, após diluída em água destilada até uma concentração de 1024 µg/mL.

#### Antibióticos

As drogas utilizadas foram da classe dos aminoglicosídeos: amicacina, neomicina e gentamicina (Sigma Co., St. Louis, USA). As mesmas foram diluídas em água destilada, para concentração de 5000 µg/mL.

### Teste antibacteriano (CIM) e atividade moduladora de antibióticos

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo o método de microdiluição em caldo. O CIM é definido como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realiza-lo o inóculo bacteriano foi diluído em

BHI 10% para uma suspensão de  $10^5$  UFC/mL. Em uma placa de microdiluição com 96 poços, foi distribuído 100  $\mu$ L do inoculo em cada poço, em seguida uma diluição seriada foi realizada com 100  $\mu$ L da solução de alfa-tocoferol, do colesterol e ergosterol, com concentração de 1024  $\mu$ g/mL. Tendo concentrações finais variando de 1024-8  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas durante 24 h a 35° C. O MIC bacteriano foi determinado através da revelação com solução de resazurina, 20  $\mu$ L em cada poço (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Para avaliar o potencial do alfa-tocoferol, colesterol e ergosterol como modificadores da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As soluções foram testadas em três concentrações subinibitória (CIM/8, CIM/4 e CIM/2). Em uma placa de microdiluição foi distribuído 100  $\mu$ L de uma solução contendo BHI, inóculo bacteriano e as soluções em cada poço, sendo posteriormente realizada uma diluição com 100  $\mu$ L das drogas antimicrobianas. As concentrações variaram de 5.000-2,44  $\mu$ g/ml. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da atividade antibacteriana e potencialização de aminoglicosídeos pelo alfa-tocoferol, frente a bactérias multiresistentes. Até então não se tinha nenhum registro da utilização do alfa-tocoferol como modulador de antibióticos, concomitante com outras drogas.

É cada vez mais presente a busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana. Nas últimas décadas, entre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A solução de alfa-tocoferol no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizado com as linhagens bacterianas padrões, não apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante, sendo todos os resultados  $\geq 1024 \mu$ g/mL (Tabela 2).

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, podendo alterar a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (COSTA *et al.*, 2008).

Com a combinação do alfa-tocoferol com os antibióticos da classe de amiglicosídeo, foi observado uma diminuição da concentração inibitória mínima, com resultados relevantes a partir da CIM/8 para *S. aureus* 358, quando associado com gentamicina. Com *P. aeruginosa*



houve um aumento em 5 pontos no MIC da neomicina, caracterizando um efeito antagônico (Tabela 3).

Quando a substância, utilizada na combinação, intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON, ONOFRE, 2010).

Com o aumento da concentração subinibitória a CIM/4 quando combinada com gentamicina diminuindo dois pontos para *S. aureus* 358, também houve redução significativa para CIM de amicacina e neomicina frente a *P.aeruginosa* 03 e para neomicina frente a *E. coli* 27, com a redução de dois pontos de CIM para ambas. A solução de alfa-tocoferol associada com neomicina e gentamicina diminuiu a ação destes antibióticos frente a *S. aureus* 358 e *E. coli* 27 respectivamente (Tabela 3). Na CIM/2 foi observado resultado relevante em todas as cepas utilizadas, principalmente para *E. coli* 27, a solução de alfa-tocoferol modulou os três aminoglicosídeos utilizados, observando a redução de dois pontos da CIM para amicacina e gentamicina e quatro para neomicina.

As bactérias Gram-negativas, *E. coli* 27 e *P.aeruginosa* 03 possuem um maior teor lipídico na sua estrutura, o que pode explicar o resultado favorável apresentado na modulação, demonstrando uma maior afinidade pela solução de alfa-tocoferol (VARGAS *et al.*, 2004; SARTORI, 2005)

A composição de substâncias lipofílica, como o alfa-tocoferol admite perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana como: redução do potencial de membrana, perda de íons, citocromo C, proteínas e radicais, seguidos de colapso da bomba de prótons e redução de ATP (SIKKEMA *et al.*, 1994; TURINA *et al.*, 2006; HIRAYAMA *et al.*, 2006).

Além do alfa-tocoferol poder interagir com a dupla camada lipídica da membrana celular e afetar a cadeia respiratória e a produção de energia das bactérias (NICOLSON *et al.*, 1999), ou até mesmo tornar a célula mais permeável aos antibióticos, levando à interrupção da atividade celular vital, e realizando interferência com os sistemas de enzimas de bactérias também pode ser um potencial mecanismo de ação (KÖHLER *et al.*, 1999; BURT, 2004).

O efeito modulador da resistência bacteriana do alfa-tocoferol aumentou conforme o aumento da concentração subinibitória, apresentando resultados mais relevantes a parti da CIM/4. O que significa que a quantidade maior de alfa-tocoferol é capaz de atuar através de uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, proporcionando um desequilíbrio no mosaico fluido da membrana bacteriana (NOSTRO *et al.*, 2004), modulando mais efetivamente. A

permeabilização pode atingir membranas externas e internas, facilitando a entrada de antibióticos, além de provocar a lise celular e necrose (KNOWLES *et al.*, 2005; ARMSTRONG, 2006).

O colesterol e o ergosterol são componentes importantes das membranas biológicas de eucarióticos, ausentes na membrana das bactérias, responsável pela manutenção da permeabilidade das membranas. A célula pode controlar sua fluidez através da regulação do nível de colesterol, ou do grau de saturação das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolípidios (FRÉZARD, SCHETTINI, 2005). Devido as suas estruturas lipofílicas, análoga a estrutura do colesterciferol, ambos foram utilizados como controle, para verificar e comparar o mecanismo de ação do alfa-tocoferol na membrana bacteriana.

A solução de colesterol e ergosterol não apresentou atividade antimicrobiana com  $CIM \geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , o que já era previsto. No entanto a combinação de ambos com os antibióticos, sobre as bactérias multiresistentes, reduziu a CIM significativamente, conforme a concentração subinibitória era aumentada (Tabela 4 e 5). Assim foi possível averiguar a similaridade do mecanismo de ação modulador entre o colesterol, ergosterol e alfa-tocoferol, representado na Figura 3.

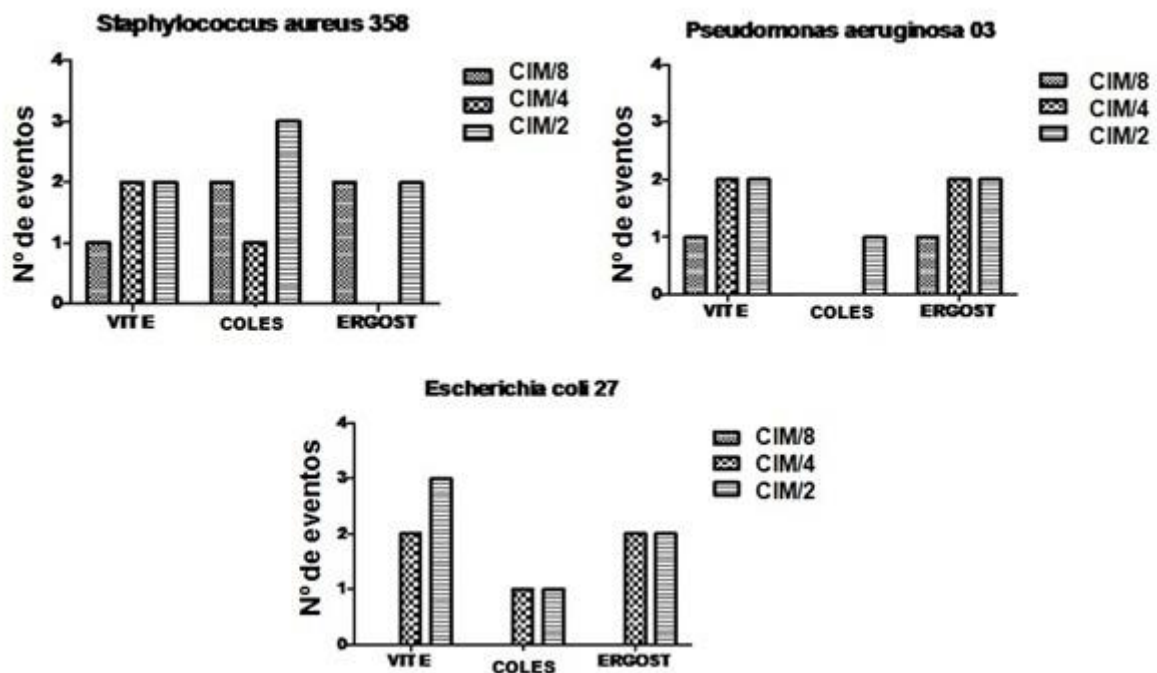


Figura 3: Comparação do numero de eventos modulador das concentrações subinibitórias MIC/8, MIC/4, MIC/2 entre as soluções de Alfa-tocoferol, colesterol e ergosterol.

\*MIC: Concentração Inibitória Mínima. VIT E: Vitamina E. COLES: Colesterol. ERGOST: Ergosterol.

O número de eventos modulatórios do colesterol e ergosterol é proporcional ao aumento da concentração subinibitória, porém entre ambos, o ergosterol se mostrou mais próximo da ação moduladora da solução de alfa-tocoferol, agindo sobre todas as cepas utilizadas, já o colesterol não teve ação significativa sobre a *P.aeruginosa* 03, modulando somente com a maior concentração subinibitória MIC/2.

Não se tem registro da utilização de colesterol e ergosterol como modificadores da ação de antibióticos nem de qualquer outra droga, sendo esse o primeiro estudo realizado neste âmbito

## CONCLUSÃO

A solução de alfa-tocoferol apresenta atividade moduladora “*in vitro*” frente à aminoglicosídeos. Apresentando resultados clinicamente relevantes, principalmente para bactérias gram-negativas, as quais apresentam maior nível de resistência. Representando uma nova alternativa na busca contra a resistência bacteriana. Sobretudo alfa-tocoferol é a isoforma mais abundante da vitamina E, além de se encontra presente na alimentação, não apresentando fonte de toxicidade ao organismo humano.

## REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, J.S. **Mitochondria: a target for cancer therapy**. Br J Pharmacol., London, vol. 147, 239-248, 2006.

BATISTA, E.S.; COSTA, A.G.V.; PINHEIRO-SANT’ANA H.M. **Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana**. Rev. Nutr., Vol. 20(5): p.525-535, 2007.

BERG, G.A. **Vitamina E: un tema siempre presente, nunca concluído**. Revista Argentina de Cardiología. Vol 78 nº 5, 2010.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review**. International Journal Food Microbiology, v. 94, p. 223-253, 2004.

CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R.G. **Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas.** Arq Bras Endocrinol Metab. Vol. 53(5): p.550-9, 2009.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. **Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v 20(3):: 348-354. 2010.

CATÃO, R.M.R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C. LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *staphylococcus aureus* e *escherichia coli* multirresistentes.** RBAC, vol. 37(4): 247-249, 2005.

COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine.** *Chemotherapy*, 54: 328-330, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; VASCONCELLOS, A.; LIMA, M.A.; ALMEIDA-FILHO G.G. ALVES, R.R.N. **Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855).** BMC Complementary and Alternative Medicine, vol 9(35), 2009.

COUTINHO, H.D.M; COSTA J.G.M.; LIMA, Edeltrudes O.; FALCÃO-SILVA V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. **Increasing of the Aminoglicosyde Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine.** Biological Research for Nursing, vol. 11(4) 332-335, 2010.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S. **Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.18(2): p.245-248, Abr./Jun. 2008.

Dias, M.; Monteiro, M.S. Antibióticos e Resistência Bacteriana, Velhas Questões, Novos Desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: CLÍNICA, INVESTIGAÇÃO E INOVAÇÃO**. Dez. 2010. 12p.

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

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio**. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p. 263-277, 2004.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. **Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa**. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*.v. 10 (3), 2006.

JAVADPOUR, MM; JUBAN, MM; LO, WC; BISHOP, SM; ALBERTY, JB; COWELL, SM; BECKER, CL; MCLAUGHLIN, ML. **De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity**. *J Med Chem*, 39: 3107–3113. 1996.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. **Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium**. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb., p. 797–803, 2005.

KÖHLER T., PECHÉRE J.-C., PLÉSIAT P. **Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance**. *Cell. Assoc. Mol. Life Sci.* **56**, 771-778, 1999.

LEANÇA, C.C.; PASSARELLI, M.; NAKANDAKARE, E.R.; QUINTÃO, E.C.R. **HDL: the yin-yang of cardiovascular disease**. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 54/9, 2010.

LEE, E.W.; CHEN J.; HUDA M.N.; KURODA T.; MIZUSHIMA T.; TSUCHIYA T. **Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*.** Biol. Pharm. Bull. 26, 266-270, 2003.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E.R.; FIGUEIREDO, N.F.; GODINHO, P.S.; ABRÃO, R.L. **A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares.** Biotemas, 19 (2): 17-27, 2006.

LOWY, F.D. ***Staphylococcus aureus* infections.** New England Journal of Medicine, v. 339, p. 520-32, 1998.

LUDKE, M.C.M.M.; LÓPEZ, J. **Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 1, p.181-187, 1999.

MÁRQUEZ, M.; YÉPEZ C.E.; SÚTIL-NARANJO R.; RINCÓN M. **Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A.** Invest. Clín, Vol. 43, n.3, Maracaibo, 2002.

MURRAY, PR; ROSENTHAL, KS; KOBAYASHI, GS; PFALLER, MA. **Microbiologia Médica.** 4ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 5ª ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n. 2, 2000b.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. **Potential of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes.** Fems microbiol. Lett, v. 179, p. 233–239, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol.** FEMS Microbiology Letters, v. 230, p. 191-195, 2004.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v 16(1):: 77-82. 2006.

PIDDOC, L.J.V. **Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance.** Nature Reviews Microbiology, v10.4, 629-636, 2006.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Z. **Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae);** Naturforsch, v. 59c, p. 657- 662, 2004.

SAMPAIO L.C.; ALMEIDA, C.F. **Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Câncer do Colo Uterino.** Revista Brasileira de Cancerologia. Vol. 55(3): p.289-296, 2009.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. **4. Biomembranas. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). A Célula 2001. Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56, 2001.**

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasilensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae).** 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- universidade Vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas.** 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. **Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes.** Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

THEVISSSEN, K.; KATHELIJNE, K. A.; FERKET, I.; FRANÇOIS, E. J. A.; CAMMUE, B. P. A. **Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components.** Peptides, 24 (11): 1705-1712, 2003.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. **Microbiologia**, 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. **Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning**. Biophysical Chemistry, v. 122, p. 101–113, 2006.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R.. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis**. Ciênica Rural, v. 34, n.1, p. 159-163, 2004.

Tabela 01: Perfil de resistência das bactérias a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast,Ax,Ami,Amox,Ca,Cfc,Cf, Caz,Cip,Clo,Im,Can,Szt,Tet,Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa,Gen,Tob,Ami,Can,Neo,Para, But,Sis,Net
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ast-Aztreonan; Amx- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxicilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacina; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Com-Cfepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Meropenem.

Tabela 02: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do alfa-tocoferol, vitamina E sobre cepas microbianas originárias da ATCC.

Bactérias	CIM (µg/mL)
	(+)-α-TOCOFEROL
<i>S. aureus</i>	≥1024
<i>P. aeruginosa</i>	≥1024
<i>K. pneumonia</i>	≥1024
<i>E. coli</i>	≥1024



Tabela 03: Atividade moduladora do alfa-tocoferol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

(+) - $\alpha$ -TOCOFEROL						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	MIC combinado/8	Controle	MIC combinado/4	Controle	MIC combinado/2	Controle
Amicacina	156,25	156,25	39,0625	39,0625	*4,8828	*78,125
Gentamicina	*19,53	*312,5	*2,44	89,7656	2,44	2,44
Neomicina	156,25	156,25	#2.500	#156,25	*9,7656	*156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	312,5	312,5	*78,125	*312,5	39,0625	78,125
Gentamicina	1.250	1.250	39,0625	39,0625	*4,8828	*19,53125
Neomicina	#2.500	#78,125	*19,53125	*78,25	*2,44	*78,125
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	312,5	312,5	39,0625	39,0625	*9,7656	*78,125
Gentamicina	625	625	#19,53125	#4,8828	*2,44	*9,7656
Neomocina	312,5	312,5	*78,25	*312,5	*19,53125	*312,5

MIC: Concentração Inibitória Mínima.

\* Sinergismo, # Antagonismo.

