



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**DETECÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM EXTRATOS
VEGETAIS E UM ISOLADO DE *Maytenus* sp E SUA AÇÃO SINÉRGICA COM UM
ANTIBIÓTICO AMINOGLICOSÍDICO**

ARIANE COELHO FERRAZ

OURO BRANCO – MG

2015

ARIANE COELHO FERRAZ

**DETECÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM EXTRATOS
VEGETAIS E UM ISOLADO DE *Maytenus* sp E SUA AÇÃO SINÉRGICA COM UM
ANTIBIÓTICO AMINOGLICOSÍDICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São João Del-Rei como
exigência parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Dsc. José Carlos de Magalhães.

OURO BRANCO – MG

2015

SUMÁRIO

1. RESUMO	3
2. INTRODUÇÃO	4
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Importância da bioprospecção de extratos vegetais quanto a seu potencial medicinal	6
3.2 A espécie <i>Maytenus</i> sp (Celastraceae)	7
3.3 Histórico das principais espécies bacterianas estudadas	10
3.4 Uso de terapia combinada	11
3.5 Fundamento sobre o mecanismo do ensaio colorimétrico com MTT	13
4. JUSTIFICATIVA	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo Geral	14
5.2 Objetivos Específicos	15
6. DESENVOLVIMENTO DO PROJETO	15
6.1 METODOLOGIA	15
6.1.1 – Compostos derivados de <i>Maytenus</i> sp	15
6.1.2 – Bactérias de Estudo	16
6.1.3 – Confirmação da identidade bacteriana por testes bioquímicos	16
6.1.4 – Ensaios de Atividade Antibacteriana	17
6.1.4.1) Análise por Difusão em Ágar	17
6.1.4.2) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	18
6.1.4.3) Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	19
6.1.4.4) Teste do Sinergismo pelo Método <i>Checkerboard</i>	19
6.1.4.5) Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)	20
6.1.5 – Ensaio de Citotoxicidade	21
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6.2.1 – Resultados dos testes bioquímicos	21
6.2.2 – Triagem dos compostos	23
6.2.3 – Análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
6.2.4 – Análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	28
6.2.5 – Pesquisa do Sinergismo entre Extrato Etanólico (MIE) e Amicacina	29
6.2.6 – Resultado do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)	31
6.2.7 – Análise do efeito citotóxico	31
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é cada vez mais relatada, principalmente em ambientes hospitalares. Entre outros fatores, a administração inadequada de antibióticos pode aumentar as estirpes resistentes e/ou multirresistentes no ambiente, a exemplo da cepa *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Relatos mostram atividade biológica em compostos de membros da Família Celastraceae, sendo muitos dos metabólitos isolados de espécies do Gênero Maytenus. Assim, foi feita prospecção da ação antibacteriana em extratos de uma espécie desse gênero contra 13 espécies bacterianas, entre elas *Klebsiella* sp. Solventes de diferentes polaridades foram utilizados na extração, e o sedimento reconstituído em dimetilsulfóxido (DMSO). O extrato etanólico (MIE) mostrou-se ativo contra nove das 13 bactérias investigadas. Curiosamente, o MIE foi eficaz contra *K. pneumoniae* e não afetou *K. oxytoca*, como são espécies estreitamente relacionadas, isso mostra que aparentemente sua ação não é aleatória. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e/ou amicacina contra *K. pneumoniae* foi feita utilizando-se microtécnica em placas de 96 poços, onde o veículo foi usado como controle negativo (DMSO), sendo os antimicrobianos diluídos em série 2x e o inóculo bacteriano ajustado a $1,5 \times 10^6$ células mL⁻¹ na escala de McFarland. Após 24 horas de incubação a 37°C, a revelação foi feita utilizando-se o ensaio colorimétrico com metil-tiazol-tetrazólio (MTT). A CIM obtida na condição de apenas extrato foi de 31,25 µg mL⁻¹ para o MIE. Considerando-se que algumas cepas desse grupo de bactérias possuem resistência a múltiplos antibióticos, devido à presença da enzima carbapenemase e, além disso, possuem indefinição quanto à resistência ao antibiótico amicacina, a abordagem seguinte investigou o efeito sinérgico (extrato MIE + amicacina) pelo método *checkerboard*, sendo demonstrado um índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) em torno de 0,37 [$0 < \text{ICIF} < 0,5$], índice que indicou provável interação sinérgica das duas substâncias, e culminou numa redução de até 8 vezes na concentração inibitória, tanto do antibiótico quanto do extrato. Estudos de citotoxicidade, utilizando-se células de mamífero, mostraram que somente concentrações de MIE a partir de 62,5 µg mL⁻¹ são tóxicas a 50% das células BHK-21. Sendo assim, o extrato etanólico de *Maytenus* sp., ou algum de seus compostos, pode representar economia e ser uma alternativa no tratamento de doenças causadas por *K. pneumoniae* e outras bactérias.

2. INTRODUÇÃO

Práticas medicinais utilizando-se de plantas eram muito empregadas por nossos ancestrais há milhares de anos como forma de tratamento, cura e prevenção de doenças; os efeitos benéficos destas eram difundidos de geração em geração. Em 2010, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento utilizavam plantas para fins terapêuticos. Desde então, o órgão valoriza a necessidade de se empregar plantas medicinais no setor sanitário e de saúde básica (SOUZA *et al.*, 2013; VEIGA *et al.*, 2005).

As plantas são fontes ricas em moléculas funcionais, substâncias biologicamente ativas que são tóxicas para muitos microrganismos, sendo que seus metabólitos secundários, do mecanismo de defesa contra patógenos, podem ser utilizados como modelo para síntese química de novos fármacos e como uma nova fonte fitoterápica (RATES, 2001; PADUA *et al.*, 2013). Por esse motivo, têm sido alvo de diversas pesquisas no Brasil e no mundo. Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*), entre as décadas de 1980 a 2006, metade das drogas que aprovaram, direta ou indiretamente, eram provenientes de produtos naturais, sendo que dentre os anticancerígenos a proporção chegava a mais de 60% (DUARTE, 2006; CRAGG & NEWMAN, 2009).

Sabe-se que o otimismo gerado pela descoberta dos antibióticos foi logo atenuado com a descoberta de novas estirpes bacterianas resistentes a essa terapia. Bactérias caracterizadas pela resistência não só a um único, mas a múltiplos antibióticos são as que mais ameaçam a saúde pública global. Essa resistência adquirida por microrganismos patogênicos, não apenas bactérias como também fungos e vírus, a medicamentos se deve à inadequada administração de antimicrobianos por um longo período e está originando um crescente problema terapêutico (LEVY & MARSHALL, 2004). Acredita-se que a resistência aos antibióticos se tornou o principal problema de saúde mundial, pois além das drogas atuais perderem a eficiência, o problema não é endêmico de uma região específica do planeta (SANTOS, 2004).

Com o desenvolvimento dos organismos multirresistentes, é normal na terapêutica clínica se utilizarem combinações de drogas com diferentes mecanismos de ação, numa busca de evitar o aumento da resistência aos medicamentos, além de melhorar o resultado do tratamento, uma vez que a atividade sinérgica

expande o espectro antimicrobiano e minimiza a toxicidade (KUMAR *et al.*, 2012). Sendo o sinergismo uma interação positiva obtida pela associação de duas ou mais substâncias antimicrobianas, cujo efeito inibitório é maior que a soma dos efeitos individuais. No antagonismo, a combinação resulta em um efeito menor que aquele obtido quando o composto é administrado sozinho, normalmente pela competição destes pelo mesmo sítio ativo. Já a indiferença ocorre se a associação proporciona um efeito igual ao de qualquer uma das substâncias separadas (SECOLI, 2001).

Nesse contexto, destaca-se a espécie em estudo, *Maytenus* sp (Família Celastraceae), um arbusto endêmico de campos rupestres encontrado em regiões de Minas Gerais e Bahia, Brasil. Os membros desse gênero são usados na medicina popular como antisséptico, antiasmático, antitumor, antivirais, anti-inflamatórios e alguns estudos com extratos dessa planta apontaram potencial poder antioxidante. Algumas espécies são conhecidas como Espinheira Santa (SILVA *et al.*, 2009).

Dentre as bactérias estudadas, destacam-se as do gênero *Klebsiella* (Família Enterobacteriaceae), bacilos Gram negativos, encontradas principalmente em solo, água e plantas. A bactéria *K. pneumoniae* é de grande importância médica, uma vez que é resistente aos agentes β -lactâmicos, abrangendo também os carbapenêmicos – classe de antimicrobianos relevante no tratamento de infecções causadas por bactérias que possuem multiresistência (SOARES, 2012). Sua resistência é conferida por um de seus produtos gênicos, um emergente mecanismo enzimático, que produz a enzima carbapenemase (KPC), responsável por degradar os anéis carbapenêmicos e capaz de torná-la resistente a 95% dos antibióticos existentes no mercado farmacêutico, podendo levar indivíduos afetados a óbito. A espécie *K. oxytoca* também é um importante agente patogênico, sendo atribuída a infecções urinárias e septicemias (NORDMANN *et al.*, 2009; MOREIRA & FREIRE, 2011).

Dessa forma, o presente trabalho almejou avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos de *Maytenus* sp frente a um grupo de bactérias Gram negativas e positivas.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância da bioprospecção de extratos vegetais quanto a seu potencial medicinal

As infecções hospitalares são consideradas um grave problema de saúde pública e, infelizmente, comumente relatadas em hospitais de todo o mundo – sendo definida como qualquer infecção contraída e associada com a internação ou procedimentos hospitalares (ANVISA, 2004). Um dos principais agravantes é decorrente do hospital ser um ambiente muito favorável ao surgimento de cepas resistentes, dado que há o emprego contínuo, às vezes até indiscriminado, de antibióticos para o tratamento de diferentes enfermidades. Inúmeros são os transtornos causados por essas infecções, sobretudo para os pacientes, devido ao alto legado de morte e morbidade (FRANCISCO, 2009).

Geralmente são as bactérias as grandes causadoras das infecções hospitalares e a resistência aos antibióticos adquirida pela grande maioria é inevitável, uma vez que a seleção natural é fenômeno que incide a qualquer população. Entretanto, em bactérias o mesmo é mais evidenciado devido à alta taxa de reprodução e mutação desses microrganismos (SANTOS, 2004). Além disso, a disseminação dos genes de resistência, na grande maioria dos casos promovida pelo processo de conjugação, no qual um plasmídeo de resistência é transferido para outra bactéria, tem mostrado maior velocidade que a capacidade biotecnológica em determinar novos agentes antimicrobianos que sejam capazes de desviar dos mecanismos de resistência (BECHTLUFFT *et al.*, 2009).

Frente a esse problema, as plantas se tornaram um grande alvo de estudos devido às suas diversas propriedades funcionais. Os pesquisadores do segmento de produtos naturais sempre destacam a enorme variedade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas que os compostos encontrados na natureza apresentam. Apesar de muitas pesquisas já terem sido realizadas, estima-se que apenas uma pequena porcentagem das plantas tenha sido estudada quanto a seu potencial medicinal (DUARTE, 2006).

De acordo com Calixto (2000), somente 10% da biodiversidade vegetal do planeta foram pesquisados, mas apesar disso, já foram isolados e caracterizados em plantas cerca de 140 mil metabólitos secundários. Vale ressaltar também que, em se

tratando da terapêutica moderna, cerca de 25% dos medicamentos disponíveis no momento são provenientes de plantas (CALIXTO, 2000).

Neste ano de 2015, o prêmio Nobel de Medicina foi destinado às pesquisas de produtos naturais e medicamentos planejados para tratar doenças negligenciadas. Este acontecimento é de grande incentivo aos pesquisadores brasileiros que investigam, na preciosa biodiversidade do Brasil, produtos naturais que podem ser fonte de novos fármacos e outros bioprodutos, tanto na farmacologia quanto na medicina (BOLZANI, 2015). Um importante exemplo é a artemisinina, obtida pela extração com éter de petróleo das folhas e flores de *Artemisia annua* – um arbusto natural da China e Vietnã, onde o princípio ativo foi identificado e, hoje, é recomendado pela Organização Mundial da Saúde para tratamento da febre malárica (TARANTO *et al.*, 2006).

