



**UNIVALI**

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**DANIELA DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CONOCARPANO SEUS  
DERIVADOS E ANÁLOGOS FRENTE A CEPAS RESISTENTES DE  
*Staphylococcus aureus*.**

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PRODUTOS NATURAIS E  
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

**DANIELA DA SILVA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CONOCARPANO SEUS  
DERIVADOS E ANÁLOGOS FRENTE A CEPAS RESISTENTES DE  
*Staphylococcus aureus*.**

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz

Itajaí, Junho de 2007.

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CONOCARPANO SEUS  
DERIVADOS E ANALOGOS FRENTE A CEPAS RESISTENTES DE  
*Staphylococcus aureus*.**

Daniela da Silva

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.”

---

Alexandre Bella Cruz, Doutor  
Orientador

---

Tânia Mari Belle Bresolin, Doutora  
Coordenador do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

---

Dr. Alexandre Bella Cruz (UNIVALI)  
Presidente

---

Dr<sup>a</sup>. Ednéia Casagrande Bueno (UNIVALI)  
Membro

---

Dr. Rosendo Augusto Yunes (UFSC)  
Membro

Itajaí (SC), junho de 2007.

Dedicatória

**Dedico este trabalho às pessoas que  
sempre acreditaram em mim,  
em especial ao meu amado esposo Ivan  
e a minha filha Maria Beatriz.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui, pois nos momentos difíceis é necessário crer que existe uma força maior que nos impulsiona.

Ao Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz, pela orientação, pelo conhecimento compartilhado e principalmente pela paciência.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Tânia Mari Bellé Bresolin que foi uma pessoa presente em todas as etapas, obrigada pela amizade, carinho, compreensão e incentivo.

Ao curso de Farmácia no nome do Prof. José Roberto Bresolin, que possibilitou a realização do mestrado.

À Dr<sup>a</sup>. Rosi Zanoni da Siva, Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes e Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, que gentilmente cederam as substâncias.

À MSc. Thatiane Fagundes e ao Laboratório de Análises Clínicas, que disponibilizaram as cepas bacterianas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ednéia Casagrande Bueno e Prof. Dr. César Augusto Tischer pelas contribuições na parte escrita do trabalho.

Aos meus pais por me possibilitarem ter acesso ao conhecimento, pelo apoio e compreensão.

Ao meu esposo Ivan, que soube compreender este momento importante, os finais de semana ausente, as madrugadas em claro, obrigada pelo carinho e pela tua admiração.

À minha pequenininha Maria Beatriz que dentro da barriga da mamãe me acompanhou e foi a minha fonte inspiradora.

À minha amiga Roberta Lamim pela amizade e apoio.

Aos amigos do LAPAM e da Farmácia Comunitária UNIVALI, Aires, Ana Elisa, Jerusa e Cinthia que sempre tiveram uma palavra de carinho e entusiasmo.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“É necessário superar os nossos próprios limites”*

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CONOCARPANO SEUS DERIVADOS E ANALOGOS FRENTE A CEPAS RESISTENTES DE *Staphylococcus aureus*.

**Daniela da Silva**

Junho/2007

Orientador: Alexandre Bella Cruz, Doutor.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas.

Número de Páginas: 66.

A resistência bacteriana tem sido alvo constante de preocupação, devido ao crescente número de microrganismo com resistência aos agentes antimicrobianos. Estudos realizados com as substâncias extraídas do gênero *Piper* demonstraram atividade biológica significativa frente a microrganismo Gram-positivo. Entre as substâncias avaliadas, o conocarpano apresentou atividade inibitória frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, atividade comparável aos antimicrobianos comerciais. Este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do conocarpano, os derivados metilado, benzoilado e acetilado, também os análogos  $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol frente a 20 cepas de *S. aureus* resistentes obtidas de material clínico proveniente de um hospital do município de Itajaí/SC. A avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), pelo método de microdiluição em caldo, utilizando as substâncias em concentrações que variaram entre 0,05 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A substância conocarpano apresentou CIM que variou entre 0,93 e 1,87  $\mu\text{g/mL}$  e CBM entre 0,93 e  $>30 \mu\text{g/mL}$ , enquanto que as demais substâncias avaliadas não apresentaram atividade frente às cepas de *S. aureus* resistentes. O conocarpano também demonstrou melhorar a atividade antibacteriana quando associado a antimicrobianos comerciais contra os *S. aureus* resistentes, demonstrando que o conocarpano apresenta ação sinérgica quando associado a outro antimicrobiano. Os resultados obtidos demonstraram que a substância conocarpano apresenta excelente atividade frente a cepas resistentes de *S. aureus*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana. conocarpano. *Staphylococcus aureus* resistente.

# ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CONOCARPAN, ITS DERIVATIVES AND ANALOGUES, AGAINST RESISTANT STRAINS OF *Staphylococcus aureus*.

Daniela da Silva

June 2007

Supervisor: Alexandre Bella Cruz, PhD.