Tabela 04: Atividade moduladora do colesterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Colesterol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	78,125	39,0625	39,0625	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*39,0625	*156,25	*4,88	*78,125	*9,7656	*156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	156,25	156,25	39,0625	78,125
Gentamicina	19,53125	39,0625	39,0625	39,0625	*4,88	*19,53125
Neomicina	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*19,53125	*78,125	*39,0625	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,8828	4,88	9,7656
Neomicina	156,25	156,26	78,125	156,25	78,125	78,125

\*MIC: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 05: Atividade moduladora do ergosterol associada com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Ergosterol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	78,125	39,0625	9,7656	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*19,53125	*156,25	39,0625	78,125	78,125	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	*39,0625	*156,25	*19,53	*78,125
Gentamicina	*4,88	*39,0625	*9,7656	*39,0625	*4,88	*19,53
Neomicina	312,5	312,5	625	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*9,7656	*78,125	*9,7656	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,88	*2,44	*9,7656
Neomicina	156,25	156,25	*39,0625	*156,25	39,0625	78,125

MIC: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DE MENADIONA SOBRE CEPAS BACTERIANAS MULTIRESISTENTES

#### RESUMO

Menadiona, vitamina K<sub>3</sub>, pertence à classe das vitaminas lipossolúveis, encontrada em alimentos funcionais, necessária principalmente para o mecanismo da coagulação sanguínea. A composição de substâncias lipofílica, assim como a menadiona admite perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana, permitindo assim o aumento da permeabilidade. Com base nisso o objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade moduladora da menadiona sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multiresistentes, com o aumento progressivo da sua concentração subinibitória. Além de verificar a similaridade com o mecanismo da ação moduladora do colesterol e ergosterol. A atividade antibacteriana e modulatória foi determinada por microdiluição em caldo. As soluções de menadiona, do colesterol e ergosterol mostraram atividade moduladora com significado clinicamente relevante, caracterizando como modificadores da resistência bacteriana, visto que reduziram a CIM dos antibióticos testados. Este é o primeiro relato da atividade antibacteriana e potencialização de aminoglicosídeos pela menadiona, frente a bactérias multiresistentes.

**Palavras-chave:** Lipossolubilidade, Menadiona, Microdiluição, Modulação, Permeabilidade.

## **Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora de menadiona sobre cepas bacterianas multiresistentes**

J.C. Andrade<sup>1</sup>, M.F.B. Morais Braga<sup>1</sup>, G.M.M.Guedes<sup>1</sup>, S.R. Tintino<sup>1</sup>, M.A. Freitas<sup>1</sup>, D.I.V. BRITO<sup>1</sup>, A.K.L.S. LAVOR<sup>1</sup>, I. R. A. Menezes<sup>2</sup>, H.D.M.Coutinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, <sup>2</sup> Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Autor Correspondente:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

### **INTRODUÇÃO**

Menadiona, vitamina K<sub>3</sub>, pertence à classe das vitaminas lipossolúveis, é um composto sintético, convertido no intestino em vitamina K<sub>2</sub> (KLACK, CARVALHO, 2006). As vitaminas lipossolúveis são substâncias orgânicas presentes em pequena quantidade nos alimentos, são indispensáveis ao funcionamento do organismo na forma de co-fatores (PAIXÃO, STAMFORD, 2004). A vitamina K (Figura 01) é uma substância biologicamente ativa, encontrada em alimentos funcionais, necessária principalmente para o mecanismo da coagulação sanguínea, sendo essencial para a síntese da protrombina, além de participar da síntese de proteínas presentes no plasma e rins. Estudos mostraram efeitos inibitórios do crescimento de várias células neoplásicas, provocados pela vitamina K<sub>2</sub> e redução do risco de eventos mutagênicos na fase de proliferação celular rápida em fetos e recém-nascidos (KLACK, CARVALHO, 2006).

Compostos lipossolúveis modificam a permeabilidade da membrana plasmática nas bactérias (PRETTO *et al.*, 2004; GIBBONS, 2004; NICOLSON *et al.*, 1999). Frente a isso, o caráter lipossolúvel da menadiona pode demonstrar alteração na fluidez da membrana bacteriana, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antibióticos.

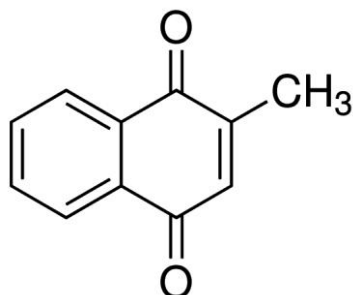


Figura 1: Estrutura molecular plana da Menadiona.

O colesterol é um componente lipídico, necessário para o funcionamento normal do corpo, desempenha uma importante função estrutural e funcional na membrana plasmática, assim como nas membranas das organelas internas da célula, atua na síntese de ácidos biliares necessários à absorção de gordura e vitaminas lipossolúveis pelo intestino; participa da produção de hormônios esteróides e da vitamina E (LUDKE, LÓPEZ, 1999; LEANÇA *et al.*, 2010).

As bactérias não possuem colesterol (Figura 2) na formação da sua membrana citoplasmática, nem ergosterol, derivado do colesterol, componente lipídico encontrado na membrana dos fungos, ambos são utilizados por serem substâncias complexas do tipo lipídio-esteróide (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006), podendo agir sobre o mosaico fluido da membrana bacteriana, modificando sua fluidez, sendo assim possível verificar a existência da similaridade da ação da menadiona na membrana plasmática bacteriana com a ação do colesterol.

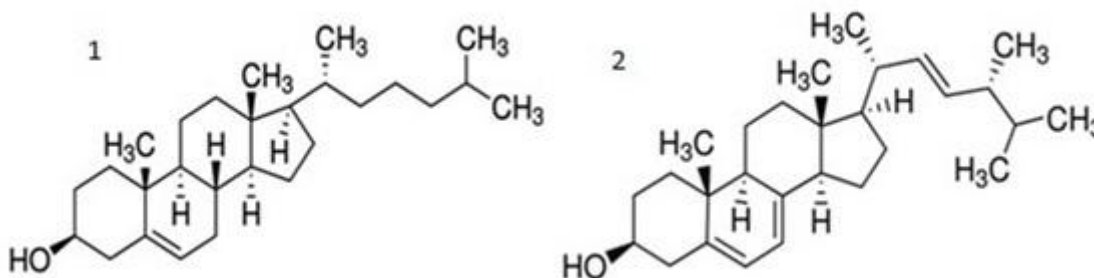


Figura 2: Estrutura molecular plana do 1.Colesterol e 2.Ergosterol

Bactérias são organismos simples encontrados na maioria dos ambientes naturais, a célula bacteriana apresenta diversas estruturas, algumas presentes só em determinadas espécies. Uma estrutura essencial da bactéria é a membrana citoplasmática, responsável por inúmeras funções entre elas a duplicação do DNA, a secreção de enzimas, a biossíntese de

componentes, o transporte de solutos e a produção de energia (SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005). A parede celular é uma estrutura que confere a muitas bactérias rigidez, e de acordo com a sua constituição as bactérias são divididas em duas classes: gram-positivas e gram-negativas, a diferença entre ambas é devida principalmente as suas propriedades de permeabilidade e aos componentes de superfície (TORTORA *et al.*, 2008; SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005).

Atualmente as infecções bacterianas são foco da saúde pública, devido principalmente a ocorrência do crescimento significativo da resistência bacteriana. As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são as mais comuns, apresentando uma maior dificuldade no tratamento devido a sua resistência a vários antibióticos (TORTORA *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, agredindo a pele, trato urinário, ouvidos e olhos (MURRAY *et al.*, 2004). *Escherichia coli* é a espécie mais comum do gênero *Escherichia*, associado a infecções graves do trato urinário, meningite e gastroenterite (MURRAY *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2008).

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade moduladora da menadiona sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multiresistentes, com o aumento progressivo da sua concentração subinibitória. Além de verificar a similaridade com o mecanismo de ação moduladora do colesterol e ergosterol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Bacteriano

As bactérias utilizadas no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram às linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, ATCC e *Klebsiella pneumonia* ATCC 4362. Para avaliar a atividade moduladora das soluções, foram utilizadas cepas bacterianas multiresistentes, a partir de isolados clínicos: *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27, com o perfil de resistência demonstrado na Tabela 1. As bactérias foram obtidas a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia – UFPB. Todas as cepas foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco laboratorises Ltda.). Antes do ensaio, as células foram cultivadas à 37°C por 24h em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, difco Laboratories Ltda.).

## **Drogas**

### **Menadiona**

Fornecida através da SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob uma concentração de 100mg/ml, dissolvidos em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO), novamente diluída em DMSO para atingir a concentração de 1024µg/ml. Sendo obtido o controle com DMSO para verificar possível interferência nos resultados.

### **Colesterol e Ergosterol**

Foram fornecidos através da SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada na concentração de 200 mg/ml, dissolvidos em 2 ml de DMSO/Tween 80, depois foi diluída em água destilada até uma concentração de 1024 µg/ml.

### **Antibióticos**

As drogas utilizadas foram da classe dos aminoglicosídeos: amicacina, neomicina e gentamicina (Sigma Co., St. Louis, USA). As mesmas foram diluídas em água destilada, para uma concentração de 5000 µg/ml.

## **Teste antibacteriano (CIM) e atividade moduladora de antibióticos**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. O MIC é definido como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realizá-lo o inóculo bacteriano foi diluído em BHI 10% para uma suspensão de  $10^5$  UFC/ml. Em uma placa de microdiluição com 96 poços, foi distribuído 100µL do inóculo em cada poço, em seguida uma diluição seriada foi realizada com 100µL da solução de menadiona, do colesterol e ergosterol, além do DMSO (controle negativo) com uma concentração de 1024µg/ml. Concentrações finais variando de 1024-8µg/ml. As placas foram incubadas durante 24h a 35°C. A CIM bacteriana foi determinada através da revelação com solução de resazurina, 20µl em cada poço (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Para avaliar o potencial da menadiona, do colesterol e ergosterol como modificadores da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As soluções foram testadas em três concentrações subinibitória (CIM/8, CIM/4 e CIM/2). Em uma placa de microdiluição foi distribuído 100µL de uma solução contendo BHI, inóculo bacteriano e as soluções em cada poço, sendo posteriormente feita uma diluição com 100 µL das drogas antimicrobianas, as concentrações variaram de 5.000-2,44 µg/ml. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da atividade antibacteriana e potencialização de aminoglicosídeos pela menadiona, frente a bactérias multiresistentes. Até então não se tinha nenhum registro da utilização da menadiona como modulador de antibióticos, concomitante com outras drogas.

Considerando a evolução dos genes de resistência bacteriana a antibióticos, que são responsáveis pela falta de eficácia nos tratamentos terapêuticos de muitas das infecções existentes. A indústria farmacêutica tem tido, nos últimos anos, um interesse maior por substâncias isoladas que possuam propriedades farmacológicas antimicrobianas (KÖHLER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2003, TALEB-CONTINI *et al.*, 2003).

A solução de menadiona demonstrou atividade antibacteriana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, apresentando concentração inibitória mínima de 64µg/mL, o DMSO, utilizado como controle negativo, apresentou uma CIM bem inferior de 256µg/mL frente à cepa testada. A solução de Menadiona não apresentou atividade antibacteriana relevante frente às outras cepas microbianas analisadas, tendo o mesmo valor da CIM do controle do DMSO (Tabela 02). O dimetilsulfóxido é versátil, possui diversas propriedades farmacológicas, dentre estas a antimicrobiana, apresentando “*In vitro*” em concentrações de 5-50%, atividade bacteriostática ou bactericida contra várias bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus* spp., *E. coli.*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. (BRAYTON, 1986; STONE, 1993; MANGIA *et al.*, 2008).

A composição de substâncias lipofílica, assim como menadiona admite perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana como: redução do potencial de membrana, perda de íons, citocromo C, proteínas e radicais, seguidos de colapso da bomba de prótons e redução de ATP (SIKKEMA *et al.*, 1994; TURINA *et al.*, 2006; HIRAYAMA *et al.*, 2006). A permeabilização pode atingir membranas externas e internas, facilitando a entrada de antibióticos, além de provocar a lise celular e necrose (KNOWLES *et al.*, 2005; ARMSTRONG, 2006).

Quando combinado com os antibióticos da classe de amiglicosídeo, foi verificado que a menadiona apresentou diminuição da concentração inibitória mínima conforme o aumento da concentração subinibitória CIM/8, CIM/4 e CIM/2, indicando uma relação de sinergismo (Tabela 3).



Na constatação do potencial modulador da menadiona com concentração subinibitória CIM/8 não foi verificado resultados com relevância clínica frente a nenhuma cepa utilizada. Com concentração subinibitória CIM/4 houve interação sinérgica significativa para *S. aureus* 358 com amicacina e neomicina e *E. Coli* 27 frente a todos os aminoglicosídeos. A concentração subinibitória CIM/2 modulou amicacina frente a *S. aureus* 358, e amicacina e neomicina para *P. Aeruginosa* 03.

Sobretudo é notável que a menadiona agiu de maneira significativa sobre as cepas *S. aureus* 358, e principalmente *E. Coli* 27, ambos são microrganismos com morfologia diferentes. *S. aureus* bactérias gram-positivas possui parede celular espessa e rígida, formada por camadas de peptidoglicana. As paredes celulares de Gram-negativas, como *E. Coli* contêm somente uma camada fina de peptidoglicana (TORTORA *et al.*, 2008), isso sugere que a menadiona, devido ao seu caráter lipossolúvel atue através de uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, proporcionando um desequilíbrio no mosaico fluido da membrana (NOSTRO *et al.*, 2004), modulando mais efetivamente *E.coli* quando comparado com *S. aureus*.. Segundo Nicolson *et al.*, (1999) bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são mais sensíveis a menos polares, devido a presença de cadeias polissacarídeas na composição desses compostos que atuam como barreiras para substâncias hidrofóbicas ativas na membrana bacteriana.

O colesterol e o ergosterol são componentes importantes das membranas biológicas de eucarióticos, ausentes na membrana das bactérias, responsável pela manutenção da permeabilidade das membranas. A célula pode controlar sua fluidez através da regulação do nível de colesterol, ou do grau de saturação das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios (FRÉZARD, SCHETTINI, 2005). Devido as suas estruturas lipofílicas, análoga a estrutura da menadiona, ambos foram utilizados como controle, para verificar e comparar o mecanismo de ação da menadiona na membrana bacteriana.

A solução de colesterol e ergosterol não apresentou atividade antimicrobiana com CIM  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ , o que já era previsto. No entanto a combinação de ambos com os antibióticos, sobre as bactérias multiresistentes, reduziu a CIM significativamente, conforme a concentração subinibitória era aumentada (Tabela 4 e 5). Não se tem registro da utilização de colesterol e ergosterol como modificadores da ação de antibióticos nem de qualquer outra droga, sendo esse o primeiro estudo realizado neste âmbito.

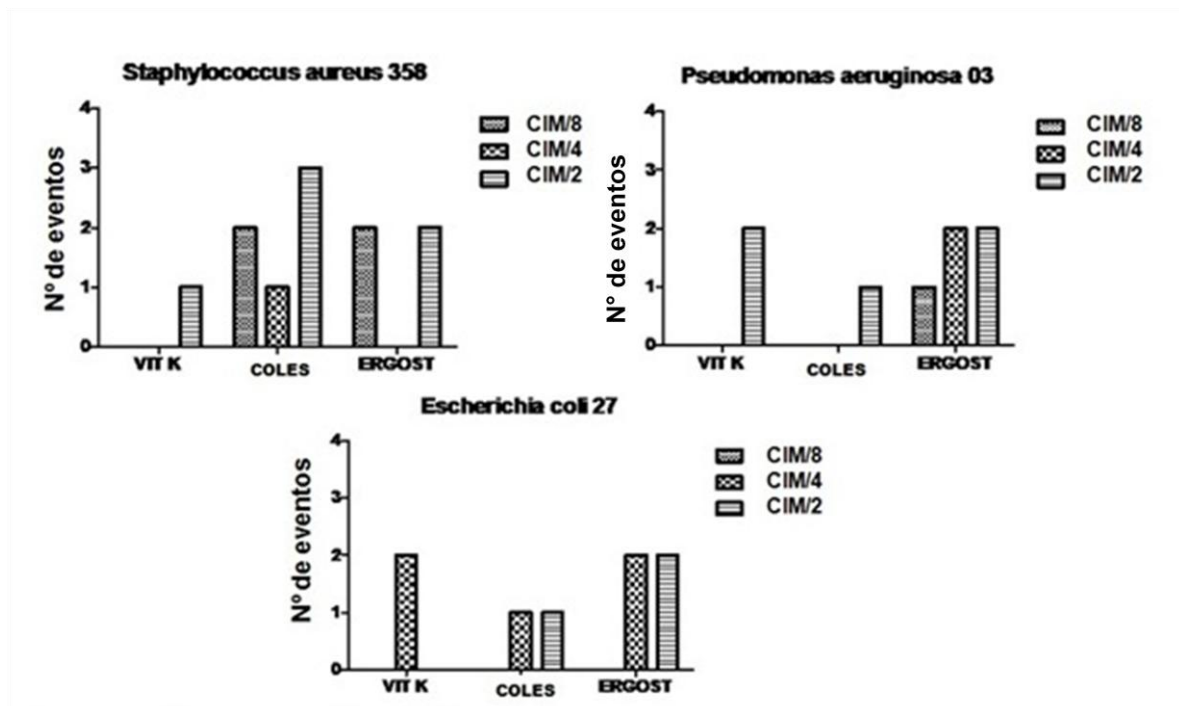


Figura 3: Comparação do numero de eventos modulador das concentrações subinibitórias MIC/8, MIC/4, MIC/2 entre as soluções de Menadiona, colesterol e ergosterol. \*MIC: Concentração Inibitória Mínima, VIT K: Vitamina K, COLES: Colesterol, ERGOST: Ergosterol.