Acredita-se que todas as preparações medicinais tenham se originado de cautelosas experimentações ao longo dos séculos, por tentativas e erros. Hoje, extratos vegetais, microrganismos e vertebrados ainda são valorosas fontes para descoberta de novos fármacos, alguns muito utilizados na clínica médica como a emetina (antiamebiana – obtida de *Psychotria ipecacuanha*), vincristina e vimblastina (antineoplásicos – obtidas de *Catharanthus roseus*). Além disso, contribuem com diversos produtos no setor de cosméticos e indústria de higiene pessoal (TRINDADE, 2013).

3.2 A espécie *Maytenus* sp (Celastraceae)

A Família de plantas Celastraceae é constituída principalmente de ervas de caules lenhosos, arbustos ou árvores, sendo composta por 98 gêneros que abrangem 1264 espécies, encontradas especialmente em regiões tropicais (BRUNING & HILDERBERT, 1978). A literatura mostra que vários compostos orgânicos isolados de membros da Família Celastraceae apresentam atividade biológica, sendo os triterpenos pentacíclicos (TTPCs) os principais compostos encontrados. Já foram encontrados triterpenos das séries friedelano, oleanano, ursano, lupano, taraxerano e outros (RODRIGUES, 2012). Dentre esses triterpenos, destacam-se os quinonametídeos, marcadores químicos que apresentam potente atividade citotóxica e antimicrobiana, além de funcionarem como antioxidante

(SILVA, 1990). No Brasil, os gêneros mais representativos dessa família são: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhofera* Mart. e *Salacia* Mart. (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O gênero *Maytenus* possui um destaque especial na história da medicina tradicional. Com cerca de 80 espécies no Brasil, o mesmo é considerado um dos maiores da família Celastraceae (CARVALHO-OKANO, 2005). Muitos metabólitos bioativos já foram isolados dessa espécie, tais como maitenosídeos com atividade inseticida (SALAZAR, 1993), alcalóides piridínicos, sesquiterpênicos com ação fagorrepulssiva e imunodepressora, poliésteres sesquiterpênicos com atividade promotora-antitumoral, triterpenos quinonóides e triterpenos diméricos que apresentam ação antimicrobiana (DUARTE, 2000), flavonóides e taninos (DE SOUZA *et al.*, 2008).

As espécies *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* constituem exemplos do gênero que são amplamente utilizadas na medicina popular brasileira. São ingeridas na forma de infusão aquosa para o tratamento de úlceras e outras afecções intestinais. Também são utilizadas rotineiramente como bebida, em substituição ao chá verde. Ainda, segundo Velloso e colaboradores (2006), *M. ilicifolia* possui potencial no tratamento do câncer e poder antioxidante. Em várias regiões do Brasil são encontrados locais onde folhas dessas plantas, íntegras, verdes ou secas, ou mesmo na forma de cápsulas contendo o pó de folhas secas são comercializadas. Assim como *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*, outras espécies de *Maytenus* são popularmente conhecidas como Espinheira Santa (LEITE *et al.*, 2001).

A espécie pertencente ao gênero *Maytenus*, que foi objeto desse estudo, é um subarbusto com porte até 0,50 m ou arbusto de aproximadamente 1,20 m de altura, sendo encontrada no cerrado brasileiro, principalmente em Minas Gerais e Bahia (RODRIGUES, 2011). Pela figura 1 é possível observar as características da espécie em questão.



Figura 1: Fotos do arbusto *Maytenus* sp, também conhecido popularmente como Espinheira Santa, onde (a) apresenta o crescimento desta em touceiras, (b) as folhas, (c) frutos e (d) flor dessa espécie vegetal (Fonte: Acervo do Grupo de estudos em plantas medicinais (Neplam)/UFMG).

Os colaboradores do Núcleo de Estudos e Pesquisa com Plantas Medicinais da UFMG realizaram um estudo fitoquímico com galhos, caules e folhas da espécie em estudo, isolando substâncias químicas, apresentadas na tabela 1. Algumas substâncias mostraram atividade antioxidante ou herbicida como a epicatequina e o ácido 3,4-secofriedelan-3-óico, respectivamente. Embora os métodos elucidados façam parte do estudo de atividade biológica da planta, não foi realizado nenhum ensaio antimicrobiano (SILVA, 2009).

Tabela 1 – Principais substâncias isoladas de diferentes partes de *Maytenus sp.*

Constituinte	Parte da planta		
	Folha	Caule e galho	Raiz
Friedelina	*		
30-Hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona	*	*	*
3 α ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno	*		*
Ácido 3,4-secofriedelan-3-óico	*		
Epicatequina	*		
Dulcitol	*		

Fonte: SILVA, 2009

Estudos antimicrobianos com substâncias isoladas e extratos de raízes de *Maytenus imbricata* foram relatados por Rodrigues (2011), contra a levedura *Candida albicans* e bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Em geral, as amostras avaliadas apresentaram uma alta atividade antibacteriana e antifúngica (RODRIGUES, 2011).

3.3 Histórico das principais espécies bacterianas estudadas

A Família Enterobacteriaceae engloba um enorme e distinto grupo de bactérias Gram negativas, constituída de 48 gêneros e centenas de espécies, sendo uma das famílias com maior número de espécies patogênicas, mas também com muitos indivíduos que são comuns à microbiota intestinal de animais, como é o caso da *Escherichia coli*. Dentre os gêneros, destacam-se *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Hafnia* (ROLLINS & JOSEPH, 2000).

As bactérias do gênero *Klebsiella* são patogênicas e frequentemente relacionadas a infecções nosocomiais, compreendendo cinco espécies, encontradas em quase todos os ambientes naturais, como solo, água e plantas (SANTOS, 2007).

A *K. pneumoniae* quando crescida em ágar forma colônias características, onde é possível observar sua consistência mucóide, responsável por protegê-la de ação bactericida no soro e também por auxiliá-la na aderência; em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), ela é responsável por 14% das bacteremias primárias,

10% das infecções da corrente sanguínea, 29% dos casos de sepse, 45% das infecções de feridas e 28% de todas as pneumonias (SANTOS, 2007).

A espécie *K. oxytoca*, assim como *E. coli*, também faz parte da microbiota intestinal de animais, entretanto essa é uma bactéria oportunista que coloniza o trato urinário de pessoas que estejam com sistema imune comprometido; em casos graves de colonização do trato urinário por *K. oxytoca* a infecção pode chegar aos rins, acarretando até falência dos mesmo caso não seja tratada (HÖGENAUER *et al.*, 2006).

A enzima carbapenemase (KPC) é codificada por plasmídeos, principalmente encontrados em *Klebsiella pneumoniae*, mas já foram relatados em outras espécies dessa família. Identificada pela primeira vez em 1996, na Carolina do Norte (USA), sua presença confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas e cefalosporinas, sendo os primeiros, a classe de antibióticos mais utilizada em infecções envolvendo Enterobacteriaceae multirresistentes. Existem vários mecanismos de resistência, contudo a resistência aos carbapenêmicos ocorre eventualmente por meio da combinação da impermeabilidade da membrana com β -lactamases cromossômicas (AmpC) ou de amplo espectro (ESBL), conferindo alarmante mecanismo de resistência no contexto hospitalar mundial (OLIVEIRA *et al.*, 2009; NORDMANN *et al.*, 2009).

Já foram caracterizadas por meio de estudos moleculares quatro diferentes tipos de KPC, KPC-1 isolada de *K. pneumoniae*; KPC-2 de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter* sp.; KPC-3 de *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. A KPC-4 foi isolada de *Enterobacter* sp em 2003-2004 de um paciente na Inglaterra, mostrando que desde a primeira identificação, em 1996, o plasmídeo de resistência se disseminou rapidamente pelo planeta (YIGIT, 2003; DIENSTMANN *et al.*, 2010;). Um estudo feito entre 2009 e 2011 no Hospital Júlia Kubitschek (HJK), em Belo Horizonte, identificou o surgimento de cepas produtoras de KPC em oito pacientes distintos (SOARES, 2012).

3.4 Uso de terapia combinada

Com o aumento cada vez maior de cepas resistentes aos antibióticos, tornou-se comum na prática clínica aliar dois ou mais antibióticos que possuem

mecanismos de ação diferentes, com a finalidade de se prevenir o desenvolvimento de resistência e também melhorar o resultado do tratamento, uma vez que o espectro do antimicrobiano está sendo ampliado. Além disso, a terapia combinada pode ser utilizada para minimizar os efeitos de toxicidade do fármaco, caso a combinação resulte em uma atividade antimicrobiana sinérgica (SWEENEY & ZURENKO, 2003).

O sinergismo tem sido definido como um fenômeno em que dois compostos diferentes são combinados para aumentar a sua atividade individual. A técnica mais empregada e simples para determinação *in vitro* de efeito sinérgico é o método de checkerboard, no qual dois agentes antimicrobianos são associados e avaliados em diferentes concentrações, abaixo e acima da concentração inibitória mínima (CIM) para o microrganismo teste. Sendo que este método utiliza o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) para demonstrar quantitativamente qual efeito causado pela combinação e qual a menor concentração de cada droga capaz de inibir o crescimento microbiano (ODDS, 2003; ARGENTA, 2008).

No presente estudo, foi feita a associação do extrato de uma espécie do gênero *Maytenus* (nome específico omitido por questões de interesse comercial) com um potente antibiótico aminoglicosídeo, a Amicacina, para avaliar possível interação sinérgica contra um microrganismo específico. Os aminoglicosídeos, em geral, são empregados no tratamento de septicemias, endocardites, infecções no trato urinário, respiratórias, oculares, intra-abdominais e meningite em recém nascidos, sendo eficazes contra bacilos e cocos Gram negativos, como *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (ANVISA, 2007).

O mecanismo de ação dos antibióticos aminoglicosídeos ocorre por meio da inibição da síntese proteica, esses se ligam irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, prejudicando a integridade da membrana celular procariota. Três tipos de mecanismo de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos são conhecidos, sendo eles a alteração do sítio de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade ou modificação enzimática do antimicrobiano. Essa resistência pode ser conferida por genes associados a plasmídeos conjugativos e não conjugativos, além de transposons (ANVISA, 2007; ARBEX *et al.*, 2010).

Amicacina é um composto semissintético derivado da Canamicina, sendo o antibiótico de maior espectro de ação do grupo, e indicada apenas no tratamento

grave de infecções causadas por bactérias Gram negativas, uma vez que apresenta efeitos nefrotóxicos por se acumular nos túbulos renais em pacientes submetidos a mais de uma dose diária e em tratamento de longa duração. Com eficácia comprovada por estudos clínicos em infecções respiratórias, no trato urinário e até no sistema nervoso central, onde se inclui a meningite. Não é recomendada para casos iniciais e não complicados de infecção, podendo ser utilizado um antimicrobiano menos tóxico. A amicacina possui também um maior valor agregado, chegando a ser 25 vezes mais cara que a usual Penicilina (ARBEX *et al.*, 2010).

3.5 Fundamento sobre o mecanismo do ensaio colorimétrico com MTT

Neste trabalho, os resultados dos ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), dos ensaios de sinergismo pelo método de *checkerboard* e dos ensaios de citotoxicidade para os extratos de *Maytenus* sp foram obtidos em todos os casos após revelação da microplaca de 96 poços pelo ensaio colorimétrico com metil-tiazol-tetrazólio (MTT). Por isso, faz-se necessário ressaltar o mecanismo de ação deste método de coloração.

O MTT é um sal tetrazólio amarelo que apresenta coloração púrpura apenas quando é metabolizado, ou seja, somente ocorrerá alteração de cor se houver células viáveis no meio de cultura para realizar a redução do sal. O sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, pertencente à cadeia respiratória mitocondrial, é o responsável por reduzir o MTT a um cristal de formazan. A redução do composto é dada pela abertura do anel central, promovida por uma quebra de ligação simples. Células procarióticas também são capazes de metabolizar o sal tetrazólio, por um sistema enzimático análogo (MOSMANN, 1983). A figura 2 mostra a estrutura, antes e após a redução, deste sal.