Area of Specialization: Natural Products and Synthetic Bioactive Substances.

Number of pages: 66.

Bacterial resistance is a constant cause for concern, due to the growing number of microorganisms which are resistant to antimicrobial agents. Studies carried out with substances extracted from the species *Piper* demonstrate significant biological activity against Gram-positive microorganisms. Among the substances evaluated, conocarpan presented inhibitory activity against strains of *Staphylococcus aureus*, an activity comparable to commercial antimicrobials. This work evaluates the antimicrobial activity of conocarpan, its methylated, benzylated and acetylated derivatives, and the analogues  $\alpha$ -di-isoeugenol and dihydroisoeugenol, against 20 resistant strains of *S. aureus* obtained from clinical material originating from a hospital in Itajaí, SC, Brazil. The evaluation of antimicrobial activity of the substances was carried out by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericide concentration (MBC), by the method of microdilution in broth, using the substances at concentrations varying from 0.05 to 1000  $\mu\text{g/mL}$ . The conocarpan presented a MIC of between 0.93 and 1.87  $\mu\text{g/mL}$  and MBC of between 0.93 and  $>30$   $\mu\text{g/mL}$ , while the other substances evaluated did not present any activity against the resistant strains of *S. aureus*. The conocarpan also demonstrated better antibacterial activity against resistant *S. aureus* strains, when associated with commercial antimicrobials, demonstrating that conocarpan presents synergic action when associated with other antimicrobials. The results obtained demonstrate that the conocarpan substances present excellent activity against resistant strains of *S. aureus*.

Key words: antimicrobial activity. conocarpan. resistant *Staphylococcus aureus*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do conocarpano	17
<b>Figura 2:</b> Gráfico da prevalência de resistência das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de isolados clínicos frente aos antimicrobianos.	43
<b>Figura 3:</b> Representações das estrutura moleculares do conocarpano seus derivados acetilado, benzoilado e metilado e os análogos $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol.	48
<b>Figura 4:</b> Prevalência de resistência de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes frente a antimicrobianos de uso clínico e associados com conocarpano.	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Padrões interpretativos de diâmetros do halo de inibição para <i>Staphylococcus aureus</i> .	36
<b>Tabela 2:</b> Perfil de resistência de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , obtidas de material clínico.	41
<b>Tabela 3:</b> Concentração Inibitória Mínima do conocarpano e seus derivados metilado, acetilado e benzoilado frente às cepas resistentes de <i>Staphylococcus aureus</i> de isolados clínicos.	46
<b>Tabela 4:</b> Concentração Inibitória Mínima das substâncias análogas do conocarpano, $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol frente às cepas resistentes <i>Staphylococcus aureus</i> de isolados clínicos.	47
<b>Tabela 5:</b> Concentração bactericida mínima (CBM) de conocarpano frente às cepas resistentes <i>Staphylococcus aureus</i> de isolados clínicos.	51

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATCC: American Type Culture Collection.

BHI: Brain Heart Infusion (Caldo de Infusão de Cérebro e Coração).

CBM: Concentração Bactericida Mínima.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVALI: Universidade do Vale do Itajaí.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos: .....	15
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Conocarpano .....	16
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
3.3 Agentes antimicrobianos.....	21
3.4 Resistência bacteriana.....	24
3.5 Teste de sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> . .....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Obtenção do conocarpano e seus derivados e análogos. ....	33
4.2 Material microbiológico .....	33
4.2.1 Isolamento e identificação dos microrganismos .....	33
4.2.2 Manutenção dos microrganismos.....	34
4.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	34
4.3.1 <i>Preparo dos inóculos</i> .....	34
4.3.2 <i>Difusão radial em ágar</i> .....	35
4.3.3 <i>Concentração inibitória mínima (CIM)</i> .....	36
4.3.4 <i>Concentração bactericida mínima (CBM)</i> .....	37
4.3.5 <i>Avaliação da associação dos antimicrobianos</i> .....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
5.1 Seleção das cepas resistentes .....	39
5.1.1 <i>Perfil de resistência das cepas bacterianas</i> .....	39
5.2 Atividade antibacteriana.....	44
5.3 Avaliação da associação entre antimicrobianos .....	53
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é um tema muito importante no estudo dos antimicrobianos, porque sua comprovação implica no fracasso da terapêutica. O aumento do uso de antimicrobianos desde a década de 40 tem sido acompanhado de uma crescente alta na resistência, cuja principal causa é a destruição do antibiótico pela bactéria responsável da infecção.

A primeira referência à resistência aos antimicrobianos surgiu nos anos 40, com as penicilinas, tendo ressurgido com o advento dos novos antimicrobianos, nos anos 50 e 60, com a resistência dos gonococos às penicilinas e a sua disseminação as tetraciclina. Hoje em dia, esta resistência causa enormes problemas terapêuticos com implicações na saúde pública (SOARES, 2001).