Assim foi possível averiguar a similaridade do mecanismo de ação moduladora entre o colesterol, ergosterol e menadiona. Porém entre ambos, o ergosterol se mostrou mais próximo do mecanismo de ação moduladora da solução de menadiona, atuando sobre todas as cepas utilizadas, já o colesterol não teve ação significativa sobre a *P.aeruginosa* 03, modulando somente com a maior concentração subinibitória MIC/2

## CONCLUSÃO

A solução de menadiona demonstrou resultados clinicamente relevantes, à modulação de aminoglicosídeos, sobre bactérias multiresistentes. O que representa uma alternativa interessante contra a crescente resistência bacteriana, uma vez que menadiona, vitamina K, estar presente na alimentação, e não apresenta toxicidade ao organismo humano. Sobretudo, estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para verificar a biodisponibilidade e os mecanismos de ação envolvidos nessa interação.

## REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, J.S. **Mitochondria: a target for câncer therapy.** Br J Pharmacol., London, vol. 147, 239-248, 2006.

BRAYTON, C. F. **Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review.** *Cornell veterinarian*, v. 76, p. 61-90, 1986.

COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine.** *Chemotherapy*, 54: 328-330, 2008.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio.** *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p. 263-277, 2004.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. **Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.** *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*.v. 10 (3), 2006.

JAVADPOUR, MM; JUBAN, MM; LO, WC; BISHOP, SM; ALBERTY, JB; COWELL, SM; BECKER, CL; MCLAUGHLIN, ML. **De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity.** *J Med Chem*, 39: 3107–3113. 1996.

KLACK, K.; CARVALHO, J.F. **Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina.** *Rev Bras Reumatol*, Vol. 46, n.6, p. 398-406, 2006.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. **Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.** *Applied and Environmental Microbiology*, Feb., p. 797–803, 2005.

KÖHLER T., PECHÉRE J.-C., PLÉSIAT P. **Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance.** Cell. Assoc. Mol. Life Sci. **56**, 771-778, 1999.

LEANÇA, C.C.; PASSARELLI, M.; NAKANDAKARE, E.R.; QUINTÃO, E.C. R. **HDL: the yin-yang of cardiovascular disease.** Arq Bras Endocrinol Metab. 54/9, 2010.

LEE E.-W., CHEN J., HUDA M. N., KURODA T., MIZUSHIMA T., AND TSUCHIYA T. **Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*.** Biol. Pharm. Bull. 26, 266-270, 2003.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E.R.; FIGUEIREDO, N.F.; GODINHO, P.S.; ABRÃO, R.L. **A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares.** Biotemas, 19 (2): 17-27, 2006.

LUDKE, M.C.M.M.; LÓPEZ, J. **Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 1, p.181-187, 1999.

MANGIA, S.H. **Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso de ribavirina e dimetil-sulfóxido (dmsO).** 186f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2008.

NCCLS (2008): *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*: ninth.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. **Potential of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes.** Fems microbiol. Lett, v. 179, p. 233–239, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol.** FEMS Microbiology Letters, v. 230, p. 191-195, 2004.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, Tânia L. M. **Vitaminas lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica.** Quim. Nova, Vol. 27, No. 1, p.96-105, 2004.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Z. **Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae);** Naturforsch, v. 59c, p. 657- 662, 2004.

MURRAY, PR; ROSENTHAL, KS; KOBAYASHI, GS; PFALLER, MA. **Microbiologia Médica.** 4ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. **4. Biomembranas. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). A Célula 2001.** Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56, 2001.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas.** 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. **Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes.** Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

STONE, R.W. **Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide.** Canine Pract. v.18, p.16-19, 1993.

TALEB-CONTINI, S.H.; SALVADOR, M.J.; WATANABE, E.; ITO I.Y.; DIONÉIA, C.R.O. **Atividade antimicrobiana dos flavonóides e esteróides isolados de duas espécies de *Chromolaena*.** Rev Bras Ci Farm; 30: 403-408, 2003.

THEVISSSEN, K.; KATHELIJNE, K. A.; FERKET, I.; FRANÇOIS, E. J. A.; CAMMUE, B. P. A. **Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components.** Peptides, 24 (11): 1705-1712, 2003.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. **Microbiologia,** 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. **Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning**. *Biophysical Chemistry*, v. 122, p. 101–113, 2006.

Tabela 01: Perfil de resistência das bactérias a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast,Ax,Ami,Amox,Ca,Cfc,Cf, Caz,Cip,Clo,Im,Can,Szt,Tet,Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa,Gen,Tob,Ami,Can,Neo,Para, But,Sis,Net
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ast-Aztreonan; Amx- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacina; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Com-Cfepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Merpenem.

Tabela 02: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da menadiona, vitamina K<sub>3</sub> sobre cepas microbianas originárias da ATCC.

Bactérias	CIM (µg/mL)	
	Menadiona	DMSO
<i>S. aureus</i>	128	128
<i>P. aeruginosa</i>	64	256
<i>K. pneumonia</i>	128	128
<i>E. coli</i>	128	128

Tabela 03: Atividade moduladora antibacteriana da menadiona nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Menadiona ( Vitamina K)									
	CIM Combinado/8	CIM DMSO	Control	CIM Combinado/4	CIM DMSO	Controle	CIM Combinado/2	CIM DMSO	Controle
<i>Staphylococcus aureus</i> 358									
Amicacina	78,125	39,0625	39,0625	9,7656	19,53125	78,125	*2,44	9,76	*156,25
Gentamicina	9,7656	78,125	4,88	2,44	2,44	2,44	2,44	2,44	312,5
Neomicina	156,25	156,25	156,25	2,44	4,8828	156,25	2,44	2,44	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03									
Amicacina	156,25	156,25	156,25	39,0625	39,0625	78,125	*2,44	9,76	*312,5
Gentamicina	39,0625	39,0625	39,0625	9,7656	19,53125	19,53125	2,44	2,44	625
Neomicina	156,25	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	*2,44	78,125	*78,125
<i>Escherichia coli</i> 27									
Amicacina	78,125	156,25	156,25	*9,7656	78,125	*78,125	4,88	4,88	156,25
Gentamicina	19,53125	19,53125	39,0625	*2,44	19,53125	*9,7656	2,44	2,44	625
Neomicina	78,125	2,44	312,5	*78,125	78,125	*312,5	4,88	4,88	312,5

CIM: Concentração Inibitoria Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 04: Atividade moduladora antibacteriana do colesterol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Colesterol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	CIM	CIM combinado/4	CIM	CIM combinado/2	CIM
Amicacina	78,125	39,0625	39,0625	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*39,0625	*156,25	*4,88	*78,125	*9,7656	*156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	156,25	156,25	39,0625	78,125
Gentamicina	19,53125	39,0625	39,0625	39,0625	*4,88	*19,53125
Neomicina	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*19,53125	*78,125	*39,0625	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,8828	4,88	9,7656
Neomicina	156,25	156,26	78,125	156,25	78,125	78,125

CIM: Concentração Inibitoria Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 05: Atividade moduladora antibacteriana do ergosterol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Ergosterol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	CIM	CIM combinado/4	CIM	CIM combinado/2	CIM
Amicacina	78,125	39,0625	9,7656	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*19,53125	*156,25	39,0625	78,125	78,125	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	*39,0625	*156,25	*19,53	*78,125
Gentamicina	*4,88	*39,0625	*9,7656	*39,0625	*4,88	*19,53
Neomicina	312,5	312,5	625	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*9,7656	*78,125	*9,7656	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,88	*2,44	*9,7656
Neomicina	156,25	156,25	*39,0625	*156,25	39,0625	78,125

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.



#### 5.4 EFEITO MODULADOR DE COLECALCIFEROL, ALFA-TOCOFEROL E MENADIONA SOBRE *Candida* spp.

##### RESUMO

As vitaminas lipossolúveis: colecalciferol, (+) –  $\alpha$  – Tocoferol e a Menadiona, foram utilizadas com objetivo de avaliar o potencial modulador sobre cepas de *Candida albicans* 40006, *Candida krusei* 6258 e *Candida tropicalis* 13803. Devido ao seu caráter lipossolúvel, que pode modificar a permeabilidade da membrana plasmática dos fungos, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antifúngicos. Além de fazer uma comparação da ação das vitaminas na membrana plasmática com a ação do colesterol e ergosterol. A atividade antibacteriana e modulatória foi determinada por microdiluição em caldo. Na atividade moduladora foram feitas combinações das vitaminas lipossolúveis com as drogas Anfotericina B, Nistatina, Mebendazol e Benzoilmetronidazol, na busca de verificar sinergismo sobre a atividade antifúngica. As soluções das vitaminas lipossolúveis, do colesterol e ergosterol não indicaram atividade antifúngica nem moduladora com significado clinicamente relevante, apresentando a CIM  $\geq 1024 \mu\text{L}/\text{mL}$ . Não se caracterizando como modificadores da resistência fúngica, visto que não reduziram a CIM dos antifúngicos testados.

**Palavras – chave:** Colecalciferol, (+) –  $\alpha$  – Tocoferol, Menadiona, Permeabilidade, *Candida* spp, Fluidez da membrana, Modulação.

## **Efeito modulador das Colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona sobre *Candida* spp.**

J.C. Andrade<sup>1</sup>, M.F.B. Morais Braga<sup>1</sup>, G.M.M.Guedes<sup>1</sup>, S.R. Tintino<sup>1</sup>, M.A. Freitas<sup>1</sup>, G. M.M. Sampaio, C.E. Sobral-Souza<sup>1</sup>, N.F. LEITE, I. R. A. Menezes<sup>2</sup> H.D.M.Coutinho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, <sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

\* Autor Correspondente:

Henrique D. M. Coutinho.

Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

## **INTRODUÇÃO**

A atividade biológica dos produtos naturais tem sido objeto de intensa investigação científica. Produtos esses que além de alimentar, são amplamente utilizados na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividades benéficas a saúde (LEITE *et al.*, 2008). Acredita-se que os produtos naturais utilizados como alimentos apresentam propriedades benéficas além das nutricionais, sendo chamados de alimentos funcionais, nos quais são encontradas substâncias biologicamente ativas como: probióticos e prebióticos, derivados sulfurados e nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras. Dentre estes, as vitaminas, especialmente as lipossolúveis, se destacam como nutracêuticos, atuando na prevenção e/ou tratamento de doenças (MORAIS, COLLA, 2006).

Colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona (Figura 1) são vitaminas lipossolúveis que possuem ampla atividades biológicas como a intensificação da atividade antimicrobiana, mediada por peptídeos endógenos (catelicidina e defensina), anticancerígena, antioxidante, além de atua na modulação da sinalização celular e na homeostase, participando do

metabolismo ósseo e crescimento celular (MARTINEAU *et al.*, 2011; MUSZKAT *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2007; KLACK, CARVALHO, 2006).

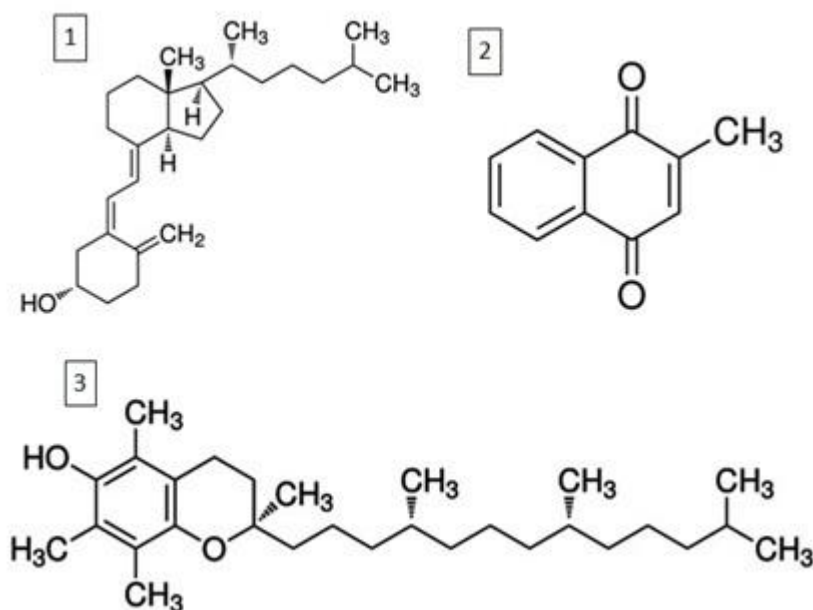


Figura 1: Estrutura molecular plana das Vitaminas Lipossolúveis.\*1.Colecalciferol (Vitamina D), 2. Menadiona (Vitamina K), 3. Alfa-Tocoferol (Vitamina E).

O caráter lipossolúvel dessas vitaminas pode modificar a permeabilidade da membrana plasmática dos fungos, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antifúngicos. Alguns estudos relatam que compostos menos polares são mais efetivos, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à presença de cadeias polissacarídeos, que atuam como barreira para compostos hidrofóbicos ativos na membrana. (PRETTO *et al.*, 2004; GIBBONS, 2004; NICOLSON *et al.*, 1999)

O colesterol (Figura 2) é fundamental para as células animais, participa de inúmeros processos biológicos, entre eles a formação de membranas, a síntese hormonal e a produção de ácidos biliares necessários à absorção de gordura pelo intestino (LEANÇA *et al.*, 2010). Nos fungos o componente lipídico encontrado na membrana é o ergosterol (Figura 02), derivado do colesterol, responsável por inúmeras características físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

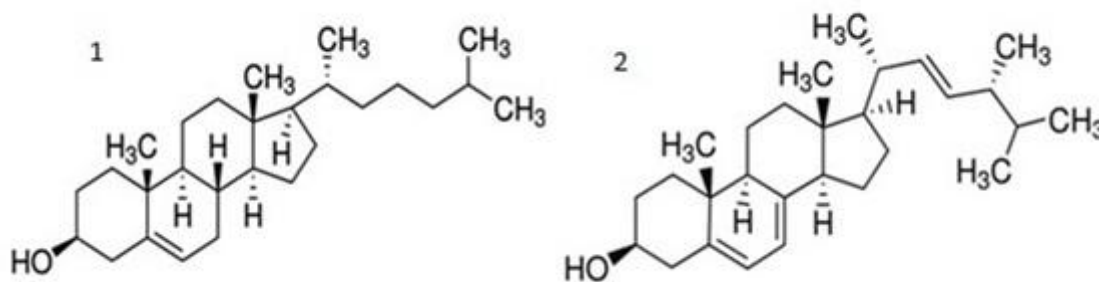


Figura 2: Estrutura molecular plana do Colesterol (1) e Ergosterol (2).

Os fungos são organismos eucariontes, ubíquos e heterotróficos, sendo na maioria multicelulares, possuem membranas plasmáticas, formadas por uma bicamada de fosfolípídeos, ergosterol e microtúbulos compostos de tubulina (ALMEIDA, 2008). A parede celular é uma barreira protetora essencial para o seu crescimento e viabilidade, constituída por elementos microfibrilares insolúveis em água (quitina e glucanos), mergulhados em uma matriz amorfa, constituída de polissacarídeos solúveis em água. (SARTORI, 2005; SIDRIN ROCHA, 2010).