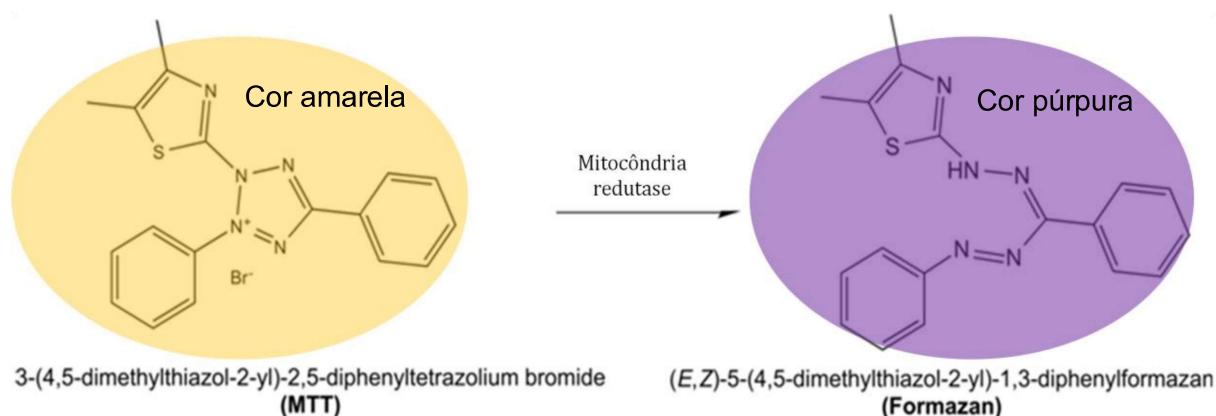


Figura 2: Mecanismo de redução do sal metil-tiazol-tetrazólio (MTT) a farmazan, por ação enzimática na mitocôndria (Adaptado de MOSMANN, 1983).

4. JUSTIFICATIVA

Diante da grande diversidade de compostos químicos isolados de membros da Família Celastraceae e também dos diferentes tipos de atividades biológicas que foram atribuídas a uma espécie do gênero *Maytenus*, pertencente a esta família, o trabalho buscou avaliar a atividade biológica de diferentes extratos desta planta contra um grupo bactérias patogênicas Gram negativas e positivas. Dentre as bactérias estudadas, destacam-se a *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, causadoras de infecções hospitalares e muito importantes quando se refere ao estudo do desenvolvimento de resistência a antibióticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e um isolado de *Maytenus* sp (Família Celastraceae) contra diferentes microrganismos.

5.2 Objetivos Específicos

- Fazer uma triagem qualitativa quanto ao efeito antibacteriano de extratos de *Maytenus* sp contra diferentes bactérias Gram negativas e Gram positivas pelo método de difusão em ágar;
- Analisar, quantitativamente, o efeito dos extratos pelo método de diluição em caldo, investigando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às bactérias;
- Avaliar o efeito antimicrobiano quanto à sensibilidade das bactérias, definindo a concentração bactericida ou bacteriostática de cada extrato frente às bactérias objeto do estudo.
- Investigar o efeito de sinergismo com o antibiótico amicacina, pelo método *checkerboard*, para os extratos que apresentarem atividade antibacteriana promissora;
- Obter o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) a partir dos valores encontrados de CIM isolado e CIM combinado;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos em células de mamífero BHK-21 para determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀).

6. DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

6.1 METODOLOGIA

6.1.1 – Compostos derivados de *Maytenus* sp

Os extratos foram desenvolvidos pelo grupo de colaboração científica do Prof. Sidney Augusto Vieira Filho, o qual, juntamente com professores do ICEx/UFMG fazem parte do Neplam (Núcleo de estudos e pesquisa com plantas medicinais). Esses foram extraídos de folhas de *Maytenus* sp em quatro diferentes solventes (etanol, clorofórmio, acetato de etila e hexano) e o *pellet* reconstituído em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma solução de 100 mg mL⁻¹ para cada extrato.

6.1.2 – Bactérias de Estudo

As bactérias utilizadas são procedentes da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterobacter cloacae* (ATCC CC6), *Escherichia coli* (ATCC 25723), *Enterococcus faecalis* (ATCC perdido), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 0182), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC perdido), *Streptococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Streptococcus saprophyticus* (ATCC 15305) e foram gentilmente cedidas pela Prof^a Jaqueline Ferreira, Campus CCO/UFSJ. Para que todos os testes pudessem ser realizados, as bactérias foram reativadas em ágar Luria Bertani (LB), pois estavam congeladas a -20°C e, posteriormente, crescidas em meio LB líquido.

6.1.3 – Confirmação da identidade bacteriana por testes bioquímicos

Mesmo tendo conhecimento que as culturas utilizadas eram puras e procedentes da ATCC, antes de todos os ensaios foram realizados testes bioquímicos para confirmação da identidade das bactérias.

O teste do indol foi um dos métodos aplicados, o qual avalia a capacidade do microrganismo metabolizar triptofano, produzindo indol, ácido pirúvico e amônia. O indol é então detectado pela adição do Reativo de Kovacs, onde a formação de um anel vermelho na superfície do meio indica uma reação positiva, caso haja apenas um anel de coloração amarelada a bactéria é classificada como indol negativo (ANVISA, módulo 3).

O teste do citrato também foi realizado, com o intuito de se determinar a capacidade das bactérias em utilizar o citrato como única fonte de carbono. Quando este é metabolizado, CO₂ é liberado e combina-se com sódio presente no meio formando carbonato de sódio (Na₂CO₃), um produto alcalino que irá aumentar o pH da solução, promovendo alteração na coloração, devido a presença do indicador azul de bromotimol, de verde (teste negativo) para azul (teste positivo) (ANVISA, módulo 3).

Outro teste empregado foi o da catalase, no qual a enzima catalase presente em algumas bactérias é responsável por converter peróxido de hidrogênio em

oxigênio e água, sendo a liberação de oxigênio facilmente observada com as bolhas formadas (teste positivo), como exemplifica a figura 3 (ANVISA, módulo 4).

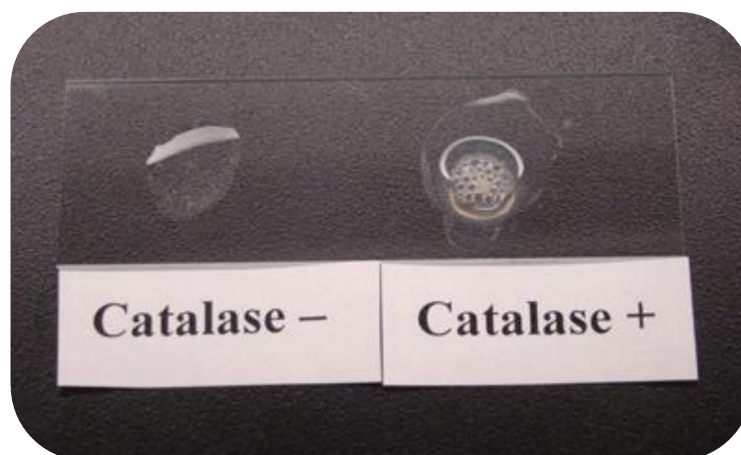


Figura 3: Exemplo de resultados positivo e negativo para o teste da catalase. A bactéria é classificada como catalase negativa quando não se observa a formação de bolhas após adição do peróxido de hidrogênio, e como catalase positiva quando a presença de bolhas pode ser detectada (CDC, 2014).

Ainda, fez-se o teste do vermelho de metila (VM) e de Voges-Proskauer (VP). O primeiro baseia-se no fato de que algumas bactérias conseguem fermentar glicose com produção de ácido fórmico, acético, láctico, entre outros, e como esses são capazes de reduzir o pH do meio quando produzidos, a adição do indicador vermelho de metila pode evidenciar esse fato, sendo o resultado positivo para coloração vermelha e negativo para coloração amarela. Já o teste de Voges-Proskauer é baseado na ocorrência de algumas bactérias realizarem fermentação butilenoglicólica, produzindo acetoína pela fermentação de glicose; a acetoína é convertida em diacetil quando se adiciona KOH e pode ser detectada pela adição de α -naftol, caso o resultado apresente um anel vermelho o teste é dito positivo, caso contrário a bactéria é classificada como VP negativo (ANVISA, módulo 3).

6.1.4 – Ensaios de Atividade Antibacteriana

6.1.4.1) Análise por Difusão em Ágar

Com o propósito de se conhecer o efeito dos diferentes extratos, foi feita uma triagem qualitativa inicial, caracterizada pela análise por difusão em ágar, antes da

análise da concentração inibitória mínima por diluição em meio líquido por microtécnica. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada de acordo com a metodologia de difusão em disco descrita por Bauer e colaboradores (1966), na qual colônias microbianas crescidas em ágar LB por 24 horas foram transferidas para solução PBS 1x, de forma que a turbidez correspondesse a 0,5 na escala de McFarland, sendo o equivalente a $1,5 \times 10^8$ células mL^{-1} . Em seguida, foram inoculados 100 μL da suspensão bacteriana em placas de Petri contendo ágar LB, nas quais foram depositados os discos de papel de filtro qualitativo de 6 mm de diâmetro. Logo após, os discos foram impregnados com 10 μL de cada extrato nas concentrações referidas do estoque. Como controle negativo, utilizou-se apenas o veículo dos extratos, DMSO. As placas foram então incubadas em estufa a 37°C , durante 24 horas. O procedimento foi feito em, pelo menos, dois experimentos independentes.

6.1.4.2) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da menor concentração dos extratos capazes de inibir o crescimento ou matar as bactérias, utilizou-se o método de diluição em caldo recomendado pela ANVISA, seguindo protocolos da NCCLS com adaptações. A partir de colônias crescidas por 24 horas em ágar Luria Bertani, o inóculo foi ajustado para 0,5 na escala de McFarland utilizando-se PBS 1x e, em seguida, diluído 100 vezes em caldo Luria Bertani. Em cada poço, de uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 μL do inóculo final ($1,5 \times 10^6$ células mL^{-1}) junto a 100 μL de uma solução contendo o extrato já diluído em caldo LB, cuja concentração inicial foi de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo diluído em série de 1:2 na vertical, até a 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os testes foram feitos em triplicata, com controle de meio (apenas meio estéril), controle de inóculo (apenas inóculo e meio de cultura), controle negativo (DMSO) e controle positivo (Amicacina 10 mg mL^{-1}). Após 24 horas a 37°C incubadas em estufa, as placas foram submetidas ao ensaio colorimétrico com metil-tiazol-tetrazólio (MTT), onde foram adicionados 10 μL de solução de MTT (2 mg mL^{-1}) em cada um dos poços. Novamente, essas foram incubadas para a metabolização do sal de tetrazólio, por 30 minutos. A leitura foi feita a olho nu, onde a cor roxa indicou crescimento bacteriano, enquanto a amarela, sua ausência. O procedimento foi feito em triplicata dentro do mesmo ensaio, e em três experimentos independentes.

6.1.4.3) Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A fim de se conhecer mais sobre a sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos, foi realizado o ensaio para definir a concentração bactericida ou bacteriostática de cada extrato frente às espécies bacterianas de interesse. O método foi empregado logo após a determinação da CIM, onde os poços que continham a menor concentração do extrato e que não haviam sido corados com MTT, ou seja, na ausência de células metabolicamente viáveis, foram coletados e estriados em uma placa de Petri contendo ágar Luria Bertani, com o auxílio de uma alça de platina. Feito isso, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Passado o período de incubação, as placas que não apresentaram crescimento de colônias bacterianas indicaram atividade bactericida (causando a morte da bactéria), uma vez que após o tratamento com o antimicrobiano as bactérias foram incapazes de voltar a se desenvolver; já a presença de crescimento de pelo menos uma colônia viável, significava que a atividade do composto era considerada bacteriostática (promovendo apenas inibição do crescimento bacteriano), pois as bactérias foram capazes de crescer mesmo após o tratamento com antimicrobiano.