O gênero *Candida* é composto por cerca de vinte espécies patogênicas e entre estas se destacam *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (ZARDO MEZZARI, 2004; MARTINS *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2008). Estas leveduras estão presentes na microbiota normal, apresentando-se patogênicas quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico, geralmente resultante de fatores fisiológicos e imunológico, ocorrendo um aumento na multiplicação e/ou invasão destes microrganismos em tecidos, instalando-se a infecção (MARTINS *et al.*, 2002).

Entre as espécies de *Candida*, a resistência aos antifúngicos tem sido um problema crescente, o que dificulta o tratamento da candidíase e de outras infecções causadas por leveduras (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial modulador das vitaminas lipossolúveis contra cepas de *candida* spp, com o aumento progressivo da sua concentração subinibitória. Além de fazer uma comparação da ação das vitaminas na membrana plasmática com a ação do colesterol e ergosterol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Fúngico

As cepas fúngicas utilizadas foram *Candida albicans* 40006, *Candida krusei* 6258 e *Candida tropicalis* 13803. Foram obtidas a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia – UFPB. Todas as cepas foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco laboratorises Ltda.). Antes do ensaio, foram cultivadas à 37°C por 24h em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, difco Laboratories Ltda.).

### Drogas

#### Vitaminas lipossolúveis

As vitaminas utilizadas do grupo das lipossolúveis foram, Vitamina D: Colecalciferol, Vitamina E: (+) –  $\alpha$  – Tocoferol de óleo vegetal e Vitamina K: Menadiona. Todas fornecidas pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob uma concentração de 100 mg/ml, dissolvidos em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), depois foi diluída em água destilada até uma concentração de 1024  $\mu\text{g/ml}$ , com exceção da menadiona que não diluiu em água, sendo diluída em DMSO para atingir a concentração de 1024  $\mu\text{g/ml}$ . Sendo obtido o controle com DMSO para verificar possível interferência nos resultados.

#### Colesterol e Ergosterol

Fornecidos pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada na concentração de 200 mg/ml, dissolvidos em 2 ml de DMSO/Tween 80, depois foi diluída em água destilada até uma concentração de 1024  $\mu\text{g/ml}$ .

#### Antifúngicos

As drogas utilizadas nos testes foram Anfotericina B, Nistatina, Mebendazol e Benzoilmetronidazol (Sigma Co., St. Louis, E.U.A.), com concentração de 1024  $\mu\text{g/ml}$ . Todas as drogas foram diluídas em água estéril.

### Atividade antifúngica e modulatória

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo o método de microdiluição em caldo. O MIC é definido como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realizá-lo o inóculo fúngico foi diluído em BHI 10% para uma suspensão de  $10^5$  UFC/ml. Em uma placa de microdiluição com 96 poços, foi

distribuído 100 µL do inoculo em cada poço, em seguida uma diluição seriada foi realizada com 100 µL da solução das vitaminas lipossolúveis, do colesterol e ergosterol com concentração de 1024 µg/ml. Tendo concentrações finais variando de 1024-8µg/ml. As placas foram incubadas durante 24 h a 35° C. O CIM fúngico foi determinado pela turvação (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Para avaliar o potencial das vitaminas lipossolúveis, do colesterol e ergosterol como modificadores da resistência aos antifúngicos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008) modificado. As soluções das vitaminas lipossolúveis foram testadas em três concentrações subinibitória (CIM/8, CIM/4 e CIM/2). Em uma placa de microdiluição foi distribuído 100 µL de uma solução contendo BHI, inóculo fúngico e vitaminas lipossolúveis em cada poço, sendo posteriormente feita uma diluição com 100 µL das drogas antimicrobianas, as concentrações variaram de 1024-0,5 µg/ml. As placas foram incubadas por 24 h a 37° C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As soluções das vitaminas lipossolúveis não mostraram atividade antifúngica com significado clinicamente relevante, apresentando a CIM  $\geq 1024$  µg/mL. A combinação das mesmas com antifúngicos não mostrou qualquer atividade moduladora frente às cepas de *Candida albicans* 40006, *Candida krusei* 6258 e *Candida tropicalis* 13803, mesmo com o aumento da sua concentração subinibitória (CIM/4 e CIM/2) (Tabela 1, 2 e 3). A utilização de vitaminas lipossolúveis como modificadores da atividade antifúngica é devido ao seu caráter apolar, compostos lipossolúveis apresentam carga efetiva negativa ou positiva podendo também ser incluídos na composição da membrana o que pode influenciar a taxa de incorporação de substâncias, podem modificar a permeabilidade da membrana plasmática (FRÉZARD, SCHETTINI, 2005).

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) ou substâncias isoladas ou sintéticas que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (COSTA *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2010).

Muitos estudos relatam a ausência de resultados significativos na modulação frente ao gênero *Candida* (SANTOS, 2011; MORAIS-BRAGA, 2012), o que pode ser indício do mecanismo switching, uma significativa alteração fenotípica na morfologia das colônias das leveduras do gênero *Candida*. Normalmente existem várias diferenças entre as colônias que apresentam *switching* e as demais, incluindo mudança no formato, estruturas de superfície

celular e germinação a 37°C, o que parece torná-las mais virulentas (ÁLVARES *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2011)

A combinação entre as drogas com o colesterol e ergosterol não apresentou resultados relevantes com CIM  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$  (Tabela 4 e 5), uma vez que o ergosterol está presente na constituição da parede celular dos fungos, e é responsável pela função estrutural e hormonal na progressão do ciclo celular (MORAES *et al.*, 2003; SARTORI, 2005). A utilização do ergosterol como modulador se deu na busca de verificar a possível modificação da permeabilidade da membrana devido a um aumento na sua concentração, entretanto isso não foi verificado. As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de antifúngicos, buscam inibidores da biossíntese do ergosterol, da inibição das topoisomerasas ou ainda da parede celular fúngica (ZACCHINO *et al.*, 2001; SARTORI, 2005).

## CONCLUSÃO

Os resultados observados apontam que o colecalciferol, (+) –  $\alpha$  – Tocoferol e a Menadiona, não são modificadores da resistência das cepas de *Candida albicans* 40006, *Candida krusei* 6258 e *Candida tropicalis* 13803, visto que não reduziu a CIM dos antifúngicos testados. Assim como o colesterol e ergosterol que não atuaram na modificação da fluidez da membrana plasmática dos fungos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. S. **Micologia**. Ciências Farmacêuticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 161 p, 2008.

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras**. J Bras Patol Med Lab, v.43, n. 5, p. 319-327, 2007

ARAUJO, C.R., MIRANDA, K.C., PASSOS, X.S., SOUZA, L.K. HASIMOTO, J. A. L., KHRAIS, C.H.A., COSTA, C.R., SILVA, M.R.R., ORIONALDA, F.L.F. **Identificação das leveduras do gênero Candida por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno chomagar Candida**. Revista de patologia tropical. Vol. 34 (1): 37-42. 2005.

BATISTA, E.S.; COSTA, A.G.V.; PINHEIRO-SANT'ANA H.M. **Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana.** Rev. Nutr., Vol. 20(5): p.525-535, 2007.

COSTA, V.C. O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S. **Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.18(2): p.245-248, Abr./Jun. 2008.

COUTINHO, H. D. M; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. **Increasing of the Aminoglycosyde Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine.** *Biological Research for Nursing* 11(4) 332-335, 2010.

COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine.** *Chemotherapy*, 54: 328-330, 2008.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio.** Quim. Nova, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p. 263-277, 2004.

JAVADPOUR, MM; JUBAN, MM; LO, WC; BISHOP, SM; ALBERTY, JB; COWELL, SM; BECKER, CL; MCLAUGHLIN, ML. **De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity.** *J Med Chem*, 39: 3107–3113. 1996.

KLACK, K.; CARVALHO, J.F. **Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina.** Rev Bras Reumatol, Vol. 46, n.6, p. 398-406, 2006.

LEANÇA, C.C.; PASSARELLI, M.; NAKANDAKARE, Edna R.;



QUINTÃO, E. C. R.. **HDL: the yin-yang of cardiovascular disease**. Arq Bras Endocrinol Metab. 54/9, 2010.

LEITE, J. P. V.; FERNANDES, J. M.; FAVARO, L. V; GONTIJO, D. C.; MAROTTA, C.P. B.; SIQUEIRA, L. C.; MAIA, R. T.; GARCIA, F. C. P., Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. **MG.BIOTA**, v.1, n.4, p. 16-34, 2008.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E.R.; FIGUEIREDO, N.F.; GODINHO, P.S.; ABRÃO, R.L. **A particularidade de ser um fungo** – I. Constituintes celulares. Biotemas, 19 (2): 17-27, 2006

MARTINEAU, AR; TIMMS, PM; BOTHAMLEY, GH; et al. **High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial**. The Lancet; Vol. 6736(10): 2011.

MARTINS, C.A.P.; SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.C.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. **Presença *candida* spp. em pacientes com periodontite crônica**. Cienc Odontol Bras, v.5, n.3, set./dez. 2002.

MACÊDO, D.P.C. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 1-7, 2008.

MORAES, R.J.Q.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P.; KOWALSKI, C.H.; MÜRMAN, L.; MALLMANN, C.A. **Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, n.4, p.483-489, 2003

MORAES, F.P.; COLLA L.M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. 3(2): p.109-122, 2006.

MORAIS-BRAGA, Maria F. B. **Prospecção química e bioatividade de *lygodium venustum* sw (lygodiaceae)**. 229f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Universidade Regional do Cariri. Crato-CE. 2012.

MUSZKAT, P.; CAMARGO, M.B.R.; GRIZ, L.H.M.; LAZARETTI-CASTRO, M. **Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D.** Arq Bras Endocrinol Metab. Vol. 54(2): p.110-7, 2010.

NCCLS - **National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Sixteenth informational supplement. Document M100-S16. NIH, Wayne, PA, 2006.

NCCLS (2008): *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test*: ninth.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. **Potential of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes.** Fems microbiol. Lett, v. 179, p. 233–239, 1999.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Z. **Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae);** Naturforsch, v. 59c, p. 657- 662, 2004.

ROSSI, T.; LOZOVVOY, M.A.B.; SILVA, R.V.; FERNANDES, E.V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I.C.; SARIDAKIS, H.O.; WATANABE, M.A.E.; FELIPE, I. **Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. **4. Biomembranas. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). A Célula 2001.** Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56, 2001.

SANTOS, K.K.A. **Atividade antiepimastigota, citotóxica e fungicida de plantas medicinais da Região do Cariri.** 162f. Dissertação (Mestrado em Bioprospeção Molecular) Universidade Regional do Cariri. Crato-CE. 2011.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis spreng* (*Wedelia paludosa*)(arteraceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí.81p. 2005.

SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. . 388 p, 2010.

THEVISSSEN, K.; KATHELIJNE, K. A.; FERKET, I.; FRANÇOIS, E. J. A.; CAMMUE, B. P. A. **Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components**. Peptides, 24 (11): 1705-1712, 2003.

ZACCHINO, S. **Estratégias para a descoberta de novos agentes**. IN: YUNES, R.R.CARLITO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p.45-75. 2001.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. **Os antifúngicos nas infecções por *Candida sp.*** News Lab. 63: 136-146. 2004.

Tabela 1: Atividade moduladora do Colecalciferol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

<b>Colecalciferol</b>						
<i>Candida albicans</i> ATCC 40006						
	MIC combinado/8	Controle	MIC combinado/4	Controle	MIC combinado/2	Controle
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258						
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803						
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 2: Atividade moduladora do Alfa-Tocoferol nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

<b>Alfa-Tocoferol (Vitamina E)</b>						
<i>Candida albicans</i> ATCC 40006						
	MIC combinado/8	Controle	MIC combinado/4	Controle	MIC combinado/2	Controle
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258						
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803						
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024

CIM: Concentração Inibitoria Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 3: Atividade moduladora da Menadiona nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

<b>Menadiona (Vitamina K)</b>						
<i>Candida albicans</i> ATCC 40006						
	MIC combinado/8	Controle	MIC combinado/4	Controle	MIC combinado/2	Controle
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258						
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803						
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024

CIM: Concentração Inibitoria Mínima.



## 5.5 PATENTE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS CARACTERIZADA POR MENADIONA (VITAMINA K), ALFA-TOCOFEROL (VITAMINA E) E COLECALCIFEROL (VITAMINA D) FRENTE A BACTÉRIAS MULTIRESISTENTES.

### RESUMO

Avaliação da Atividade Moduladora de Menadiona (vitamina K) Alfa-tocoferol (vitamina E) e colesterciferol (vitamina D) frente à bactérias multiresistentes, para fins terapêuticos.” A presente invenção refere-se ao método “*in vitro*” de microdiluição em caldo para avaliar a atividade moduladora por Colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona, contra linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multiresistentes. Além de averiguar a analogia do mecanismo de ação modulador das vitaminas lipossolúveis com o colesterol e ergosterol. De acordo com a invenção o caráter lipofílico destas vitaminas pode admitir perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana, permitindo assim o aumento da permeabilidade. Quando associado com aminoglicosídeos, Colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona possivelmente atuaram através dessa ação lipofílica nos envoltórios celulares bacterianos, modulando efetivamente os antibióticos utilizados. Obtendo sucesso contra a resistência bacteriana.

Ver anexo A: página 162.

**Avaliação da atividade moduladora de vitaminas lipossolúveis caracterizada por Menadiona (Vitamina K), Alfa-Tocoferol (Vitamina E) e Colecalciferol (Vitamina D) frente a bactérias multiresistentes**

## CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada à modulação de antibióticos através da utilização de algumas vitaminas lipossolúveis, com finalidade de combater à crescente resistência adquirida por bactérias a muitos antibióticos, o que representa um obstáculo e impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública.

## ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

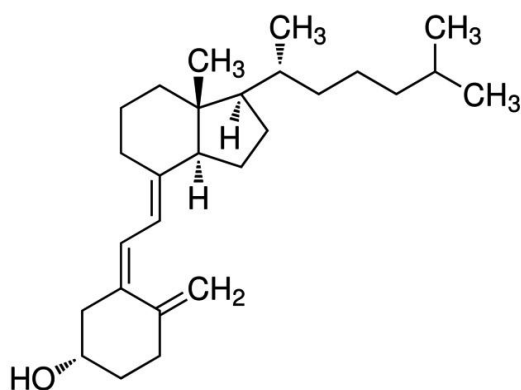
A atividade biológica dos produtos naturais tem sido objeto de intensa investigação científica. Produtos esses que além de alimentar, são amplamente utilizados na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividades benéficas a saúde (LEITE *et al.*, 2008). Acredita-se que os produtos naturais usados como alimentos apresentam propriedades benéficas além das nutricionais, sendo chamados de alimentos funcionais, nos quais são encontradas substâncias biologicamente ativas como: probióticos e prebióticos, derivados sulfurados e nitrogenados, pigmentos, vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras. (MORAIS, COLLA, 2006).

Vitaminas são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades e de extrema importância para o funcionamento do organismo, na forma de cofatores. A falta de vitaminas na dieta resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento de deficiências e outras perturbações orgânicas, sendo característico de carência. A maioria dos organismos animais, independente dos fatores ambientais, é incapaz de sintetizá-las por via anabólica, por essa razão, as vitaminas precisam ser incluídas nas dietas; em geral, são necessárias em pouca quantidades e em função da idade, sexo, estado fisiológico e atividade física do indivíduo (PAIXÃO, STAMFORD, 2004).

As vitaminas são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis, devido as suas propriedades fisiológicas e físico-químicas. Dentre estas, as vitaminas lipossolúveis, D, E e K se

destacam como nutracêuticos, parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, atuando na prevenção e/ou tratamento de doenças (PAIXÃO, STAMFORD, 2004; MORAIS, COLLA, 2006).

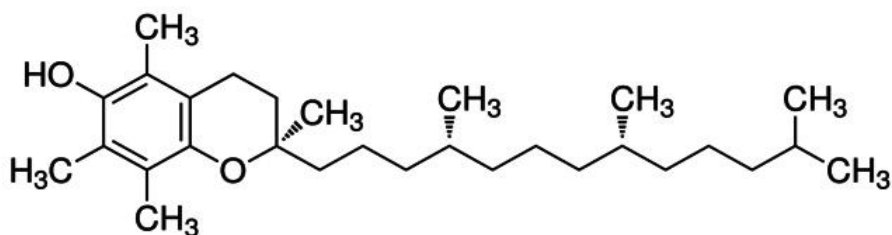
A vitamina D é um hormônio esteroidal, cuja principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea. A forma ativa deste hormônio é o 1,25dihidroxitociferol, um derivado da vitamina D<sub>3</sub> também chamado de colecalciferol ou calciferol. A vitamina D<sub>3</sub> é produzida por irradiação da luz ultravioleta B, na pele, ou de forma menos eficaz através da dieta (DANTAS *et al.*, 2009). Abaixo Estrutura do Colecalciferol:



Estrutura molecular plana do Colecalciferol

Além do seu papel na homeostase do cálcio, apresenta atividade biológica e efeitos mais complexos em relação ao organismo, como a intensificação da atividade antimicrobiana, mediada por peptídeos endógenos (catelicidina e defensina), em monócitos, neutrófilos e outras linhagens celulares. (DANTAS *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010; MARTINEAU *et al.*, 2011; MUSZKAT *et al.*, 2010).

A vitamina lipossolúvel E é a principal vitamina presente no plasma e na partícula de LDL, podendo se apresentar, na natureza, em quatro isoformas: alfa, beta, gama e delta-tocoferol, e uma das isoformas mais abundante, ativa biologicamente e mais potente antioxidante é o alfa-tocoferol, sendo também a isoforma mais explorada (MÁRQUEZ *et al.*, 2002; CATANIA *et al.*, 2009).



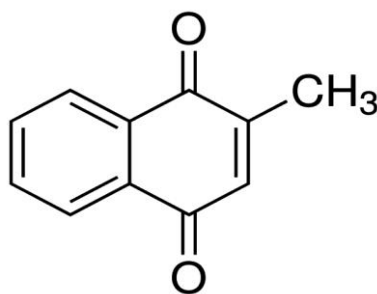
Estrutura molecular plana do Alfa-Tocoferol



O interesse cada vez maior pela vitamina E é devido as suas atividades biológicas, especialmente como agente antioxidante, sendo capaz de retardar o envelhecimento e proteger o organismo de doenças crônicas não transmissíveis, como Parkinson, Alzheimer, quadros infecciosos e reumáticos, câncer e enfermidades cardiovasculares (BATISTA *et al.*, 2007; BERG, 2010; MÁRQUEZ *et al.*, 2002). Atualmente, é estudada a atuação da vitamina E como modulador da sinalização celular e da transcrição de genes (BATISTA *et al.*, 2007). Além de ser capaz de inibir o crescimento das células malignas (SAMPAIO, ALMEIDA, 2009).

A vitamina E ocorre naturalmente em alimentos de origem vegetal, nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no germe de trigo e de origem animal, como gema de ovo e fígado (BATISTA *et al.*, 2007).

Menadiona, vitamina K<sub>3</sub> é um composto sintético, convertido no intestino em vitamina K<sub>2</sub> (KLACK, CARVALHO, 2006).



Estrutura molecular plana da Menadiona

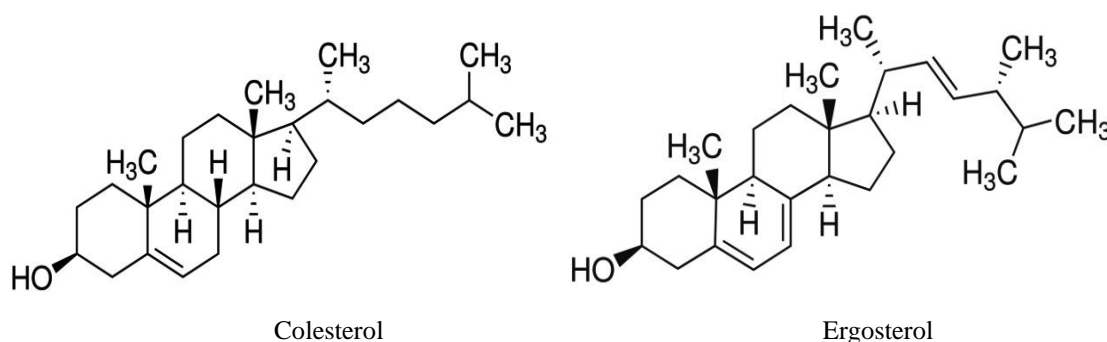
A vitamina K é uma substância biologicamente ativa, encontrada em alimentos funcionais, necessária principalmente para o mecanismo da coagulação sanguínea, sendo essencial para a síntese da protrombina, além de participar, na síntese de proteínas presentes no plasma, rins e talvez outros tecidos. Alguns estudos mostraram efeitos inibitórios do crescimento de várias células neoplásicas, provocados pela vitamina K<sub>2</sub> e redução do risco de eventos mutagênicos na fase de proliferação celular rápida em fetos e recém-nascidos (KLACK, CARVALHO, 2006).

O caráter lipossolúvel dessas vitaminas, sugere que ambas podem modificar a permeabilidade da membrana plasmática das bactérias, tornando-a mais susceptível a penetração de substâncias, principalmente antibióticos. Alguns estudos relatam que compostos menos polares são mais efetivos, frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido à presença de cadeias polissacarídeas, que atuam como barreira para

compostos hidrofóbicos ativos na membrana. (PRETTO *et al.*, 2004; GIBBONS, 2004; NICOLSON *et al.*, 1999).

Na busca de conhecer o mecanismo de ação das vitaminas foram utilizados o colesterol e seu derivado, o ergosterol, ambos possuem semelhança na estrutura e participam da síntese de algumas vitaminas e hormônios.

O colesterol é um componente lipídico, necessário para o funcionamento normal do corpo, desempenha uma importante função estrutural e funcional na membrana plasmática, assim como nas membranas das organelas internas da célula, atua na síntese de ácidos biliares necessários à absorção de gordura e vitaminas lipossolúveis pelo intestino, além de participa da produção de hormônios esteróides e da vitamina E (LUDKE, LÓPEZ, 1999; LEANÇA *et al.*, 2010).



As bactérias não possuem colesterol na formação da sua membrana citoplasmática, nem ergosterol, componente lipídico encontrado na membrana dos fungos, ambos foram utilizados por serem substâncias complexa do tipo lipídio-esteróide (SANTOS, CARVALHO, 2001; THEVISSSEN *et al.*, 2003; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006), podendo agir sobre o mosaico fluido da membrana bacteriana, modificação sua fluidez, sendo assim possível verificar a existência da similaridade da ação das vitaminas lipossolúveis na membrana plasmática bacteriana com a ação do colesterol e ergosterol.

As bactérias são organismos simples encontrados na maioria dos ambientes naturais, a célula bacteriana apresenta diversas estruturas, algumas presentes só em determinadas espécies. Uma estrutura essencial da bactéria é a membrana citoplasmática, responsável por inúmeras funções entre elas a duplicação do DNA, a secreção de enzimas, a biossíntese de componentes, o transporte de solutos e a produção de energia (SCHAECHTER *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2005). A parede celular é uma estrutura que confere a muitas bactérias rigidez, e de acordo com a sua constituição as bactérias são divididas em duas classes: gram-

positivas e gram-negativas, a diferença entre ambas é devida principalmente as suas propriedades de permeabilidade e aos componentes de superfície (TORTORA et al., 2008; SCHAECHTER et al., 2002; PRETTO et al., 2005).

Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular é formada por muitas camadas de peptidoglicana, ácidos teicóicos e fosfato, formando uma estrutura espessa e rígida. Contrariamente as bactérias Gram-negativas possuem parede constituída por poucas ou apenas uma única camada de peptidoglicana e uma membrana externa, o que garante é um obstáculo a mais para certos antibióticos. Entretanto são mais suscetíveis ao rompimento mecânico (TORTORA, *et al.*, 2008).

Atualmente as infecções bacterianas são foco da saúde pública, devido principalmente a ocorrência do crescimento significativo da resistência bacteriana. As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são as mais comuns, apresentando uma maior dificuldade no tratamento devido a sua resistência a vários antibióticos (TORTORA et al., 2008; COUTINHO et al., 2009; COUTINHO et al., 2008). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, agredindo a pele, trato urinário, ouvidos e olhos (MURRAY et al. 2004). *Escherichia coli* é a espécie mais comum do gênero *Escherichia*, associado a infecções graves do trato urinário, meningite e gastroenterite (MURRAY et al. 2004; TORTORA et al., 2008;).

Este é o primeiro relato da atividade antibacteriana e potencialização de aminoglicosídeos pela menadiona, frente a bactérias multiresistentes. Até então não se tinha nenhum registro da utilização da menadiona como modulador de antibióticos, concomitante com outras drogas.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um aspecto da presente invenção é avaliar, *in vitro*, a atividade moduladora do colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona, modificando assim a ação de antibióticos frente à bactérias multiresistentes. Compreendendo novas alternativas mais eficazes na terapêutica contra infecções bacterianas.

Na primeira etapa foram utilizadas cepas bacterianas padrões *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia* e *Klebsiella pneumonia*, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

Com o resultado da CIM, outra etapa foi realizada para verificação da atividade moduladora, cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

multiresistentes foram utilizadas, e com o aumento progressivo da concentração subinibitória, foi observado os eventos modificadores de cada solução. Em uma etapa adicional foi averiguado e comparado a similaridade do mecanismo de ação moduladora do colesterol e ergosterol com a ação moduladora das soluções vitamínicas.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Devido à busca por novas substâncias capazes de modificar a resistência bacteriana e tendo em vista a potencialidade das atividades biológicas que as vitaminas lipossolúveis possuem, foi verificado, considerando a lipossolubilidade destas substâncias, sua ação na modulação de antibióticos.

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) ou substâncias isoladas ou sintéticas que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (COSTA *et al*, 2008).

Atualmente combinações múltiplas de drogas estão sendo utilizadas no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Relatos indicam que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicadas em clínicas são comuns, é o caso da combinação de penicilina com a gentamicina. Essa combinação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal que vai alterar a ação dos antibióticos, seja aumentando a atividade antibiótica ou revertendo à resistência (COUTINHO *et al.*, 2008).

Quando a substância, utilizada na combinação, intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON & ONOFRE, 2010).

A atividade antibacteriana e ação moduladora foram verificadas pelo método de microdiluição em caldo.

### 1. Preparo das Soluções

As vitaminas utilizadas do grupo das lipossolúveis foram Vitamina D: Colecalciferol, Vitamina E: (+) –  $\alpha$  – Tocoferol de óleo vegetal e Vitamina K: Menadiona. Todas fornecidas pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob uma concentração de 100mg/ml, dissolvidos em 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO), depois foi

diluída em água destilada até uma concentração de 1024µg/ml, com exceção da menadiona que não diluiu em água, sendo diluída em DMSO para atingir a concentração de 1024µg/ml. Sendo feito o controle com DMSO para verificar possível interferência nos resultados. As soluções de Colesterol e Ergosterol foram utilizadas para verificação da similaridade e comparação do mecanismo de ação com as vitaminas. Fornecidos pela SIGMA Chemical Co., St. Louis, E.U.A. A solução utilizada nos testes foi preparada sob uma concentração de 200mg/ml, dissolvidos em 2ml de DMSO/Tween 80, após diluída em água destilada até uma concentração de 1024µg/ml.

Os antibióticos usados nos testes foram os aminoglicosídeos: amicacina, neomicina e gentamicina (Sigma Co., St. Louis, EUA). Todas as drogas foram diluídas em água estéril, para uma concentração 5000µg/ml.

## 2. Teste de atividade antibacteriana e modulação das drogas

O método de diluição em caldo determinou a concentração inibitória mínima (CIM) que é definida como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano (NCCLS, 2008). Para realiza-lo o inóculo bacteriano foi diluído em BHI 10% (*Brain Heart Infusion*, difco Laboratories Ltda.) para uma suspensão de  $10^5$  UFC/ml. Em uma placa de microdiluição com 96 poços, foi distribuído 100µL do inóculo em cada poço, em seguida uma diluição seriada foi realizada com 100µL da solução de colecalciferol, alfa-tocoferol, menadiona, do colesterol e ergosterol, além do DMSO (controle negativo) com concentração de 1024µg/ml. Tendo concentrações finais variando de 1024-8µg/ml. As placas foram incubadas durante 24h a 35°C. O MIC bacteriano foi determinado através da revelação com solução de resazurina, 20µl em cada poço (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Para avaliar o potencial do colecalciferol, alfa-tocoferol, menadiona e do colesterol e ergosterol como modificadores da resistência aos antibióticos, foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008). As soluções foram testadas em três concentrações subinibitória (MIC/8, MIC/4 e MIC/2). Em uma placa de microdiluição foi distribuído 100µL de uma solução contendo BHI, inóculo bacteriano e as soluções em cada poço, sendo posteriormente feita uma diluição com 100µL das drogas antimicrobianas, as concentrações variaram de 5.000-2,44µg/ml. As placas foram incubadas por 24h a 37°C.

## 3. Material Bacteriano Utilizado

As bactérias utilizadas no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram às linhagens padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, ATCC e *Klebsiella pneumonia* ATCC 4362. Para

avaliar a atividade moduladora das soluções, foram utilizadas cepas bacterianas multiresistentes, a partir de isolados clínicos: *S. aureus* 358, *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27, com o perfil de resistência demonstrado abaixo:

<b>Bactéria</b>	<b>Origem</b>	<b>Perfil de Resistência</b>
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast,Ax,Ami,Amox,Ca,Cfc,Cf, Caz,Cip,Clo,Im,Can,Szt,Tet,Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa,Gen,Tob,Ami,Can,Neo,Para, But,Sis,Net
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm,Ctz,Imi,Cip,Ptz,Lev,Mer,Ami

Ast-Aztreonan; Amx- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazididima; Cip-Ciprofloxacina; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Com-Cefepime; Ctz-Ceftazidime; Ptz-Piperacilina-tazobactam; Lev-Levofloxacina; Mer-Merpenem.

Foram obtidas a partir da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia – UFPB. Todas as cepas foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco laboratorises Ltda.). Antes do ensaio, as células foram cultivadas à 37°C por 24h em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, difco Laboratories Ltda.).

O interesse por substâncias isoladas com propriedades antibacterianas tem aumentado, devido à falta de eficácia nos tratamentos terapêuticos de muitas das infecções existentes, decorrente do desenvolvimento da resistência bacteriana a antibióticos (KÖHLER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2003, TALEB-CONTINI *et al.*, 2003).

Nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizados com as linhagens bacterianas padrões, a solução de colecalciferol e alfa-tocoferol não apresentaram atividade antibacteriana clinicamente relevante, sendo todos os resultados  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ , já a solução de menadiona demonstrou atividade antibacteriana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* 03, apresentando concentração inibitória mínima de  $64\mu\text{g/mL}$ , o DMSO, utilizado como controle negativo, apresentou uma CIM bem inferior de  $256\mu\text{g/mL}$  frente à cepa testada (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona sobre cepas microbianas originárias da ATCC.

Bactérias	CIM (µg/mL)			
	COLECALCIFEROL	ALFA-TOCOFEROL	MENADIONA	DMSO
<i>S. aureus</i>	≥1024	≥1024	128	128
<i>P. aeruginosa</i>	≥1024	≥1024	64	256
<i>K. pneumonia</i>	≥1024	≥1024	128	128
<i>E. coli</i>	≥1024	≥1024	128	128

A solução de Menadiona não apresentou atividade antibacteriana relevante frente às outras cepas microbianas analisadas, tendo o mesmo valor da CIM do controle do DMSO. O dimetilsulfóxido é versátil, possui diversas propriedades farmacológicas e terapêuticas, dentre estas a antimicrobiana, apresentando “*In vitro*” em concentrações de 5-50%, atividade bacteriostática ou bactericida contra várias bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus* spp., *E. coli.*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. (BRAYTON, 1986; STONE, 1993; MANGIA *et al.*, 2008).

Quando combinado com os antibióticos da classe de amiglicosídeo, foi verificado que o colecalciferol, alfa-tocoferol e a menadiona apresentaram diminuição da concentração inibitória mínima, com resultados relevantes a partir do CIM/8.

Na concentração subinibitória CIM/8 o colecalciferol associado com amicacina reduziu dois pontos da CIM para *Pseudomonas aeruginosa* 03, com aumento da concentração subinibitória CIM/4 essa redução aumentou para três pontos. Também houve redução significativa da CIM de amicacina frente a *E. coli* 27. Na MIC/2 amicacina quando associada com colecalciferol demonstrou resultados relevantes para todas as cepas multiresistentes utilizadas. Nas três concentrações subinibitória a combinação de colecalciferol com neomicina apresentou antagonismo, diminuindo a eficácia do antibiótico (Tabela 03).

Quando a substância, utilizada na combinação, intervém de forma positiva, ou seja, aumentando a atividade do antibiótico, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON & ONOFRE, 2010).