6.1.4.4) Teste do Sinergismo pelo Método *Checkerboard*

Colônias bacterianas crescidas em placas contendo ágar nutriente, por 24 horas, foram transferidas para solução de PBS 1x, ajustando-se a turbidez para que correspondesse a 0,5 da escala de McFarland, e então foi diluído 100 vezes em caldo Luria Bertani. Em cada poço de uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL do inóculo final, 50 µL de solução de amicacina, já diluída em caldo LB com concentração decaindo pela metade de uma coluna a outra para direita (12,5 a 0,024 µg mL⁻¹), e 50 µL de solução de extrato, também diluído em caldo LB com concentração decaindo pela metade de uma fileira para a seguinte (250 a 1,95 µg mL⁻¹), como mostra o esquema da figura 4. Após 24 horas a 37°C, incubadas em estufa, as placas foram submetidas ao ensaio colorimétrico com metil-tiazol-tetrazólio (MTT), quando foram adicionados 10 µL de solução de MTT (2 mg mL⁻¹) a cada um dos poços. Novamente essas foram incubadas para a metabolização do sal de tetrazólio, por 30 minutos. A leitura foi feita a olho nu, onde a cor roxa indicou

crescimento bacteriano, enquanto a amarela, sua ausência. O procedimento foi realizado em três testes independentes.

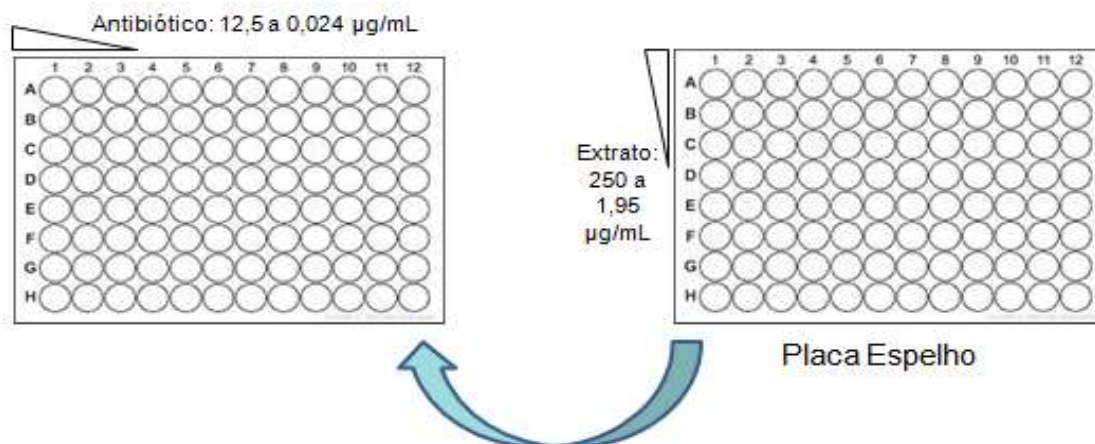


Figura 4: Esquema da preparação de uma placa de 96 poços para ensaio de sinergismo, pelo método *checkerboard*, onde cada poço apresenta uma concentração de antibiótico (amicacina) e uma concentração de extrato.

6.1.4.5) Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)

A partir dos resultados encontrados no teste de sinergismo pelo método de checkerboard, foram realizados os cálculos para que se determinasse o índice de concentração inibitória fracionária de extrato e antibiótico, sendo este igual à soma de $ICIF^A$ e da $ICIF^B$, onde A representa o composto bioativo e B o antibiótico. O $ICIF^A$ foi determinado pela razão de CIM^A combinado por CIM^A sozinho, enquanto $ICIF^B$ foi encontrado pela razão de CIM^B combinado e CIM^B sozinho, como mostrado nas equações abaixo. Segundo Lewis *et al.*, (2002) e Correa-Royero *et al.*, (2010), o valor encontrado para o ICIF deve ser interpretado da seguinte forma: sinergismo ($<0,5$), aditividade ($0,5-1$), indiferença (>1 e <4) ou antagonismo (<4).

$$ICIF = ICIF^A + ICIF^B$$

$$\text{onde, } ICIF^A = \frac{CIM \text{ extrato combinado}}{CIM \text{ extrato sozinho}} \quad \text{e} \quad ICIF^B = \frac{CIM \text{ antibiótico combinado}}{CIM \text{ antibiótico sozinho}}$$

6.1.5 – Ensaio de Citotoxicidade

Os compostos candidatos a antimicrobianos foram submetidos ao teste de citotoxicidade, o qual determina a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4×10^5 células/100 μ L/poço) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/poço de meio DMEM completo com 2% de SFB juntamente com as diferentes concentrações dos extratos a serem testados. As placas foram incubadas por 48 horas e, em seguida, adicionados 25 μ L da solução de metil-tiazol-tetrazólio (MTT) (2 mg mL^{-1} em PBS), incubando-as a 37°C por 90 min. Após este período, 130 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados por poço para dissolver os cristais de farmazan formados, mantendo as culturas sob agitação a 150 rpm por 15 minutos. As absorbâncias em cada poço foram determinadas em espectrofotômetro de ELISA ($\lambda = 492 \text{ nm}$).

A toxicidade celular foi expressa em termos CC_{50} , onde a porcentagem de células viáveis foi calculada como $[(B \times 100)/A]$, em que A e B são as absorbâncias a 492 nm das cavidades com células não tratadas (A) e células tratadas (B), respectivamente. O procedimento foi feito em triplicata dentro do mesmo ensaio e em três testes independentes.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 – Resultados dos testes bioquímicos

As bactérias estudadas tiveram sua identidade confirmada, onde os resultados obtidos foram compatíveis com os resultados esperados e descritos pela literatura, como mostra a tabela 2. A figura 5 apresenta o resultado de alguns dos testes bioquímicos realizados.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios bioquímicos esperado e obtido, confirmando a identidade de cada espécie bacteriana.

Espécie	Resultado dos testes bioquímicos
<i>B. cereus</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (+) e VP (+)
<i>B. subtilis</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (-) e VP (+)
<i>E. cloacae</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (-) e VP (+)
<i>E. coli</i>	Indol (+), Catalase (+), Citrato (-), VM (+) e VP (-)
<i>E. faecalis</i>	Indol (+), Catalase (-), VM (+)
<i>K. oxytoca</i>	Indol (+), Catalase (+), Citrato (+), VM (-) e VP (+)
<i>K. pneumoniae</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (-) e VP (+)
<i>P. aeruginosa</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (-) e VP (-)
<i>S. aureus</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (+) e VP (+)
<i>S. choleraesuis</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (-) e VP (+)
<i>S. flexneri</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (+) e VP (-)
<i>S. saprophyticus</i>	Catalase (+), VM (+) e VP (+)
<i>S. typhimurium</i>	Indol (-), Catalase (+), Citrato (+), VM (+) e VP (-)

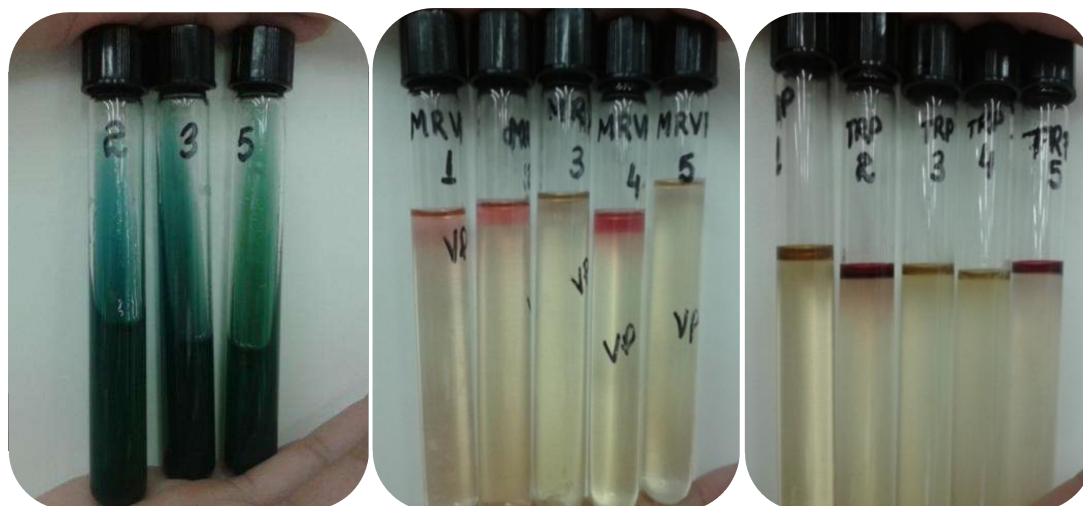


Figura 5: Resultado dos testes bioquímicos onde foi confirmada a identidade das culturas bacterianas que seriam empregadas nos ensaios posteriores, sendo teste do citrato, VM-VP e indol, respectivamente.

6.2.2 – Triagem inicial dos compostos

Os extratos MIE (etanólico), MIH (hexânico), MIC (clorofórmico) e MIAE (acetato de etila) foram testados qualitativamente contra 13 espécies de bactérias por difusão em ágar LB, sendo elas *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* e *Streptococcus saprophyticus*. Destas, nove espécies apresentaram halo de inibição para pelo menos um dos extratos, sendo que para as espécies *K. oxytoca*, *S. typhimurium*, *E. coli* e *E. cloacae* não foi detectada atividade inibitória para nenhum dos extratos.

Em todas as placas o controle negativo (DMSO) agiu como esperado, não apresentando halo de inibição, indicando que a atividade antimicrobiana apresentada era exclusivamente dos compostos. A tabela 3 apresenta a média e o desvio padrão do diâmetro dos halos de inibição formados para cada espécie.

Tabela 3 – Média e Desvio Padrão do diâmetro, em milímetros (mm), dos halos de inibição encontrados para cada espécie pelo método de Difusão em Ágar.

Espécie	MIE (Ø mm)	MIAE(Ø mm)	MIC(Ø mm)	MIH(Ø mm)
<i>B. cereus</i>	16,0 ± 0,1	10,5 ± 0,5	9,0 ± 0,2	*
<i>B. subtilis</i>	13,5 ± 0,5	9,0±1,0	*	*
<i>E. cloacae</i>	*	*	*	*
<i>E. coli</i>	*	*	*	*
<i>E. faecalis</i>	13,5 ± 0,5	10,0 ± 0,1	*	*
<i>K. oxytoca</i>	*	*	*	*
<i>K. pneumoniae</i>	20,5 ± 0,5	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i>	16,0±1,0	*	*	*
<i>S. aureus</i>	12,0±2,0	10,0±1,0	*	*
<i>S. choleraesuis</i>	15,0± 0,5	*	*	*
<i>S. flexneri</i>	14,0± 0,5	10,0± 0,5	*	*
<i>S. saprophyticus</i>	15,0±1,0	*	*	*
<i>S. typhimurium</i>	*	*	*	*

*O extrato não apresentou ação antimicrobiana para a referida espécie.

A polaridade dos solventes usados na extração dos compostos da folha de *Maytenus* sp pode ter influenciado nos resultados obtidos, uma vez que o extrato mais polar (MIE – etanol) foi o que apresentou efeito inibitório em uma maior quantidade de espécies bacterianas, e já no extrato mais apolar (MIH – hexano) não se obteve nenhuma atividade antimicrobiana. Essa correlação entre a polaridade do solvente empregado na obtenção de cada extrato e sua capacidade inibitória de crescimento bacteriano é demonstrada na figura 6.

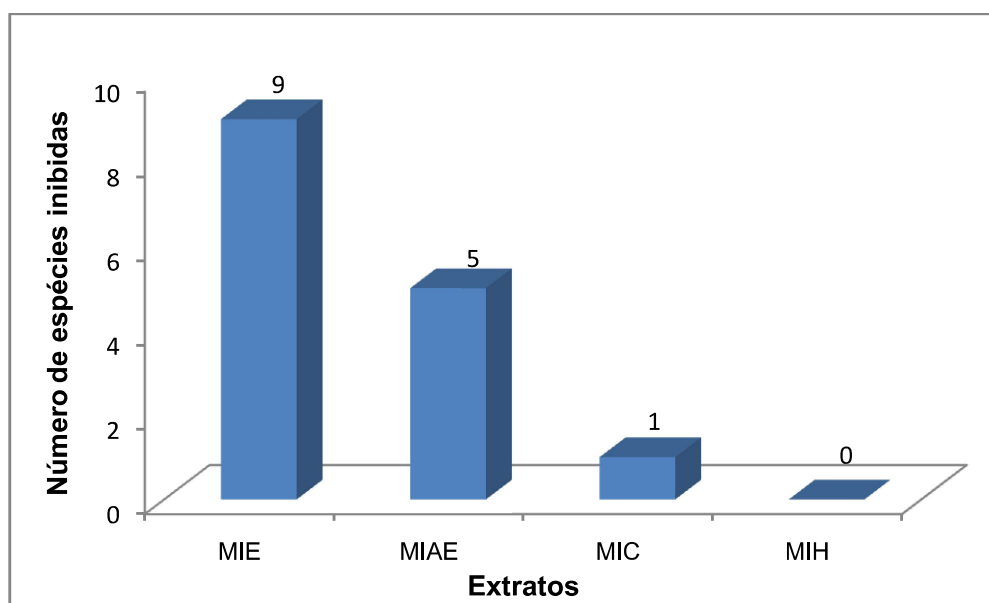


Figura 6: Correlação entre a polaridade dos solventes usados na extração dos compostos e a ação antibacteriana, em diferentes espécies, de cada extrato. Onde os extratos estão apresentados em ordem decrescente de polaridade, etanólico (MIE) > acetato etanólico (MIAE) > clorofórmico (MIC) > hexânico (MIH).