Tabela 3: Atividade moduladora do colecalciferol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Colecalciferol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	MIC combinado/8	Controle	MIC combinado/4	Controle	MIC combinado/2	Controle
Amicacina	39,0625	39,0625	39,0625	39,0625	*4,8828	*78,125
Gentamicina	9,7656	9,7556	9,7656	9,7656	4,8828	2,44
Neomicina	156,25	156,25	#2.500	#156,25	#1.250	#156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	*39,0625	*156,25	*39,0625	*312,5	*9,7656	*78,125
Gentamicina	*9,7656	*39,0625	*4,8828	*39,0625	39,0625	19,53125
Neomicina	#2.500	#78,125	#625	#78,125	156,25	78,125
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	78,125	78,125	*19,53125	*78,125	*4,8828	*78,125
Gentamicina	9,7656	9,7656	9,7656	9,7656	4,8828	9,7656
Neomocina	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	312,5

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo, # Antagonismo.

A solução de alfa-tocoferol combinado com gentamicina na concentração subinibitória CIM/8, diminuiu quatro pontos da CIM para *Staphylococcus aureus* 358, gerando antagonismo quando utilizado em conjunto com neomicina frente à *Pseudomonas aeruginosa* 03. Com o aumento da concentração da CIM/4 ocorreu modulação para amicacina e neomicina com dois pontos para CIM frente a *P.aeruginosa* 03, para gentamicina frente *S. aureus* 358 e neomicina frente a *E. coli* 27. Além de reduzir a eficácia de neomicina e gentamicina para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente. Na concentração CIM/2 alfa-tocoferol só não apresentou resultado significativo para gentamicina frente a *S. aureus* e amicacina frente a *P.aeruginosa*. (Tabela 04).

Tabela 4: Atividade moduladora do alfa-tocoferol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

(+) - $\alpha$ -Tocoferol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	MIC combinado/8	Controle	MIC combinado/4	Controle	MIC combinado/2	Controle
Amicacina	156,25	156,25	39,0625	39,0625	*4,8828	*78,125
Gentamicina	*19,53	*312,5	*2,44	*9,7656	2,44	2,44
Neomicina	156,25	156,25	#2.500	#156,25	*9,7656	*156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	312,5	312,5	*78,125	*312,5	39,0625	78,125
Gentamicina	1.250	1.250	39,0625	39,0625	*4,8828	*19,53125
Neomicina	#2.500	#78,125	*19,53125	*78,25	*2,44	*78,125
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	312,5	312,5	39,0625	39,0625	*9,7656	*78,125
Gentamicina	625	625	#19,53125	#4,8828	*2,44	*9,7656
Neomocina	312,5	312,5	*78,25	*312,5	*19,53125	*312,5

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo, # Antagonismo.



Na constatação do potencial modulador da menadiona na concentração subinibitória CIM/8, não foi verificado resultados com relevância clínica frente a nenhuma cespa utilizada. Para concentração CIM/4 menadiona demonstrou interação sinérgica significativa para *S. aureus* 358 com amicacina e neomicina e *E. Coli* 27 frente a todos os aminoglicosídeos. A concentração subinibitória MIC/2 modulou amicacina frente a *S. aureus* 358, e amicacina e neomicina para *P. aeruginosa* 03. (tabela 05).

Tabela 5: Atividade moduladora antibacteriana da menadiona nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

	Menadiona ( Vitamina K)								
	CIM	CIM	Control	CIM	CIM	Controle	CIM	CIM	Controle
	Combinado/8	DMSO		Combinado/4	DMSO		Combinado/2	DMSO	
<i>Staphylococcus aureus</i> 358									
Amicacina	78,125	39,0625	39,0625	9,7656	19,53125	78,125	*2,44	9,76	*156,25
Gentamicina	9,7656	78,125	4,88	2,44	2,44	2,44	2,44	2,44	312,5
Neomicina	156,25	156,25	156,25	2,44	4,8828	156,25	2,44	2,44	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03									
Amicacina	156,25	156,25	156,25	39,0625	39,0625	78,125	*2,44	9,76	*312,5
Gentamicina	39,0625	39,0625	39,0625	9,7656	19,53125	19,53125	2,44	2,44	625
Neomicina	156,25	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	*2,44	78,125	*78,125
<i>Escherichia coli</i> 27									
Amicacina	78,125	156,25	156,25	*9,7656	78,125	*78,125	4,88	4,88	156,25
Gentamicina	19,53125	19,53125	39,0625	*2,44	19,53125	*9,7656	2,44	2,44	625
Neomicina	78,125	2,44	312,5	78,125	78,125	312,5	4,88	4,88	312,5

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo, # Antagonismo.

A composição de substâncias lipofílica, como as três substâncias utilizadas admite perturbações na membrana bacteriana, resultando em dano dos elementos fundamentais para a integridade da membrana como: redução do potencial de membrana, perda de íons, citocromo C, proteínas e radicais, seguidos de colapso da bomba de prótons e redução de ATP (SIKKEMA *et al.*, 1994; TURINA *et al.*, 2006; HIRAYAMA *et al.*, 2006).

Ao analisar o efeito modificador da resistência bacteriana é notável que a potencialização do efeito dos antibióticos seja proporcional ao aumento da concentração das vitaminas, obtendo-se um melhor resultado com a concentração subinibitória CIM/2.

Outro fato observado que ambas as soluções de vitaminas apresentaram um resultado relevante frente a *P.aeruginosa* 03 e *E. Coli* 27. Um resultado muito positivo devido ao fato das duas serem gram-negativas, segundo Sartori (2005), muitos microrganismos gram-negativos apresentam nível elevado de resistência intrínseca a muitos antibióticos, utilizando como barreira o sistema de efluxo ativo e sua baixa permeabilidade da membrana externa.

Segundo Nicolson *et al.*, (1999) bactérias são mais suscetíveis a substâncias apolares. Isso sugere que o colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona devido ao seu caráter lipossolúvel atue através de uma ação lipofílica nos envoltórios celulares, proporcionando um desequilíbrio no mosaico fluido da membrana bacteriana (NOSTRO *et al.*, 2004), modulando mais efetivamente *P.aeruginosa* 03 e *E.coli* 27, quando comparado com *S. Aureus* 358. A permeabilização pode atingir membrana externas e internas, facilitando a entrada de antibióticos, além de provocar a lise celular e necrose (KNOWLES *et al.*, 2005; ARMSTRONG, 2006).

Mesmo sendo evidenciado um resultado efetivo entre as bactérias gram-negativas, é observada uma diferença entre os eventos modulatórios de *P.aeruginosa* 03 e *E.coli* 27. O que pode ser atribuído a camada lipopolissacarídica (LPs). Lipopolissacarídeo é o componente estrutural da parede de bactérias Gram-negativas, sendo representado pela endotoxina, enzimas que em *E.coli* funcionam como um fator de virulência (CAMPEBELL *et al.*, 2007). Em *P.aeruginosa* sua presença é intrínseca, aumentando sua virulência e resistência, devido à adaptação fisiológica em respostas a mudanças do ambiente, principalmente com alterações na membrana externa da célula (KURAHASHI *et al.*, 1999; MIYAGI *et al.*, 2000; LINCOPAN, TRABULSI, 2004).

O colesterol e o ergosterol são componentes importantes das membranas biológicas de eucarióticos, ausentes na membrana das bactérias, responsável pela manutenção da permeabilidade das membranas. A célula pode controlar sua fluidez através da regulação do nível de colesterol, ou do grau de saturação das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolípidios (FRÉZARD, SCHETTINI, 2005). Devido as suas estruturas lipofílicas, análoga a estrutura das três vitaminas, ambos foram utilizados como controle, para verificar e comparar o mecanismo de ação do Colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona na membrana bacteriana.

A solução de colesterol e ergosterol não apresentou atividade antimicrobiana com CIM  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ , o que já era previsto. No entanto a combinação de ambos com os antibióticos, sobre as bactérias multiresistentes, reduziu a CIM significativamente, conforme a concentração subinibitória era aumentada (Tabela 6 e 7).

Tabela 6: Atividade moduladora do colesterol associado com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Colesterol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	78,125	39,0625	39,0625	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*39,0625	*156,25	*4,88	*78,125	*9,7656	*156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	156,25	156,25	39,0625	78,125
Gentamicina	19,53125	39,0625	39,0625	39,0625	*4,88	*19,53125
Neomicina	156,25	312,5	156,25	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*19,53125	*78,125	*39,0625	*156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,8828	4,88	9,7656
Neomicina	156,25	156,26	78,125	156,25	78,125	78,125

CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo.

Tabela 7: Atividade moduladora do ergosterol associada com aminoglicosídeos nas concentrações subinibitória de CIM/8, CIM/4 e CIM/2

Ergosterol						
<i>Staphylococcus aureus</i> 358						
	CIM combinado/8	Controle	CIM combinado/4	Controle	CIM combinado/2	Controle
Amicacina	78,125	39,0625	9,7656	19,53125	*19,53	*156,25
Gentamicina	*4,88	*19,53125	2,44	2,44	*2,44	*9,7656
Neomicina	*19,53125	*156,25	39,0625	78,125	78,125	156,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03						
Amicacina	78,125	39,0625	*39,0625	*156,25	*19,53	*78,125
Gentamicina	*4,88	*39,0625	*9,7656	*39,0625	*4,88	*19,53
Neomicina	312,5	312,5	625	312,5	156,25	156,25
<i>Escherichia coli</i> 27						
Amicacina	39,0625	39,0625	*9,7656	*78,125	*9,7656	156,25
Gentamicina	9,7656	9,7656	2,44	4,88	*2,44	9,7656
Neomicina	156,25	156,25	*39,0625	*156,25	39,0625	78,125

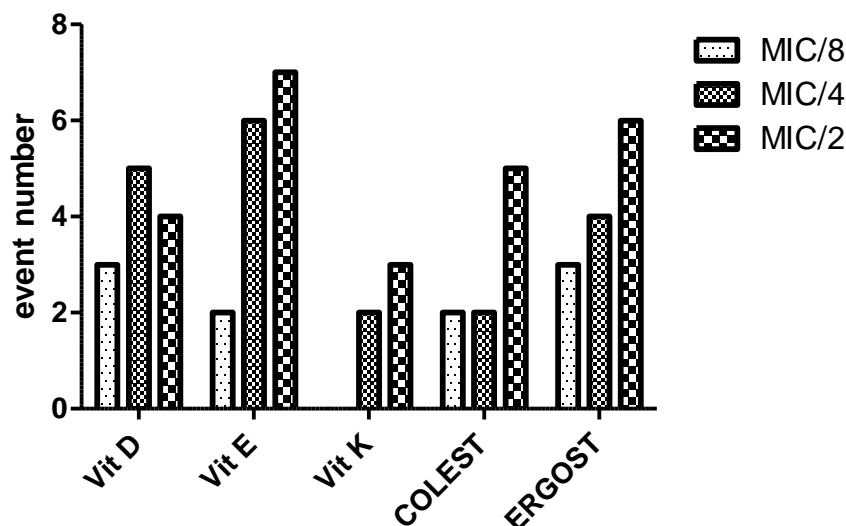
CIM: Concentração Inibitória Mínima. \* Sinergismo, # Antagonismo.

Não se tem registro da utilização de colesterol e ergosterol como modificadores da ação de antibióticos nem de qualquer outra droga, sendo esse o primeiro estudo realizado neste âmbito.

Assim foi possível comprovar a similaridade do mecanismo de ação modulador entre o colesterol, ergosterol e colesterciferol, alfa-tocoferol e menadiona (Gráfico 01). Sendo que

ergosterol apresentou números de eventos modificadores mais próximos dos eventos das vitaminas.

Gráfico 1: Comparação do número de eventos de modulação das soluções de colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona com colesterol e ergosterol nas concentrações subinibitória CIM/8, CIM/4 e CIM/2.



As soluções de colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona demonstraram resultados clinicamente relevantes, à modulação de aminoglicosídeos, sobre bactérias multiresistentes. O que representa uma alternativa interessante contra a crescente resistência bacteriana, uma vez que são vitaminas lipossolúveis e estão presente na alimentação, e não apresenta toxicidade ao organismo humano. Sobretudo, estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para verificar a biodisponibilidade e os mecanismos de ação envolvidos nessa interação.

## REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, J.S. **Mitochondria: a target for câncer therapy**. Br J Pharmacol., London, vol. 147, 239-248, 2006.

BATISTA, E.S.; COSTA, A.G.V.; PINHEIRO-SANT'ANA H.M. **Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana**. Rev. Nutr., Vol. 20(5): p.525-535, 2007.

BERG, G.A. **Vitamina E: un tema siempre presente, nunca concluído**. Revista Argentina de Cardiología. Vol 78 n° 5, 2010.

BRAYTON, C. F. **Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review.** *Cornell veterinarian*, v. 76, p. 61-90, 1986.

CAMPEBELL, R.C; PEIRÓ, J.R.; ROSA , P.C.S.; VALADÃO, C.A.A.; BECHARA, G.H. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em eqüinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Vol.59(4): 837-843, 2007.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. **Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 20(3):: 348-354. 2010.

CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R.G. **Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* Vol. 53(5): p.550-9, 2009.

COUTINHO, H.D. M; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. **Increasing of the Aminoglicosyde Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine.** *Biological Research for Nursing* 11(4) 332-335, 2010.

COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine.** *Chemotherapy*, 54: 328-330, 2008.

DANTAS, A.T.; DUARTE, L.B.P.; MARQUES, C.D.L. **A vitamina D na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico.** *Temas de Reumatologia Clínica*, Vol. 10, Nº 2, p.52-59, 2009.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A. **Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na Quimioterapia à base de antimônio.** *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p. 263-277, 2004.

HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G. L.; FAGUNDES NETO, U. **Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa**. The Eletronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases. Vol. 10 (3), 2006.

JAVADPOUR, MM; JUBAN, MM; LO, WC; BISHOP, SM; ALBERTY, JB; COWELL, SM; BECKER, CL; MCLAUGHLIN, ML. **De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity**. *J Med Chem*, 39: 3107–3113. 1996.

KLACK, K.; CARVALHO, J.F. **Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina**. *Rev Bras Reumatol*, Vol. 46, n.6, p. 398-406, 2006.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. **Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium**. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb., p. 797–803, 2005.

KÖHLER T., Pechére J.-C., and Plésiat P. **Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance**. *Cell. Assoc. Mol. Life Sci.* **56**, 771-778, 1999.

KURAHASHI, K.; KAJIKAWA, O.; SAWA, T.; OHARA, M.; GROPPER, M.A.; FRANK, D.W. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J Clin Invest**. Vol. 104(6): 743-50. 1999.

LEE, E.W.; CHEN J.; HUDA M.N.; KURODA T.; MIZUSHIMA T.; TSUCHIYA T. **Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis***. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 266-270, 2003.

LEANÇA, C.C.; PASSARELLI, M.; NAKANDAKARE, E.R.; QUINTÃO, E.C. R.. **HDL: the yin-yang of cardiovascular disease**. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 54/9, 2010.

LEITE, J. P. V.; FERNANDES, J. M.; FAVARO, L. V; GONTIJO, D. C.; MAROTTA, C.P. B.; SIQUEIRA, L. C.; MAIA, R. T.; GARCIA, F. C. P., Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. **MG.BIOTA**, v.1, n.4, p. 16-34, 2008.

LINCOPAN, N; TRABULSI, L. - *Pseudomonas aeruginosa*. In “Microbiologia”. 4ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, p. 359-368, 2004.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E.R.; FIGUEIREDO, N.F.; GODINHO, P.S.; ABRÃO, Rosana Leon. **A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares**. Biotemas, 19 (2): 17-27, 2006

LUDKE, M.C.M.M.; LÓPEZ, J. **Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 1, p.181-187, 1999.

MANGIA, S.H. **Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso de ribavirina e dimetil-sulfóxido (dmsO)**. 186f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2008.

MARQUES, C.D.L.; DANTAS, A.T.; FRAGOSO, T.S.; DUARTE, Â.L.B. **A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes**. Rev Bras Reumatol; Vol. 50(1): p.67-80, 2010.

MÁRQUEZ, M.; YÉPEZ C.E.; SÚTIL-NARANJO R.; RINCÓN M. **Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A**. Invest. Clín, Vol. 43, n.3, Maracaibo, 2002.

MARTINEAU, AR; TIMMS, PM; BOTHAMLEY, GH; et al. **High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial**. The Lancet; Vol. 6736(10): 2011.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliar. **Revista de Saúde Pública**. Vol. 34(5): 444-48, 2000.