É importante ressaltar que a polaridade dos solventes empregados na extração está diretamente ligada às substâncias extraídas em cada extrato estudado, ou seja, solventes mais apolares tendem a extrair substâncias mais apolares, e o mesmo acontece para os solventes polares. Sendo assim, acredita-se que o princípio ativo do extrato MIE seja uma substância polar, a qual provavelmente não foi extraída quando se utilizou solvente apolar. Isso explicaria o fato do MIE ter sido o mais eficaz contra uma maior quantidade de bactérias, já que neste a concentração dessa substância estaria presente em maior proporção devido à afinidade pelo etanol, solvente utilizado na extração.

Ainda, voltando à tabela 1 pode-se notar que o extrato MIE foi o único que apresentou ação antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, sendo o maior halo de inibição encontrado dentre as bactérias estudadas. Curiosamente, esse mesmo extrato não demonstrou atividade inibitória contra *Klebsiella oxytoca*, como pode ser visualizado na figura 7. Como são espécies Gram negativas, do mesmo gênero e, portanto, estreitamente relacionadas, isso mostra que aparentemente a ação do extrato não foi aleatória.

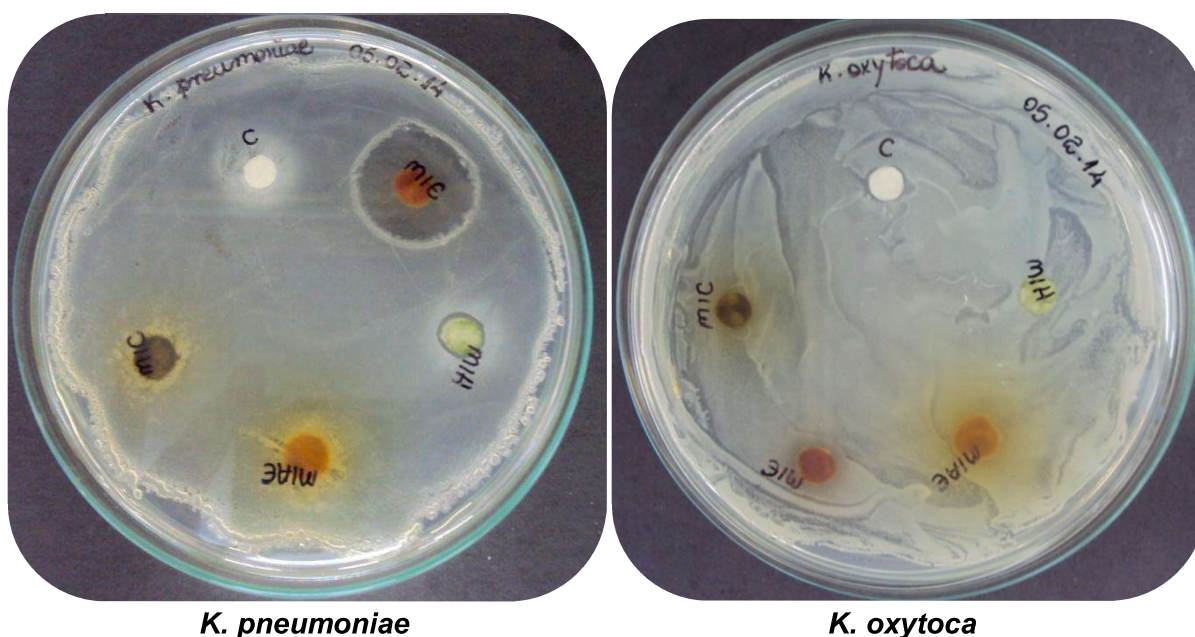


Figura 7: Análise do método da Difusão em Ágar dos extratos de *Maytenus* sp contra *K. pneumoniae* (à esquerda) e *K. oxytoca* (à direita), onde é possível observar o enorme halo de inibição de crescimento para o composto MIE frente a *K. pneumoniae*. Sendo ambas bactérias resistentes a todos os outros extratos de *Maytenus* sp testados.

Por este motivo e pelo gênero *Klebsiella* apresentar uma maior importância em termos de saúde pública, decidiu-se prosseguir os ensaios com as espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. Mesmo não se obtendo resultados antimicrobianos satisfatórios contra a última, pelo método da difusão em ágar, optou-se por continuar com *K. oxytoca* para que todos os testes realizados pudessem ter seus resultados comparados entre as duas espécies.

6.2.3 – Análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Pela técnica de microdiluição em caldo, os quatro extratos (MIE, MIH, MIC e MIAE) de *Maytenus* sp foram analisados quanto à atividade antibacteriana, de forma quantitativa, sendo avaliados em placas de 96 poços independentes para cada espécie em estudo. Ainda, para que se verificasse a reprodutibilidade dos resultados encontrados, cada teste foi repetido três vezes independentes, sendo que ainda existiam triplicatas dentro de cada unidade experimental.

A figura 8 permite observar os resultados encontrados, após adição do revelador MTT, para as ambas as espécies bacterianas.

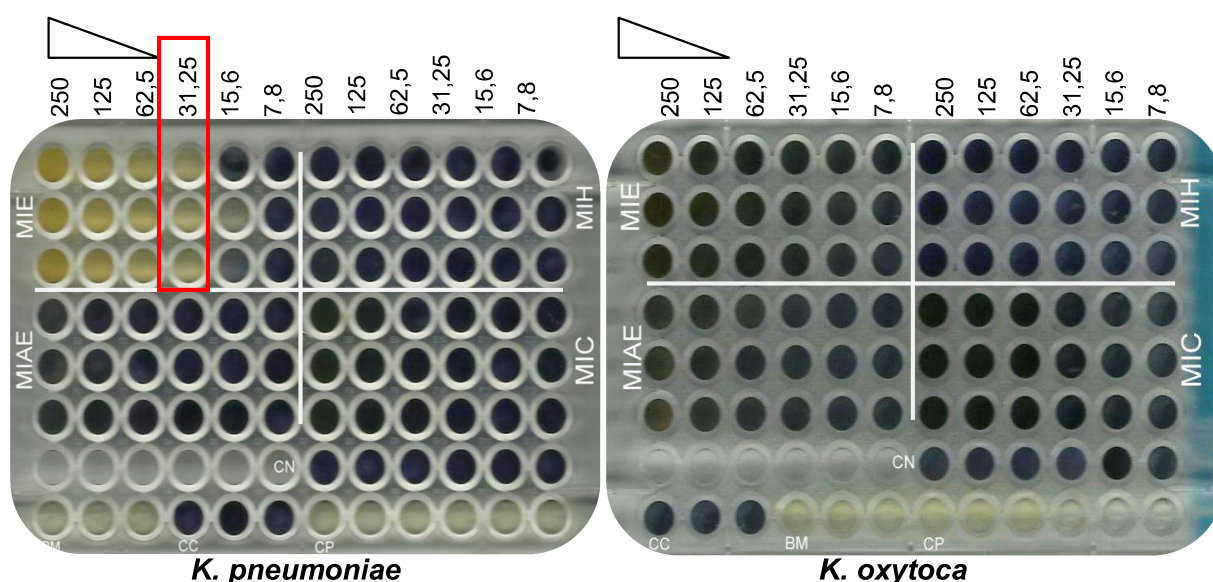


Figura 8: Placas de 96 poços onde foram realizados os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima de cada um dos extratos de *Maytenus* sp, frente a *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*. As concentrações dos extratos decaem pela metade da esquerda para direita. Os poços de coloração roxa indicam que houve crescimento bacteriano, enquanto os de coloração amarela indicam a ausência de crescimento bacteriano. Como controles são mostrados CC (apenas inóculo); BM (apenas meio); CP (Controle positivo/antibiótico) e CN (Controle negativo/veículo DMSO).

Como pode ser observado pela figura 8, houve coerência entre os resultados preliminares obtidos pelo método da difusão em ágar, onde os mesmos extratos que não demonstraram atividade por este método, também não apresentaram atividade pela técnica de microdiluição em caldo.

A microdiluição permitiu encontrar a concentração inibitória mínima do extrato etanólico (MIE) capaz de impedir totalmente o crescimento de *K. pneumoniae*, sendo que o resultado obtido foi de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os outros extratos não foram eficazes contra essa espécie, como previsto no teste anterior de difusão.

Este ensaio confirmou ainda que, realmente, nenhum dos extratos de folhas de *Maytenus* sp possui ação antibacteriana contra *K. oxytoca*, uma vez que nem nas maiores concentrações testadas (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) houve inibição de seu crescimento.

É importante destacar que a concentração inibitória mínima foi encontrada após análise visual do limite entre poços não corados e poços corados pelo MTT, como é apontado na figura 8, não sendo feita medição das absorbâncias. Além disso, vale ressaltar que as triplicatas independentes tiveram resultados semelhantes e que para todas elas os controles agiram como esperado validando os resultados encontrados.

Alves *et al.* (2008) compararam técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras, e concluíram que o método de microdiluição em caldo é a melhor opção, quando comparado com técnicas de difusão em disco. Segundo Eloff (1998), a sensibilidade da técnica de microdiluição em placa para determinação da CIM de extratos de plantas é 32 vezes maior que a técnica de difusão em disco.

Extratos com concentração inibitória mínima menor que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são bons candidatos a fitoterápicos, uma vez que concentrações relativamente mais baixas têm uma maior probabilidade de não serem tóxicas às células de mamífero. Entretanto, isso só pode ser confirmado com ensaio citotóxico, pois pode ocorrer da concentração ser muito baixa, mas indicando que a inibição causada se deve a alta toxicidade do composto e não sobre uma alta seletividade. De acordo com Holetz *et al.* (2002), extratos com CIM menor que 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, possuem uma boa atividade antimicrobiana, entre 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana é moderada e a variação entre 500 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a atividade é fraca, sendo que acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o extrato é considerado inativo. Aligiannis *et al.* (2001) consideram que atividade antimicrobiana de extratos vegetais com valores menores ou iguais a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas como potenciais para prospecção de novas substâncias com propriedades antibióticas e antifúngicas.

Andrews (2001) considerou em seu estudo que a CIM é uma ótima ferramenta na determinação da sensibilidade de microrganismos frente aos

antimicrobianos, sendo utilizada para avaliar o desempenho de muito outros métodos de susceptibilidade, como nos métodos da concentração bactericida mínima e de *checkerboard* empregados no presente estudo.

6.2.4 – Análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após avaliação da concentração inibitória mínima dos compostos para cada espécie bacteriana, realizou-se o ensaio de concentração bactericida mínima apenas para o MIE contra *K. pneumoniae*.

As placas de Petri contendo ágar LB que, posteriormente ao período de incubação, não apresentassem crescimento de nenhuma colônia no estriamento efetuado, indicariam que o composto na CIM é bactericida para a referida espécie, ou seja, mesmo em condições ótimas e na ausência da substância inibidora a bactéria não é capaz de crescer após ter sido tratada com o antimicrobiano. Entretanto, como pode ser visualizado na figura 9, o estriamento resultou no crescimento bacteriano de *K. pneumoniae*, mostrando que a concentração inibitória mínima de MIE é caracterizada apenas como bacteriostático, uma vez que em condições ótimas e na ausência da substância inibidora a bactéria foi capaz de se desenvolver, mesmo após o tratamento com o antibacteriano.



Figura 9: Placas de cultura onde foram estriadas inóculo bacteriano, a partir do poço em que se obteve a CIM do composto, a fim de conhecer se o efeito antimicrobiano seria bactericida ou bacteriostático. Como houve crescimento de *K. pneumoniae*, a

concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MIE foi caracterizada como bacteriostática, já que a bactéria foi capaz de se desenvolver após tratamento com antimicrobiano.

Esse resultado também dá indícios que o extrato MIE não é muito tóxico, já que apenas inibiu o crescimento bacteriano de *K. pneumoniae* na concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, apenas quando em contato com o microrganismo.

6.2.5 – Pesquisa de Sinergismo entre Extrato Etanólico (MIE) e Amicacina

Como já descrito previamente, a Amicacina é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, alto valor agregado e toxicidade relevante. Por esses motivos, optou-se por verificar se o extrato MIE e o antibiótico Amicacina teriam efeito sinérgico sobre a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, utilizou-se o método de *checkerboard*, combinando-se os antimicrobianos em diferentes concentrações em uma placa de 96 poços. Esse método também foi realizado três vezes independentes para que os resultados fossem confirmados e se verificasse a reprodutibilidade do experimento.

Como o antibiótico foi diluído horizontalmente (coluna a coluna) e o extrato diluído na vertical (linha a linha), esperava-se que, para um possível efeito sinérgico, houvesse crescimento bacteriano apenas nas menores concentrações combinadas, ou seja, apenas no canto inferior direito da placa. O resultado obtido neste ensaio é mostrado na figura 10, onde observa-se exatamente o que era esperado, havendo uma ação conjunta entre extrato e antibiótico, pois concentrações menores que a CIM de MIE e amicacina sozinhos, que não apresentavam efeito sobre o crescimento bacteriano antes da combinação, passaram a inibir quando associados.

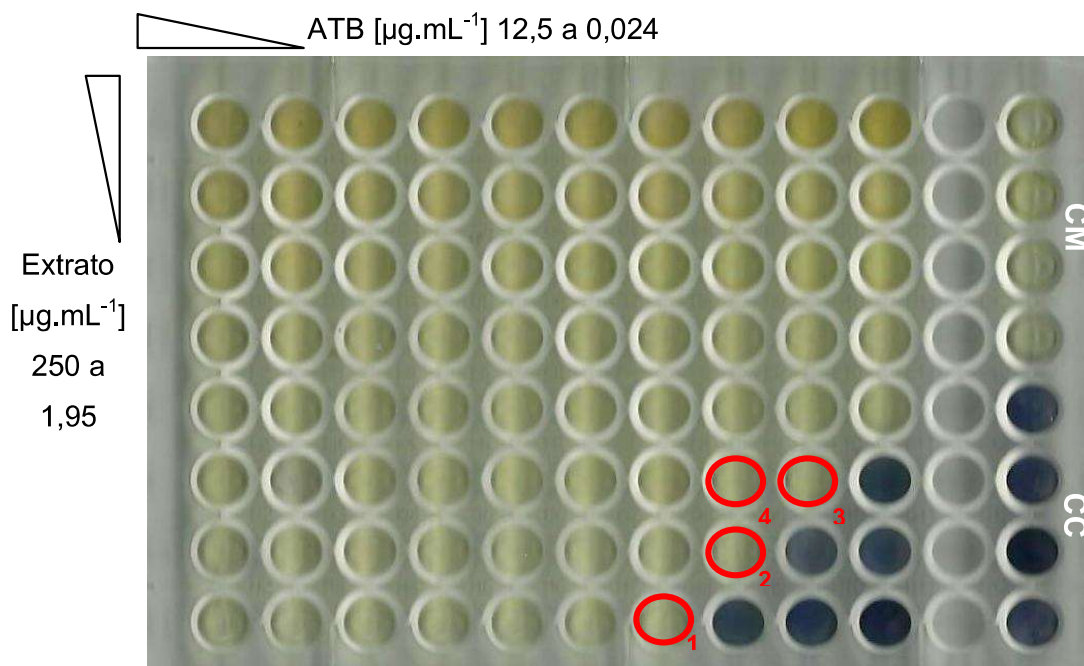


Figura 10: Resultado do método de *checkerboard*, onde se avaliou o efeito sinérgico de amicacina em associação com o extrato MIE contra *K. pneumoniae*. Baixas concentrações de ambas as substâncias foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. O extrato MIE teve sua diluição feita na vertical (250 a 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$), de forma descendente, e a Amicacina diluída na horizontal, da esquerda para direita (12,5 a 0,024 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A última coluna representa o controle do meio (CM) e controle do inóculo (CC), respectivamente. Os poços marcados por 1, 2, 3 e 4 representam aqueles escolhidos para os cálculos de ICIF, que será realizado posteriormente. A cor roxa indica crescimento bacteriano, enquanto a cor amarela indica a ausência.

Apenas com este ensaio, não é possível dizer que o efeito da associação dos antimicrobianos foi sinérgico, mesmo sabendo que ambas as concentrações necessárias para inibição do crescimento foram reduzidas. É necessário o cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) para definir tal efeito. Ainda, para todos os ensaios os controles agiram como esperado, validando os resultados encontrados.

Os quatro poços apontados em vermelho na figura 10 correspondem às menores concentrações de extrato e antibiótico combinados. Para melhor visualização, a concentração destes em cada uma das combinações foi representada por histogramas, como mostra a figura 11.

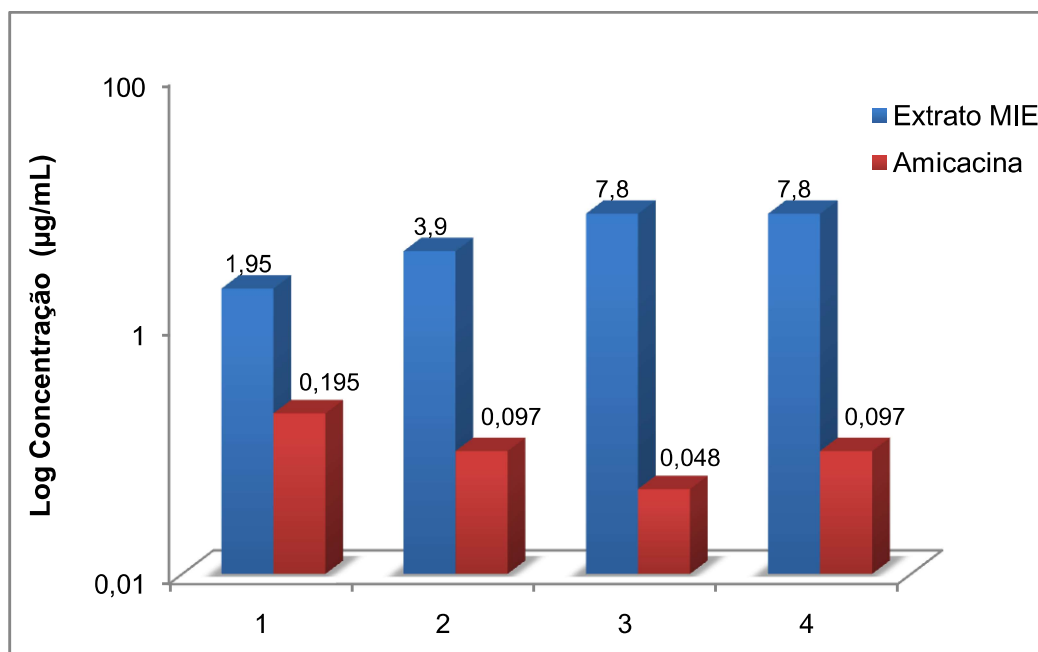


Figura 11: Representação histogramática da concentração mínima de extrato MIE e Amicacina associados que apresentaram ação inibitória pelo método *checkerboard*.

6.2.6 – Resultado do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)

O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) é o que determina qual o tipo de efeito causado pela associação de dois compostos antimicrobianos. Portanto, para o cálculo do ICIF, foram utilizados os valores de concentração inibitória mínima de MIE e Amicacina, obtidas pela microdiluição contra *K. pneumoniae*, sendo igual a 31,25 e 0,4 µg mL⁻¹, respectivamente. Os valores utilizados na equação (1) de CIM combinado, tanto de extrato como de antibiótico, foram aqueles obtidos no ensaio de checkerboard, demonstrados nos histogramas da figura 11. Os resultados destes cálculos são apresentados na Tabela 4.

$$ICIF = ICIF^A + ICIF^B \quad (1)$$

$$\text{onde, } ICIF^A = \frac{CIM \text{ extrato combinado}}{CIM \text{ extrato sozinho}} \quad \text{e} \quad ICIF^B = \frac{CIM \text{ antibiótico combinado}}{CIM \text{ antibiótico sozinho}}$$

Tabela 4 – Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) de quatro combinações de MIE e Amicacina sobre *K. pneumoniae*, pelo método de *checkerboard*.

Combinação	ICIF ^A	ICIF ^B	ICIF
1	0,06	0,49	0,55
2	0,12	0,24	0,36
3	0,25	0,12	0,37
4	0,25	0,24	0,49

^AExtrato MIE e ^BAmicacina.

Segundo Lewis *et al.*, (2002) e Correa-Royero *et al.*, (2010), associações de antimicrobianos que resultam em ICIF menor que 0,5 indicam efeito sinérgico; ICIF entre 0,5 e 1,0 indicam efeito aditivo; entre 1,0 e 4,0 o efeito é indiferente e ICIF maior que 4,0 a associação possui efeito antagônico. Sendo assim, as combinações 2, 3 e 4 de Amicacina com o extrato etanólico de *Maytenus* sp apresentaram efeito sinérgico sobre a bactéria *K. pneumoniae*, uma vez que o valor de ICIF encontrado foi menor que 0,5 para estes casos, já a combinação 1 mostrou efeito aditivo, pois seu ICIF está entre 0,5 – 1,0.

Nos estudos de Cuenca-Estrella (2004), ele sugere que o efeito sinérgico é uma interação positiva entre duas substâncias, onde a ação antimicrobiana é maior que a soma dos efeitos de cada agente separado; o efeito aditivo é descrito como a soma dos efeitos de cada agente; uma ação indiferente é aquela em que o efeito combinado é equivalente ao da droga mais ativa separadamente; já o efeito antagônico é uma interação negativa, onde a ação antimicrobiana do agente é reduzida, inativada ou eliminada quando se faz a associação das substâncias.

Johnson (2004) descreve alguns prováveis mecanismos envolvidos em ações sinérgicas e antagônicas. O efeito potencializado no sinergismo pode estar relacionado com a inibição simultânea de vias metabólicas em diferentes estágios ou com a interação de transporte das substâncias – por exemplo, melhor penetração de um antimicrobiano como resultado da ação de outro que atua na parede celular do microrganismo. No efeito antagônico, a interação negativa dos antimicrobianos pode ser consequência da modificação de algum alvo destes, sendo induzida pela prévia exposição ao outro agente em questão; ainda, pode ser decorrência da adsorção de

um antimicrobiano na superfície celular do microrganismo, impedindo que o outro agente se ligue ao seu sítio de ação.

Portanto, o sinergismo entre as duas substâncias em estudo proporciona menores concentrações de cada antibacteriano a ser utilizado, apresentando economia, uma vez que a amicacina possui alto valor agregado, onde um frasco de 50 mg mL⁻¹ da Sigma-Aldrich® custa R\$ 3.979,00, enquanto um de Penicilina G da mesma marca custa apenas R\$ 143,00. Também há uma redução de toxicidade, já que menores concentrações são empregadas para uma ação de maior espectro. Sendo assim, pode-se tornar uma alternativa de terapia combinada a ser avaliada no tratamento de *K. pneumoniae* multirresistentes e difíceis de serem tratadas.

As associações de 7,8 µg mL⁻¹ de MIE com 0,048 µg mL⁻¹ de amicacina e 3,9 µg mL⁻¹ de MIE com 0,097 µg mL⁻¹ de amicacina foram as combinações mais eficazes pois apresentaram os menores índices de concentração inibitória fracionária, 0,37 e 0,36, respectivamente.