MORAES, F.P.; COLLA L.M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde.** Revista Eletrônica de Farmácia Vol. 3(2): p.109-122, 2006.

MURRAY, PR; ROSENTHAL, KS; KOBAYASHI, GS; PFALLER, MA. **Microbiologia Médica.** 4ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

MUSZKAT, P.; CAMARGO, M.B.R.; GRIZ, L.M.; LAZARETTI-CASTRO, M. **Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D.** Arq Bras Endocrinol Metab. Vol. 54(2): p.110-7, 2010.

MUSZKAT, P.; CAMARGO, M.B.R.; GRIZ, L.H.M.; LAZARETTI-CASTRO, M. **Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D.** Arq Bras Endocrinol Metab. Vol. 54(2): p.110-7, 2010.

NCCLS - National committee for clinical laboratory standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.* Sixteenth informational supplement. Document M100-S16. NIH, Wayne, PA, 2006.

NCCLS (2008): *Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test: ninth.*

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. **Potential of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes.** Fems microbiol. Lett, v. 179, p. 233–239, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol.** FEMS Microbiology Letters, v. 230, p. 191-195, 2004.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. **Vitaminas lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica.** Quim. Nova, Vol. 27, No. 1, p.96-105, 2004.



PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Z. **Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae)**; Naturforsch, v. 59c, p. 657- 662, 2004.

SAMPAIO L.C.; ALMEIDA, C.F. **Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Câncer do Colo Uterino**. Revista Brasileira de Cancerologia. Vol. 55(3): p.289-296, 2009.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. **4. Biomembranas. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). A Célula 2001**. Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56, 2001.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- universidade Vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. **Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes**. Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

STONE, R.W. **Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide**. Canine Pract. v.18, p.16-19, 1993.

TALEB-CONTINI, S.H.; SALVADOR, M.J.; WATANABE, E.; ITO I.Y.; DIONÉIA, C.R.O. **Atividade antimicrobiana dos flavonóides e esteróides isolados de duas espécies de *Chromolaena***. Rev Bras Ci Farm; 30: 403-408, 2003.

THEVISSSEN, K.; KATHELIJNE, K. A.; FERKET, I.; FRANÇOIS, E. J. A.; CAMMUE, B. P. A. **Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components**. Peptides, 24 (11): 1705-1712, 2003.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. **Microbiologia**, 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. **Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning**. *Biophysical Chemistry*, v. 122, p. 101–113, 2006.

# CONCLUSÕES

---

---

## 6 CONCLUSÕES

- Colecalciferol, Alfa-tocoferol isoladamente não apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica relevante nas concentrações utilizadas, já a menadiona demonstrou atividade antibacteriana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, apresentando concentração inibitória mínima de 64µg/mL.
- As soluções Colecalciferol, Alfa-tocoferol e Menadiona não conseguiram modular o efeito das drogas utilizadas como antifúngico contra fungos do gênero *Candida*.
- Na concentração subinibitória (MIC/8): Menadiona não apresentou potencial modulador, com relevância clínica frente a nenhuma cespia utilizada. Diferentemente, Colecalciferol e alfa-tocoferol que potencializaram a ação dos aminoglicosídeos: amicacina/gentamicina para a *P.aeruginosa* 03, e gentamicina frente a *S. aureus* 358, respectivamente. Ambas diminuíram a eficácia da droga quando associada com neomicina contra a *P.aeruginosa* 03.
- O número de eventos modulatórios de colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona é proporcional ao aumento da concentração da dose subnibitória.
- Foi possível averiguar a similaridade da ação moduladora entre o colesterol, ergosterol e colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona, através do número de eventos modulatórios. Porém entre ambos, o ergosterol se mostrou mais próximo do mecanismo de ação modulador das soluções vitamínicas.
- As soluções de colecalciferol, alfa-tocoferol e menadiona demonstraram resultados clinicamente relevantes, à modulação de aminoglicosídeos, sobre bactérias multiresistentes, principalmente Gram-negativas.
- Este estudo representa uma alternativa interessante contra a crescente resistência bacteriana, uma vez que são vitaminas lipossolúveis estão presente na alimentação, e não apresenta toxicidade ao organismo humano em concentração adequada. Sendo

necessário realizar estudos pré-clínicos e clínicos para verificar a biodisponibilidade e os mecanismos de ação envolvidos na interação.

# REFERÊNCIAS

---

---

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.; MANCHANDA, V.; BHALLA, P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. **Indian Journal of Medical Microbiology**. Vol.29 (2): 172-177, 2011.

ALMEIDA, S.R. **Ciências Farmacêuticas Micologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ANDRADE SS, JONES RN, GALES AC, SADER HS. INCREASING prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J Antimicrob Chemother**; 52:140-141. 2003

ANDRIOLO, A. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. São Paulo: Editora Manole, 2005.

ARGENTA, J.S. **Atividade *in vitro*, individual ou em combinação, de voriconazol, itraconazol e terbinafina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum***. Dissertação 56f. Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do sul – Porto Alegre – RS.

ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H., LEMOS, J.A.; KHRAIS, C.H.A.; COSTA, C.R.; SILVA, M.R.R.; FERNANDES, O.F. LISBOA. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno chomagar *Candida*. **Revista de patologia tropical**. Vol. 34 (1): 37- 42, 2005.

ASSIS, A.C.B.; SANTOS, B.M. Patogenicidade *In vivo* e *in vitro* de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. **Revista Brasileira de Ciências Avícola**. Vol.3(2), 2005.

BANDEIRA, F.; GRIZ, L.; DREYER, P.; EUFRAZINO, C.; BANDEIRA, C.; FREESE E. Vitamin D deficiency: a global perspective. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. Vol.50(4): 640-6, 2006.

BARBEDO, S. L.; SGARBI, B. G. D. DST – **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. Vol.22(1): 22-38, 2010.

BARRAL, Danilo; BARROS, Adna Conceição; ARAÚJO, Roberto Paulo Correia de. Vitamina d: uma abordagem molecular. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, Vol. 7(3): 309-315, 2007.

BARRETT, EJ; BARRETT P. The parathyroid glands and vitamin D. In: Boron F, Boulpaep E, editors. *Medical Physiology*. Philadelphia, PA: Saunders, **Elsevier Science**; p. 1086-101, 2003.

BATISTA, Ellen Cristina da Silva; COSTA, André Gustavo Vasconcelos; PINHEIRO-SANT'ANA Helena Maria. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, Vol. 20(5): 525-535, 2007.

BERG, G.A. Vitamina E: un tema siempre presente, nunca concluído. **Revista Argentina de Cardiología**. Vol. 78(5), 2010.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, Vol. 5(2): 159 -172, 2004.

BOMONO, R.A., SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**, Vol.43: 49-56, 2006.

BONAMICI, D. **Sistema de classificação biofarmacêutica e bioisencões**. Dissertação. 159p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2009.

BOSSCHE, H.V.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** Vol.26: 5-29, 2003.

BRANDÃO, P.A.; COSTA, BARROS, F.G.P.; L. R.; NASCIMENTO, G.A.J. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica**. Vol.26 (1), 2005.



BRESOLIN, B.M.Z.; JULIA, K. D.; SILVA, S.E.F. Pesquisa sobre a bactéria *staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em curitiba/paraná/brasil **Estud. Biolog.**, Vol.27 (59), 2005.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. Cambridge, Vol. 9(7): 327-335, 2001.

CAMARGO, E.R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva Mate)**. Dissertação 87f. Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco - Bragança Paulista – SP, 2010.

CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 20(3): 348-354, 2010.

CARMELI, Y.; Troilley, N.; Eliopoulos, G.M.; Samore, M.H. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol.43: 379-1382, 1999.

CARVALHO, J.C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *monascus* por fermentação em substrato sólido**. Tese 101f. Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2004.

CATANIA, Antonela Siqueira; BARROS, Camila Risso de; FERREIRA, Sandra Roberta G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Vol. 53(5): 550-9, 2009.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis**. Vol. 9(1): 70-6, 2005.

CAVALCANTI, S. *et al.* Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz J Infect Dis**. Vol. 9(1): 56-63, 2005.

CHAGAS, M. H. C.; FLORES, H.; CAMPOS, F.A.C.S; SANTANA, R. A.; LINS, E.C.B. Teratogenia da vitamina A. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**. Recife, Vol. 3(3): 247-252, 2003.

CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEIL, L.A.J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Symp Ser Soc Appl Microbiol**, Vol. 31: 4-15, 2002.

CHORILLI, Marlus; LEONARDI, Gislaine Ricci; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev. Bras. Farm.**, Vol. 88(3), 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; Vol.36: 599-607, 2003.

COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, Vol.54: 328-330, 2008.

COUTINHO, H.D.M.; VASCONCELLOS, A.; LIMA, M.A.; ALMEIDA-FILHO G.G. ALVES, R.R.N. Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855). **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol 9(35), 2009.

COUTINHO, H.D.M; COSTA J.G.M.; LIMA, Edeltrudes O.; FALCÃO-SILVA V.S.; Siqueira-Júnior, J.P. Increasing of the Aminoglicosyde Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine. **Biological Research for Nursing**. Vol. 11(4): 332-335, 2010.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S.

Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol.18(2): 245-248, 2008.

DANTAS, Andréa Tavares; DUARTE, Ângela Luzia Branco Pinto; MARQUES, Cláudia Diniz Lopes. A vitamina D na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico. **Temas de Reumatologia Clínica**. Vol. 10(2): 52-59, 2009.

DAMON, M.; ZHANG, N.Z.; HAYTOWITZ, D.B.; BOOTH, S.L. Pylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. **J Food Comp and An**. Vol. 18: 751-8, 2005.

DAZA, P. R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importância en la toma de decisiones en la práctica diaria. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud**. Vol. 22(3):57-67, 1998.

DEURENBERGER, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A. W.; BRUGGEMAN, C. A.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**. Vol.13: 222-235, 2007.

DIAS, M.; Monteiro, M.S. Antibióticos e Resistência Bacteriana, Velhas Questões, Novos Desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação**, 2010.

DIMENSTEIN, ROBERTO; LIRA, LARISSA; MEDEIROS, ANA C. P.; CUNHA, LAHYANA R. F.; STAMFORD, TÂNIA L. M.. Efeito da suplementação com vitamina E sobre a concentração de alfa-tocoferol no colostro humano. **Rev Panam Salud Publica**. Vol. 29(6), 2011.

DIPERSIO, J.R.. Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003), **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**. Vol. 51(1):1-7, 2005.

DÔRES, S.M.C.; PAIVA, S.A.R.; CAMPANA, Á.O. Vitamina k: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**. Campinas, Vol. 14(3): 207-218, 2001.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A., UTILI, R.; FALAGAS, M. Do we still need the aminoglycosides? **International journal of Antimicrobial Agents**. Vol.33: 201-205, 2009.

FERREIRA, H.; LALA, E.R.P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev Panam Infectol**. Vol. 12(2) :44-50, 2010.

FERREIRA, A.B.L. **Identificação da atividade Antibiótica e relação Estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal** – Dissertação, 110f, Mestrado em Neuroimunologia – Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, 2007.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 17(2): 224-230, 2007.

FORTES, F.B.B. **Perfil bioquímico de amostras de Escherichia coli isoladas de matéria avícola no estado do Rio Grande do sul e sua relação com a patogenicidade**. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2008.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de alimentos**. 4<sup>a</sup> ed. Barueri, São Paulo: Manole. 2011.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**. Vol. 126: 263-277, 2004.

GELATTI, Luciane Cristina; BONAMIGO, Renan Rangel; BECKER, Ana Paula; AZEVEDO Pedro Alves d. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol**. Vol. 84(5): 501-6, 2009.

GOMES, Mirian Martins; SAUNDERS, Cláudia; ACCIOLY, Elizabeth. Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Revista Brasileira Saúde Maternal Infantil**. Recife, Vol. 5 (3): p.275-282, 2005.

GONÇALVES, A.J.R.; MAGALHÃES, A.C.G. **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica: Estafilococcia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GORDON, C.M.; FELDMAN, H.A.; SINCLAIR, L., WILLIAMS, A.L.; KLEINMAN, P.K.; PEREZ-ROSSELLO, J. et al. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy infants and toddlers. **Arch Pediatr Adolesc Med**. Vol.162 (6): 505-12, 2008.

GUINAZI, M., **Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais** [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2004.

HAKOMORI, S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** Vol. 76(3): 553-572, 2004.

HOOPER, D.C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**.. Vol.40: 1811-17, 2005.

HURLEY, R; WINNER, H.I. Pathogenicity in the genus *Candida*, **International Journal of Dermatology**. Vol. 5(3): 151-153, 1966.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**.Vol. 41: 120-26, 2005.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **J Med Chem**, Vol. 39: 3107–3113, 1996.

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact, **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 46(1):120–8, 2008.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KLACK, Karin; CARVALHO, Jozélio Freire de. Vitamina K: Metabolismo, Fontes e Interação com o Anticoagulante Varfarina. **Rev Bras Reumatol**, Vol. 46(6): 398-406, 2006.

KULIE, T.; GROFF, A.; REDMER, J.; HOUNSHELL, J.; SCHRAGER S. Vitamin D: an evidencebased review. **J Am Board Fam Med**. Vol.22 (6): 698-706, 2009.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**, Sarvier: São Paulo, 2002.

LEANÇA, Camila Canteiro; PASSARELLI, Marisa; NAKANDAKARE, Edna R.; QUINTÃO, Eder C. R.. HDL: the yin-yang of cardiovascular disease. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Vol.54(9), 2010.

LEHNINGER, Albert L.; **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier, 2006.

LIGHT, K. Time-critical technology identifies deadly bloodborne pathogens. **Point-of-Care Technologies Research Network**. 2010.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E.R.; FIGUEIREDO, N.F.; GODINHO, P.S.; ABRÃO, R.L. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, Vol.19 (2): 17-27, 2006.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**. Vol. 339: 520-32, 1998.

LUDKE, Maria do Carmo Mohaupt Marques; LÓPEZ, Jorge. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. **Ciência Rural**. Santa Maria, Vol. 29(1): 181-187, 1999.

MACÊDO, D.P.C. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management, **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 39(2):1-7, 2008.

MARTINS, Clélia Aparecida de Paiva; SANTOS, Silvana Soléo Ferreira dos; LOBERTO, Jussara Cia Sanches; KOGA-ITO, Cristiane Yumi; JORGE, Antonio Olavo Cardoso. Presença *candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. **Cienc Odontol Bra**. Vol.5(3), 2002.

MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R. Mandell, Douglas. **Principles and practice of infectious diseases**. 7 ed. Elsevier, 2010.

MARTINEAU, AR; TIMMS, PM; BOTHAMLEY, GH; et al. High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. **The Lancet**; Vol. 6736(10): 2011.

MARCUS, R.; COULSTON, A. M. Vitaminas. In: Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas de la terapéutica**. 10 ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2003. Vol. 2: 1765-1772.

MÁRQUEZ, Mercedes; YÉPEZ Carmen E.; SÚTIL-NARANJO Rosalía; RINCÓN Manuel. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. **Invest. Clín.** Vol. 43(3), Maracaibo, 2002.

MENEZES, A.E. *et al.* Evaluation of the in vitro activity of meropenem against strains of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the city of Fortaleza, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Vol. 40(3): 349-350, 2007.

MIMOUNI, F.B.; SHAMIR, R. Vitamin D requirements in the first year of life. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. Vol.12 (3): 287-92, 2009.

MIN, L.I., YUPING, LAI., AMER, E. V., DAVID, J. C., DANIEL, E. S., MICHAEL, O. Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptidesensing System. **PNAS**, Vol. 104: 9469-74, 2007

MORETTI, P. E.. Projeto Microorganismos: Fungo. Disponível em <[http://www.fam.br/microorganismos/microfun\\_citologia.htm](http://www.fam.br/microorganismos/microfun_citologia.htm)>. Acesso em 01 de abril de 2003, 2003.

MORAES, Fernanda P.; COLLA Luciane M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol. 3(2): p.109-122, 2006.

MOURÃO, D.M., SALES, N.S., COELHO, S.B., SANTANA, H.M.P. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista Nutrição**. Vol. 18: 529-39, 2005.

MURRAY, P.R. ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. Tradução Carlos Pelleschi Taborda et al. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

MUSZKAT, Patricia; CAMARGO, Marilia Brasílio Rodrigues; GRIZ, Luiz Henrique Maciel; LAZARETTI-CASTRO, Marise. Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Vol. 54(2): 110-7, 2010.