O método de *checkerboard* também foi feito para *K. oxytoca*, associando-se as mesmas substâncias, MIE e Amicacina, mas os resultados continuaram não sendo satisfatórios, uma vez que os valores encontrados de ICIF indicaram indiferença quanto a combinação dos compostos, ou seja, apenas o antibiótico Amicacina estava realmente atuando na inibição do crescimento, o que condiz com os resultados encontrados anteriormente na técnica da microdiluição e difusão em ágar.

6.2.7 – Análise do efeito citotóxico

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando-se células imortalizadas de rim de hamster neonato, BHK-21, o qual permitiu conhecer a concentração citotóxica de cada extrato de *Maytenus* sp capaz de matar 50% das células (CC₅₀) utilizadas no experimento. O teste foi aplicado mesmo para os extratos que não apresentaram atividade em nenhum dos ensaios antimicrobianos. De acordo com Eisembrand *et al.* (2002), a citotoxicidade *in vitro* é empregada para definir apenas efeito tóxico basal, onde a substância provoca danos nas funções básicas da célula levando-a a morte.

Os extratos hexânico (MIH), clorofórmico (MIC) e em acetato etanólico (MIAE) apresentaram uma CC_{50} de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$; já o extrato etanólico (MIE) mostrou que somente concentrações a partir de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ são tóxicas a 50% das células BHK-21. Este resultado é representado graficamente na figura 12.

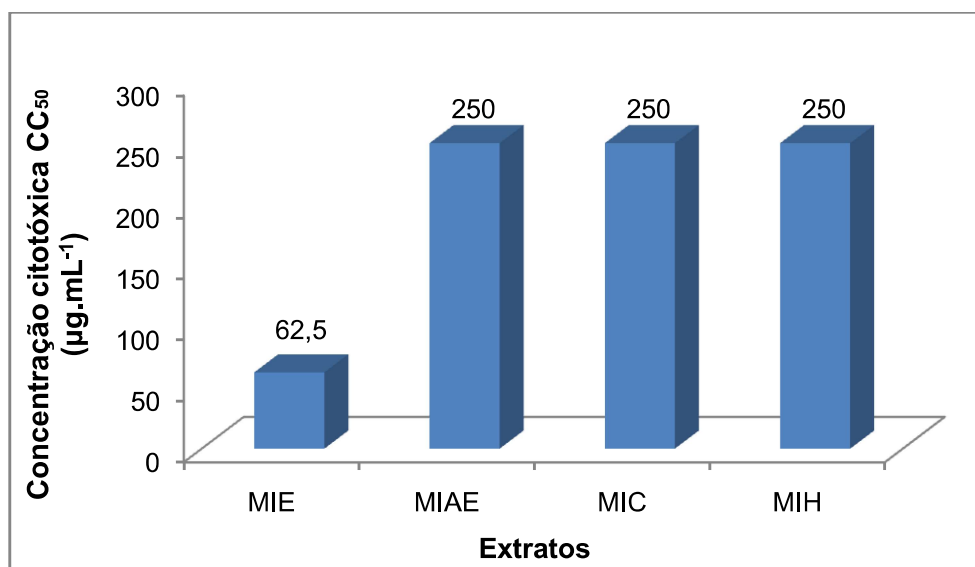


Figura 12: Representação gráfica dos valores obtidos da Concentração Citotóxica para 50% (CC_{50}) das células de mamífero BHK-21, para cada um dos extratos de *Maytenus* sp.

Nota-se por estes resultados que o único extrato com atividade antimicrobiana foi também o mais tóxico dentre os extratos de *Maytenus* sp em estudo. A figura 13 mostra as células tratadas na concentração em que foi determinada a CC_{50} de cada composto e o controle de células não tratadas, para que possa ser observado o efeito visual na monocamada da cultura celular.

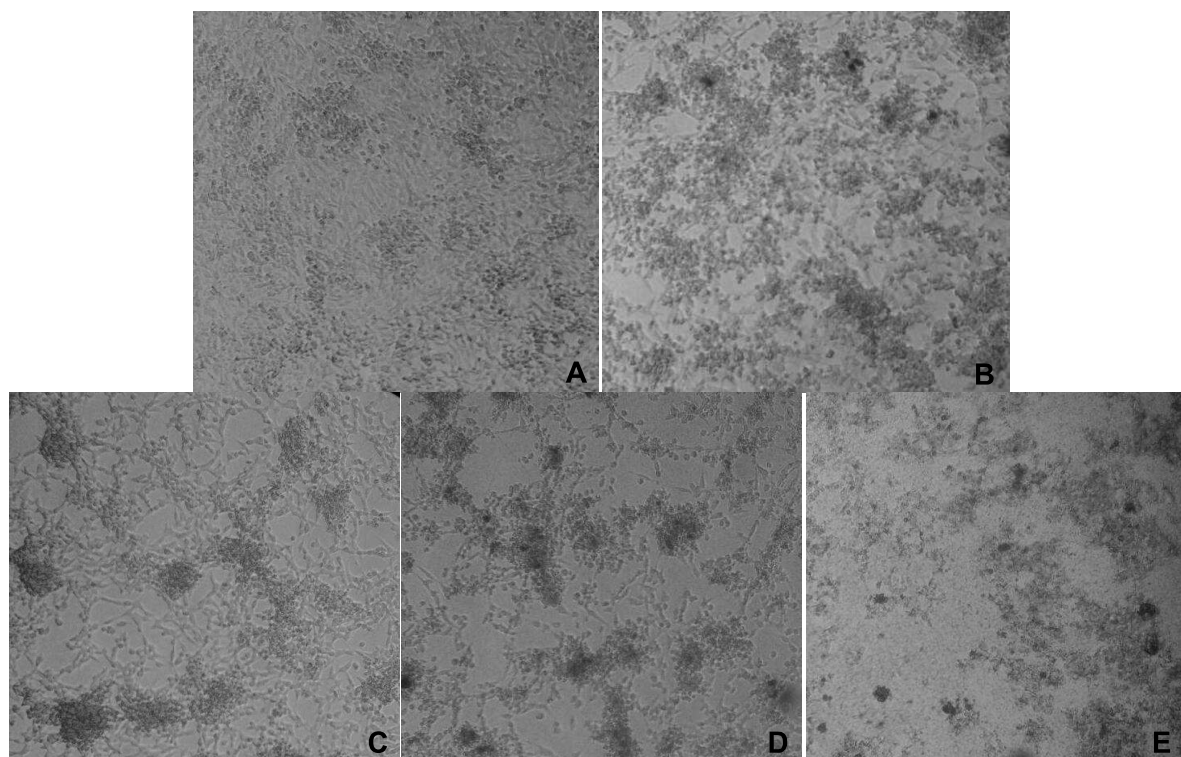


Figura 13: Células BHK-21 mostrando o efeito visual encontrado na monocamada celular tratada com cada um dos extratos de *Maytenus* sp nas concentrações citotóxicas para 50% das células (aumento de 100x). Em A tem-se células não tratadas, B células tratadas com MIE 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, C células tratadas com MIAE 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D células tratadas com MIC 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e E células tratadas com MIH 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir do valor de citotoxicidade do extrato etanólico e dos valores obtidos da CIM do mesmo frente a *K. pneumoniae*, sozinho e combinado com amicacina, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), o qual representa a relação entre a dose tóxica (CC_{50}) e a dose (CIM) de uma substância, como mostra a equação (2).

$$\text{IS}_{\text{extrato}} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{CIM}_{\text{extrato}}} \quad (2)$$

Como a concentração inibitória mínima de MIE sozinho foi de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 3,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando associado à amicacina, o índice de seletividade deste antimicrobiano contra *K. pneumoniae* foi igual a 2 e 16, respectivamente. Segundo Mokoka *et al.* (2013) valores de IS menores que 1 indicam que a bioatividade apresentada pelo composto é consequência dos efeitos tóxicos gerais dos constituintes que estão presentes do extrato. Nos estudos de Bézivin *et al.* (2003), IS maior que três foram avaliados como um bom valor de IS para extratos, sendo muito

mais efetivo que tóxico, na concentração em questão. Já Aguiar (2011) considera que apenas compostos com valores de IS maiores que 10 são considerados seguros e com possibilidade de ausência de toxicidade.

Além disso, o valor obtido de IS para o extrato MIE sozinho permite dizer que a atividade antimicrobiana apresentada contra *K. pneumoniae* não foi devido a efeitos tóxicos do mesmo, uma vez que o $IS > 1$. Entretanto, quando associado à amicacina seu IS aumenta oito vezes, sendo maior que 10 e, portanto, considerado seguro de acordo com a literatura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Estudos com extratos são interessantes por possibilitarem uma maior prospecção, antes de se testar individualmente cada substância, principalmente considerando que certas espécies possuem dezenas ou centenas de compostos bioativos. Mas, é fato que o intuito final desse tipo de pesquisa é chegar ao/s princípio/s ativo/s, com a possibilidade de obtenção de algum produto de interesse comercial, seja para a produção controlada seja para a síntese química. Assim, a partir dos resultados promissores obtidos com extratos de folhas de *Maytenus* sp, a etapa seguinte, e em curso, passou a ser a investigação de qual/is seria/m o/s composto/s presente no extrato. Dessa forma, inicialmente, a substância epicatequina, gentilmente cedida pelo grupo NEPLAM, passou a ser investigada. Foi considerada um flavonóide candidato ao princípio ativo por estar presente no extrato (tabela 1). Porém, após o ensaio da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima, foi percebido que nem a máxima concentração testada de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi eficaz contra *K. pneumoniae*. Sendo assim, esse resultado mostra que, dos isolados de folhas de *Maytenus* sp, a epicatequina não é a substância responsável pela atividade antimicrobiana encontrada no extrato MIE. Outra finalidade desse tipo de estudo é a possibilidade de, em descobrindo qual é o princípio tóxico, desenvolver processo que o elimine (extração ou modificação), deixando apenas compostos de interesse.

Segundo Rodrigues (2012), os triterpenos pentacíclicos são os principais compostos encontrados na Família Celastraceae que apresentam atividade biológica. Diante deste fato, e também sabendo que a epicatequina é um flavonóide

e não apresentou nenhuma ação antimicrobiana, pode-se dizer que algum dos isolados triterpenos com grupos polares – 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3 α -30-dihidroxi-lup-20(29)-eno ou ácido 3,4-secofriedelan-3-óico – tem uma maior probabilidade de ser o princípio ativo do extrato MIE. Apesar de o dulcitol ser o isolado mais polar e, provavelmente, presente em grande proporção no extrato etanólico de *Maytenus* sp, ele é um poliol, substância não muito evidenciada pela literatura como potencial antimicrobiano. A figura 14 apresenta a estrutura química dos isolados de *Maytenus* sp, descritos na tabela 1. Isso abre inúmeras frentes de estudo, seja para os diferentes compostos ou para os diferentes microrganismos afetados.

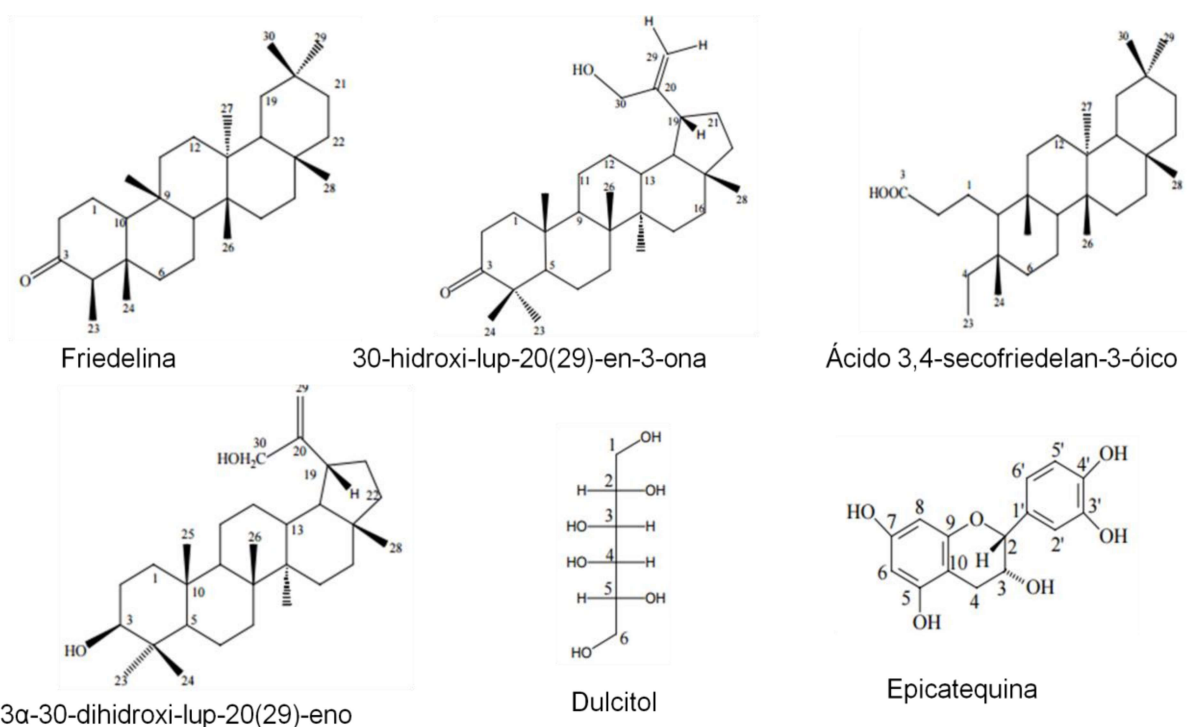


Figura 14: Estruturas químicas dos principais isolados de folhas de *Maytenus* sp (SILVA, 2009).

Sendo assim, nossos resultados em conjunto, até o momento, permitem afirmar os extratos de *Maytenus* sp apresentam ação antimicrobiana em pelo menos uma das bactérias testadas, sendo o MIE de maior destaque, capaz de impedir o crescimento de *K. pneumoniae* com uma concentração inibitória mínima de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a qual proporcionou efeito bacteriostático. A combinação desse antimicrobiano com o antibiótico amicacina apresentou um efeito sinérgico promissor, reduzindo em até oito vezes a concentração de ambos quando utilizados

sozinhos. O sinergismo é importante não só pelo aumento do espectro de ação, mas também pela redução de toxicidade de ambos os compostos associados, uma vez que menores concentrações são utilizadas para um efeito de inibição maior. O índice de seletividade deste composto, tanto sozinho como combinado com amicacina, foi satisfatório, mostrando que a dose ativa é menor que a dose tóxica.

Portanto, pode-se dizer que o extrato etanólico de folhas de *Maytenus* sp, ou algum composto desta planta, pode representar um fármaco bastante promissor na busca de um tratamento alternativo contra doenças causadas por *K. pneumoniae*, podendo ser empregado em associação com o antibiótico amicacina para que se tenha uma ação potencializada de ambos.

São perspectivas deste trabalho encontrar o princípio ativo do extrato etanólico de folhas *Maytenus* sp frente a *Klebsiella pneumoniae*, assim como estudar os possíveis mecanismos de ação do extrato contra a bactéria, uma vez que este apresenta atividade apenas no tratamento de *K. pneumoniae* e não tem efeito frente a *K. oxytoca*.

Este trabalho de conclusão de curso está em consonância com os pilares do curso de Engenharia de Bioprocessos da UFSJ/CAP, cujo perfil do egresso deve focar Indústrias de Alimentos e Bebidas, Fármacos, Energia e Meio Ambiente. Dessa forma, a prospecção de produtos naturais e novas drogas para fins terapêuticos significa, além de um prazer pelo desafio inerente à pesquisa experimental, uma grande satisfação em poder contribuir com alguma tecnologia para o bem-estar social e utilização sustentável de recursos ambientais. O trabalho é um desafio para os próximos anos, e certamente será motivo de grande inquietação científica da equipe.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. C. C. **Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina.** *Dissertação de Mestrado*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, UFMG, p. 61, 2011

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H.; CASEMIRO, L. A.; *et al.* **Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras.** *Química Nova*, v.31, n.5, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa intensifica controle de infecção em serviços de saúde.** *Rev. Saúde Pública*, v.38, n.3, p. 475-478, 2004.

ANVISA – Antimicrobianos: Bases teóricas e uso clínico. Item 5 – Aminoglicosídeos, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/aminoglicosideos3.htm>. Acesso em 24 de outubro de 2015.

ANVISA – Módulo 3. **Gram negativos não fermentadores.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo3/identificacao.htm>. Acesso em 19 de outubro de 2015.

ANVISA – Módulo 4. **Gram positivos.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_stre2.htm>. Acesso em 19 de outubro de 2015.

ANDREWS, J. M. **Determination of minimum inhibitory concentrations.** *J. Antimicrob. Chemother.* 48, p. 5-16, 2001.

ARBEX, M. A., *et al.* **Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha.** *J. bras. pneumol.*, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 641-656, Oct. 2010.

ARGENTA, J. S. **Atividade *in vitro*, individual ou em combinação, de voriconazol, itraconazol e terbifina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*.** *Dissertação de Mestrado*. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária – UFRS, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. N.; SHERRIS, J. C. *et al.* **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.

BECHTLUFFT, M. P.; ALVES, E. M. G.; ARAÚJO, J. G. **Perfil de DNA plasmidial em bactérias resistentes a antibióticos isoladas do Ribeirão Paciência – Pará de Minas – MG.** *SynThesis Revista Digital FAPAM*, v.1, n.1, 282-292, 2009.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE, F. D.; BOUSTIE, J. **Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines.** *Phytomedicine* 10:499-503, 2003.

BOLZANI, V. **Nobel de Medicina 2015, um tributo à química de produtos naturais e às pesquisas sobre doenças negligenciadas.** *Academia de Ciência do Estado de São Paulo - CIESP*. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.acadciencias.org.br/news/249/nobel-de-medicina-de-2015,-um-tributo-à-química-de-produtos-naturais-e-às-pesquisas-sobre-doenças-negligenciadas>>. Acesso em 20 de outubro de 2015.

BRÜNING, R.; HILDERBERT, W. **Übersicht Über Die Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chimie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie.** *Phytochemistry*, v. 17, n. 11, p. 1821-1858, 1978.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO-OKANO, R. M. ***Maytenus littoralis* Carvalho-Okano (Celastraceae), uma nova espécie para o Brasil.** *Hoehnia*, São Paulo, v. 32, n.3, p. 467-469, 2005.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Chapter 8: Identification and Characterization of *Streptococcus pneumoniae*.** April, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.html>>. Acesso em 17 de outubro de 2015.

CORREA-ROYERO, J. TANGARIFE, V.; DURAN, C.; STASHENKO, E.; MESAARANGO, A. **In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 734-741, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Nature: a vital source of leads for anticancer drug development.** *Phytochemistry Reviews*, v. 8, p. 313-331, 2009.

CUENCA-ESTRELLA, M. **Combinations of antifungal agents in therapy – what value are they?** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 54, p. 854-869, 2004.

DE SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M. **HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus salicifolia*.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.47, p. 59–67, 2008.

DIENSTMANN, R., *et al.* **Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar.** *Bras Patol Med Lab*, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

DUARTE, L. P. **Estudo químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*.** *Tese de doutorado*. Belo Horizonte: UFMG/ICEx/Química, 2000.

DUARTE, M. C. T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil.** *Multiciência*, v.7, outubro de 2006.

EISEMBRAND, G. *et al.* **Method of in vitro toxicology.** *Food and Chemical Toxicology*, v.40, n.1, p.193-236, 2002.

ELOFF, J.N. **A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria.** *Planta Médica*, v.64, n.8, p. 711-713, 1998.

FRANCISCO, L. D. **Controle de Infecções Hospitalares: Revisão de Literatura.** *Trabalho de Conclusão de Curso*. Rio de Janeiro: Escola de Saúde do Exército, 2009.

HÖGENAUER, C. M. D.; *et al.* ***Klebsiella oxytoca* as a Causative Organism of Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis.** *N Engl J Med*. 355:2418-2426, 2006.

HOLETZ, F. B; PESSINI, G. L; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1037-1031, 2002.

JOHNSON, M. D., *et.al.* **Combination Antifungal Therapy.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KUMAR, S. Nishanth; SIJI, J. V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. **Activity and Synergistic Antimicrobial Activity Between Diketopiperazines Against Bacteria In Vitro.** *Springer Science+Business Media New York*, 2012.

LEITE, J. P. V., *et al.* **Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*).** *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** *Nature Publishing Group*, 2004

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. **Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 345-531, 2002.

MOKOKA, T. A., *et al.* **Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae).** *BioMed Central: Complementary and Alternative Medicine*, 13: 111, 2013.

MOREIRA, V. C.; FREIRE, D. ***Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos.** *Universidade Católica de Goiás/IFAR*, 2011.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, v.65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard — 6th Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4) (2003).

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAZ, T. **The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases producing bacteria.** *Lancet Infect Dis*, v.9, p. 228-236, 2009.

ODDS, F. C. **Synergism, antagonism and what the checkerboard puts between them.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 52, p.1, 2003.

OLIVEIRA, C. F., *et al.* **Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 5, p. 556-560, 2009.

OLIVEIRA, D. M., *et al.* **Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Roeske (Celastraceae).** *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 661-665, 2006.

PADUA, M.S. et al . **Assessment of antimicrobial activity in vitro of ethanolic extracts of *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss.) B. gates (Malpighiaceae).** *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu , v. 15, n. 3, 2013 .

RATES, S. M. K. **Plantes as source of drugs.** *Toxicon*, v.39, p.603 – 613, 2001.

RODRIGUES, V. G. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek.** *Dissertação de Mestrado*. Belo Horizonte: Departamento de Química, ICEx, UFMG, p.170, 2011.

RODRIGUES, V.G., *et al.* **Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*.** *Química Nova*, v.35, p.1375-1380, 2012.

ROLLINS, D. M.; JOSEPH, S. W. **Enterobacteriaceae.** 2000. Disponível em <<http://medic.med.utm.tmc.edu>>. Acesso em 20 de outubro de 2015.

SALAZAR, G. C. M. **Análise da constituição Química da Casca da Madeira e Folhas de *Maytenus floribunda*.** *Dissertação de Mestrado*. Belo Horizonte: Departamento de Química – ICEx – UFMG, 1993.

SANTOS, D. F. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial.** *Dissertação de Mestrado*. Goiânia: Universidade Católica de Góias, 2007.

SANTOS, N. Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** *Texto contexto - enferm.*, v. 13, p. 64-70, 2004.

SECOLI, S. R. **Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem.** *RevEscEnf USP*, v.35, n. 1, p. 28-34, mar. 2001.

SILVA, G. D. F. **Constituintes Químicos de *A. populnea*: Estrutura molecular e de cristal e ensaios farmacológicos.** *Tese de doutorado*. Belo Horizonte: UFMG/ICEx, 1990.

SILVA, G. D. F. *et al.* **Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae.** *Revista brasileira de farmacognosia*, João Pessoa, v. 19, n. 2b, June 2009 .

SOARES, V. M. **Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v.48, n.4, p. 251-253, 2012.

SOUZA, C. M. P *et al* . **Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba.** *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu , v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013 .

SWEENEY, M. T.; ZURENKO, G. E. **In vitro activities of linezolid combined with other antimicrobial agents against staphylococci, enterococci, pneumococci, and selected gram-negative organisms.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1902-1906, 2003.

TRINDADE, I. C. **Estudo químico de extratos e frações de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Resseik e de seus fungos endofíticos.** *Dissertação de Mestrado.* Ouro Preto: Escola de Farmácia. CiPharma/UFOP, p.75, 2013.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAÚJO, M. T.; SILVA, B. M. **Estudo sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos – parte I.** *Sitientibus*, Feira de Santana, n.34, p.47-58, jan./jun. 2006

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. **Plantas medicinais: cura segura?** *Química Nova*, v. 28, n. 3, 2005 .

VELLOSA, J. C. R., KHALIL, N. M., FORMENTON, V. A. F., XIMENES, V. F., **Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark.** *Fitoterapia*, v.77, p. 243-244, 2006.

YIGIT, H. **Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2.** *Antimicrobial Agents and Chemoterapy.* August, 2003.

WHO, WORLD HEATLH ORGANIZATION. *WHO Health.* Geneve, 2010.