NARCISO, Ana; LITO, Luís; CRISTINO, José Melo; DUARTE Aida. *Escherichia coli* Uropatogénica: Resistência aos Antibióticos *Versus* Factores de Virulência. **Acta Urol Jul**; Vol. 27(2): 11-20, 2010.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5<sup>a</sup> ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, Vol. 20(2), 2000.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. Wayne: National **Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2008.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; OOTOOLE, P.W. Potentiation of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **Fems microbiol. Lett**, Vol. 179: 233–239, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 230:191-195, 2004.



NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Vol. 58(1): 77-82, 2007.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 16(1): 77-82. 2006.

ODDS, F.C. *Candida* and candidosis, 2nd edn. London: **Bailliere Tindall**. 1998.

OLSON, R.E. Vitamin K. *In*: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M., ROSS, A.C. Modern nutrition in health and disease. Baltimore. **Williams & Wilkins**, p.363-380 1999.

OLSON, R.E. Osteoporosis and vitamin K intake. **American Journal of Clinic Nutrition**, Bethesda, Vol. 71:1031-1032, 2000.

PAIXÃO, José A. da; STAMFORD, Tânia L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica. **Química Nova**. Vol. 27(1): 96-105, 2004.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 46(8): 2720-2722, 2002.

PIDDOC, Laura J. V. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, Vol.4: 629-636, 2006.

PINSETTA, R.F. **Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco segura para o tratamento da doença de ménière**. Dissertação, 122f. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2010.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell D. Benneths J e Dolin R. Principles and Praticce of Infectious Diseases. **Churchill Livingstone**, New York, 2000.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAIAS, D. E. B.; BELLA CRUZ, A. Z. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (clusiaceae/guttiferae); **Naturforsch**, Vol. 59c: 657- 662, 2004.

QUEIROZ, A.M.P.; FERREIRA, C.E.F. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos de primeira escolha prescritos no tratamento de pneumonias em clinica e UTI pediátrica do Município de campos dos goytacazes , RJ. **Infarma**, Vol. 22, 2010.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S.; NAVES, P.L.F. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab** - edição 64, 2004.

ROMEU-NADAL, M.; MORERA-PONS, S.; CASTELLOTE, A.I.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Determination of  $\gamma$  and  $\alpha$ -tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. **J Chromatogr A**. Vol. 1114(1):132-7, 2006.

ROSSI, T.; LOZOVVOY, M.A.B.; SILVA, R.V.; FERNANDES, E.V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I.C.; SARIDAKIS, H.O.; WATANABE, M.A.E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. Londrina, Vol. 32(1):15-28, 2011.

ROUVEIX, B. Clinical Implications of Multiple Drug Resistance Efflux Pumps of Pathogenic Bacteria. **J Anti Chem**, Vol. 59: 1208-09, 2007.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity. Letters in **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 32: 293-297, 2001.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen, **Journal of Medical Microbiology**, Vol. 41(5): 295-310, 1994.

SANTOS, A. R.; CARVALHO, H. F. **4. Biomembranas**. In: Carvalho, H. F. E. & Recco-Pimentel, S. M. (orgs). *A Célula* 2001. Ed. Manole, Barueri, Brasil, p.39-56, 2001.

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. **J Bras Patol Med Lab**. Vol. 43(6): 413-423, 2007.

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações e extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasilensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- universidade Vale do Itajaí, Itajaí – SC, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SCHREIBER, A.Z. Antifungigrama: Quando Solicitar e Como Interpretar. **Prática Hospitalar – Infectologia**. Ano IX (49), 2007.

SEGATO, F. **Expressão gênica envolvida nos mecanismos de resistência à acriflavina, griseofulvina e terbinafina em fungos filamentosos**. 2008. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2008.

SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 388 p, 2010.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 269: 8022-8028, 1994.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira de farmacognosia**, Vol. 17: 572-577, 2007.

SILVEIRA, G.P. *et al.* Estratégias utilizadas no combate a resistência microbiana, **Química Nova**, Vol. 29(4): 844-855, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

SIERRA, Noralba; ROJAS, Jaime H.; CUADRA, Yvonne; SISA, Andrea; CASTRO Gloria. Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinário. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 43(4), 2007.

SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **Eurosurveillance**, Vol. 13(47), 2008.

SOUSA JR. M.A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, G.C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, edição 63, 2004.

SOUZA, O. C. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency vírus. **Caderno Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, Vol.15(3): 392 -379, 2007.

SRINIVASAN A., DICK J.D., PERL T.M. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. **Clin Microb**, Vol. 48: 430-38, 2002.

SUTTIE, J.W. Vitamin K. *In*: ZIEGLER, E.E., FILER Jr. L.J. Present knowledge in nutrition. Washington. **ILSI Press**, p.137-145, 1996.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 33 (3): 281-301, 2000.

THEVISSSEN, K.; KATHELIJNE, K. A.; FERKET, I.; FRANÇOIS, E. J. A.; CAMMUE, B. P. A. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. **Peptides**, Vol. 24 (11): 1705-1712, 2003.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. **Microbiologia**, 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

TRABULSI, L.R; RACHID, L. **Microbiologia**. 4 ed, São Paulo: Atheneu, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. Staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRAVASSOS, MIRANDA, I.O.; K.C.V. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Infarma**, Vol. 22 (5/6), 2010.

URBINA, JULIO. A Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 311-318, 2009.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C F.; BRANQUINHA, M. Bacteriologia Geral. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2007.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W.: **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. Artmed, 2008.

VOGT, B. Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout. **Nefrology, Dialysis, Transplantation**, Vol. 20(2): 431 – 433, 2005.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. **Os antifúngicos nas infecções por Candida sp**. News Lab. Vol.63: 136-146. 2004.

WAGNER, C.L.; GREER, F.R., and the Section on Breastfeeding and Committee on Nutrition. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children and adolescents. **Pediatrics**. Vol. 122 (5): 1142-52, 2008.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Vol.14 (4), 321-325, 2000.

# ANEXOS

---

---





**7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

**8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

**9. Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

**10. Listagem de sequências Biológicas** (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).
- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

**11. Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	21 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)				fls.

**12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 24 fls.

**13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Crato, 22 de Outubro do 2012

Local e Data

Assinatura e Carimbo

**LISTA DE INVENTORES**

6.1 Nome Completo: Irwin Rose Alencar de Menezes  
6.2 Qualificação: Farmacêutico/Doutora em Química 6.3 CPF: 880.930.854-91  
6.4 Endereço completo: Rua Brigadeiro Leandro Bezerra 196 – centro – Crato - CE  
6.5 CEP: 60100-090  
6.6 Telefone: (88) 8829-7247 6.7 Fax: ( )  
6.8 E-mail: [irwinalencar@yahoo.com.br](mailto:irwinalencar@yahoo.com.br) ou irwin.alencar@urca.br



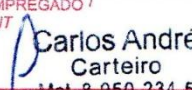
6.1 Nome Completo: Jacqueline Cosmo Andrade  
6.2 Qualificação: Bióloga / especialista 6.3 CPF: 020.529.193-76  
6.4 Endereço completo: Rua Av Valdemiro Paes de Sousa 688, Bairro: Mirandão, Crato, Ceará  
6.5 CEP: 63 100-000  
6.6 Telefone: (88) 8837-9463 / 6.7 Fax: ( )  
6.8 E-mail: [andradejacquelinec@gmail.com](mailto:andradejacquelinec@gmail.com)

6.1 Nome Completo: Saulo Relison Tintino  
6.2 Qualificação: estudante de Biologia 6.3 CPF: 048.092.583-60  
6.4 Endereço completo: Rua Rua Roseira de Lemos 117, Bairro: vila Fátima, Juazeiro do Norte, Ceará  
6.5 CEP: 63 000-000  
6.6 Telefone: (88) 8841-5211 6.7 Fax: ( )  
6.8 E-mail: [saulorelison@gmail.com](mailto:saulorelison@gmail.com)

6.1 Nome Completo: Glaucia Morgana de Melo Guedes  
6.2 Qualificação: Enfermeira 6.3 CPF: 033.382.113-09  
6.4 Endereço completo: Rua presidente kennedy 251, Crato, Ceará  
6.5 CEP: 63 100-000  
6.6 Telefone: (88) 8806-8071 6.7 Fax: ( )  
6.8 E-mail: [glauciademeloguedes@gmail.com](mailto:glauciademeloguedes@gmail.com)

Aviso de recebimento:

<b>CORREIOS BRÉSIL</b>		<b>AVIS CN07</b>	
DATA DE POSTAGEM / DATE DE DÉPÔT		TENTATIVAS DE ENTREGA / TENTATIVES DE LIVRAISON	
UNIDADE DE POSTAGEM / BUREAU DE DÉPÔT		: h : h : h	
PREENCHER COM LETRA DE FÔRMA			
<b>ENDEREÇO PARA DEVOLUÇÃO / RETOUR</b>	NOME OU RAZÃO SOCIAL DO REMETENTE / NOM OU RAISON SOCIALE DE L'EXPÉDITEUR		
	Henrique Douglas Melo Coutinho		
	ENDEREÇO PARA DEVOLUÇÃO / ADRESSE		
	Rua das Acácias, 50		
CIDADE / LOCALITÉ			UF
Crato			CE
			BRASIL
6 3 1 0 7 - 2 7 0			

PREENCHER COM LETRA DE FÔRMA		<b>AR</b>	
<b>DESTINATÁRIO DO OBJETO / DESTINATAIRE</b>			
NOME OU RAZÃO SOCIAL DO DESTINATÁRIO DO OBJETO / NOM OU RAISON SOCIALE DU DESTINATAIRE			CODIGO DVP
Diretoria de Patentes - DIRPA / CGPROP			
ENDEREÇO / ADRESSE			
Praça Mauá, 7 Centro			
CEP / CODE POSTAL	CIDADE / LOCALITÉ	UF	PAÍS / PAYS
20081-240	Rio de Janeiro	RJ	
DECLARAÇÃO DE CONTEÚDO (SUJEITO À VERIFICAÇÃO) / DISCRIMINATION		NATUREZA DO ENVIO / NATURE DE L'ENVOI	
		<input type="checkbox"/> PRIORITÁRIA / PRIORITAIRE <input type="checkbox"/> EMS <input type="checkbox"/> SEGURADO / VALEUR DÉCLARÉ	
ASSINATURA DO RECEBEDOR / SIGNATURE DU RÉCEPTEUR		DATA DE RECEBIMENTO / DATE DE LIVRAISON	CARIMBO DE ENTREGA / UNIDADE DE DESTINO / BUREAU DE DESTINATION
		29/10/12	
NOME LEGÍVEL DO RECEBEDOR / NOM LISIBLE DU RÉCEPTEUR			
CLAUDIVAN MELLO			
Nº DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO DO RECEBEDOR / ÓRGÃO EXPEDIDOR	RUBRICA E MAT. DO EMPREGADO / SIGNATURE DE L'AGENT		
	 Carlos André Carteiro Mat. 8.950.234-5		
ENDEREÇO PARA DEVOLUÇÃO NO VERSO / ADRESSE DE RETOUR DANS LE VERS			

## ANEXO B: PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

### Resumos Publicados em Anais de Congressos

**ANDRADE, J. C.;** Santos, M. B.; Freitas, M.A.; Cunha, F.A.B; Vega.C; COUTINHO, H.D.M. Atividade citotóxica e tripanocida de extratos etenólicos de *Costus arabicus*. In: xx congresso ítalo americano de etnomedicina, 2011. XX Congresso Ítalo Americano de Etnomedicina, 2011.

**ANDRADE, J. C.;** Cunha.F.A.B ; Figueiredo L.N ; Vega.C ; COUTINHO,H.D.M . Atividade antileishmaniana do extrato etanólico de *Costus arabicus*. In: xx congresso ítalo americano de etnomedicina, 2011, fortaleza. XX Congresso Ítalo Americano de Etnomedicina, 2011.

PEREIRA, A. O. B.; SAMPAIO, R. S.; **ANDRADE, J. C.;** Coutinho, Henrique D. M.; KERNTOPF, M. R.; Menezes, Irwin R. A. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidralcoólico das Cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex. Spreng. (Gonçalavo). In: III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos, III Conferência do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Frutos Tropicais, 2012, Aracaju. III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos, III Conferência do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Frutos Tropicais, 2012.

BRITO, D. I. V.; GUEDES,G.M.M; **ANDRADE, J. C.;** MORAIS-BRAGA, M.F.B; SOUZA,C.E.S; FREITAS, M. A.; TINTINO, S.R. Atividade Tripanocida e Citotóxica da Fração acetato de Etila de Folhas de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) taub.. In: IV Simpósio nacional de Produtos Naturais, 2012, João Pessoa. IV Simpósio nacional de Produtos Naturais, 2012.

MELO, I. R. S., TEIXEIRA, A. M. R., **ANDRADE, J. C.,** OLIVEIRA, M. T. A., COUTINHO, H. D. M, SILVA, J. H., FREIRE, P. T. C., BENTO, R. R. F, TOLEDO, T. A., SILVA, L. E. Modulation of aminoglycoside antibiotic activity of schiff base n,n-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine. In: XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos – SP.

SAMPAIO, G. M. M., MELO, I. R. S., TEIXEIRA, A. M. R., **ANDRADE, J. C.**, SILVA, L. E., GUSMÃO, G. O. M., FREIRE, P. T. C., BENTO, R. R. F. Atividade antimicrobiana e moduladora “in vitro” da base schiff (4e)-4-(4etoxibenzilidenoamino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona. In: XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos – SP.

### **Artigos Publicados**

HENRIQUE D.M. COUTINHO, EDINARDO F.F. MATIAS, KARLA K.A. SANTOS, FRANCISCO A.V. SANTOS, MARIA FLAVIANA B. MORAIS-BRAGA, TEÓGENES M. SOUZA, **JACQUELINE COSMO ANDRADE**, CELESTINA E.S. SOUZA, SAULO R. TINTINO, GLÁUCIA M.M. GUEDES, VIVYANNE S. FALCÃO-SILVA, JOSÉ P. SIQUEIRA-JÚNIOR, JOSÉ G.M. COSTA. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. *Biomédica* 2011, 31: 608-612.

SANTOS, ISRAEL J.M.; MATIAS, EDINARDO F.F.; SANTOS, KARLA K.A.; BRAGA, MARIA F.B.M.; **ANDRADE, JACQUELINE C.**; SOUZA, TEÓGENES M.; SANTOS, FRANCISCO A.V.; SOUSA, ANA CARLA A.; COSTA, JOSÉ G.M.; MENEZES, IRWIN R.A.; ALVES, RÔMULO R.N.; ALMEIDA, WALTECIO O.; COUTINHO, HENRIQUE D.M.. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) Used by the Traditional Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

MORAIS-BRAGA,M.F.B ; Souza, Teógenes M. ; SANTOS, K. K. A.; **Jacqueline C. Andrade** ; GUEDES,G.M.M ; TINTINO,S.R ; SOUZA,C.E.S ; COSTA, J. G. M. ; Menezes, Irwin R. A. ; SARAIVA, A.A.F ; COUTINHO,H.D.M . Antimicrobial and Modulatory Activity of Ethanol Extract of the Leaves from *Lygodium venustum* SW. *American Fern Journal JCR*, v. 102, p. 154-160, 2012.

MORAIS-BRAGA,M.F.B; Souza, Teógenes M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES,G.M.M; **ANDRADE, J. C.** ; TINTINO,S.R; SOUZA,C.E.S; COSTA, J. G. M.; SARAIVA, A.A.F; Coutinho, Henrique D. M. Phenolic Compounds and interaction between aminoglycosides

and natural products of *Lygodium venustum* SW. against multiresistant bacteria. *Chemotherapy (Basel)* **JCR**, 2013.

MORAIS-BRAGA,M.F.B; Souza, Teógenes M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES,G.M.M; **ANDRADE, J. C.** ; TINTINO,S.R ; COSTA, J. G. M. ; Menezes, Irwin R. A. ; SARAIVA, A.A.F ; COUTINHO,H.D.M . ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E MODULADORA DE FRAÇÕES OBTIDAS DE *Lygodium venustum*.. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **JCR**, 2013.

### **Artigos Aceitos para Publicação**

Henrique Douglas Melo Coutinho, Ivaneide da Silva, Maria Audilene Freitas, Cícera Natália Figueirêdo Leite Gondim, **Jacqueline Cosmo Andrade**. ANÁLISE FÍSICO- QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO FRUTO CAMBUÍ (*Myrcia multiflora*). *BIOFAR*, 2013.