As pesquisas na área de antimicrobianos está em crise, diminuíram cerca de 50% desde 1968, devido à dificuldade e o alto custo de se isolar estruturas químicas e agentes inéditos com novos mecanismos de ação. Esta crise coincide com a necessidade urgente por novos e melhores fármacos antibacterianos devido à natureza comum da resistência das bactérias a estes medicamentos (BUTLER, 2006).

Desde o começo da era antibiótica o *Staphylococcus aureus* respondeu à introdução de drogas novas rapidamente adquirindo resistência por uma variedade de mecanismos genéticos (BARON; FINEGOLD, 1990). A resistência às drogas antimicrobianas é definida como a capacidade adquirida por um organismo de resistir a um agente antimicrobiano ao qual este é normalmente suscetível. A maioria das resistências aos antimicrobianos envolve genes de resistência, que são transferidos por meio de trocas genéticas.

O combate a resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial e deve ser abordado sob vários aspectos. O entendimento dos processos relacionados à ação de antibióticos e ao surgimento da resistência, o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes, sua posterior aplicação terapêutica de forma racional e a adoção de normas para controle de infecções no meio hospitalar

representam diferentes níveis de ações contínuas e interligadas. Os recentes avanços na identificação de novos alvos macromoleculares importantes e na compreensão dos mecanismos de ação de antibióticos revelam um panorama muito intrincado, onde diversos efeitos podem ser responsáveis pela potência de uma determinada substância, a partir de fenômenos que ocorrem em consonância e contribuem de maneira diferenciada para a atividade antibacteriana. Não obstante, o desenvolvimento de novos agentes bactericidas potentes vem sendo alcançado com sucesso, seja pela elaboração racional de novas gerações de antibióticos visando suplantam a resistência ou a partir de programas direcionados ao descobrimento de produtos naturais bioativos (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Os produtos naturais são considerados uma fonte importante de novos agentes antimicrobianos. A seleção de materiais de planta e de suas substâncias isoladas representa uma fonte potencial importante para medicamentos com maior eficácia (SILVA *et al.*, 2005; SUFFREDINI *et al.*, 2006). O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) estima que entre 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

As principais fontes de antimicrobianos são as bactérias e os fungos, mas é crescente o interesse pelas plantas, que vêm contribuindo significativamente na introdução de novos agentes antimicrobianos (KOSTOVA; NIKOLOY; CHILPISA, 1993). O uso dos extratos da planta e dos fitoterápicos, ambos com propriedades antimicrobianas conhecidas, pode ser de grande significado em tratamentos terapêuticos (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Entre as plantas utilizadas para fins farmacológicos, as plantas do gênero *Piper* são muito empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades: reumatismo, dor-de-dente, epilepsia, ansiedade, antiinflamatório e antioxidante. Também tem sido relatado que extratos e óleos essenciais de muitas espécies deste gênero apresentam potencial atividade antimicrobiana (DE CAMPOS *et al.*, 2005). A atividade

biológica do gênero *Piper* tem sido atribuída principalmente à presença de lignanas e/ou amidas (CHAURET *et al.*, 1996).

As neolignanas conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 tem sido encontradas em muitas espécies do gênero *Piper*. Em trabalhos realizados por Pessini *et al.* (2003) e De Campos *et al.* (2007), o composto conocarpano isolado do gênero *Piper* apresentou inibição para cepas de *S. aureus* com excelente atividade inibitória comparável aos antimicrobianos comerciais.

Levando-se em consideração os resultados encontrados na avaliação biológica do gênero *Piper*, esta dissertação tem como finalidade avaliar a atividade antimicrobiana do conocarpano seus derivados e seus análogos frente a cepas resistentes de *S. aureus*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana do conocarpano e seus análogos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes .

### **2.2 Objetivos específicos:**

2.2.1 Obter cepas de *S. aureus* resistentes de isolados clínicos.

2.2.2 Conhecer o perfil de susceptibilidade das cepas de *S. aureus* de isolados clínicos.

2.2.3 Determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do conocarpano seus derivados e seus análogos, frente às cepas de *S. aureus* de isolados clínicos.

2.2.4 Avaliar a associação do conocarpano a antimicrobianos de uso clínico.



## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Conocarpano

O conocarpano é uma neolignana, obtida de diversas espécies de *Piper* pertencente à família Piperaceae que é considerada como uma das mais primitivas famílias entre as angiospermas, constituída por cerca de 10 a 12 gêneros e cerca de 1400 espécies (JOLY, 1998). Muitas dessas espécies têm sido utilizadas na alimentação e na medicina tradicional, o que levou ao isolamento de diferentes classes de produtos naturais biologicamente ativos tais como alcalóides, flavonóides e lignóides (PARMAR *et al.*, 1997), porém o conocarpano também pode ser ou obtido através de biossíntese sendo esta classificada como uma neolignana benzofurânica (SARTORELLI *et al.*, 2001).

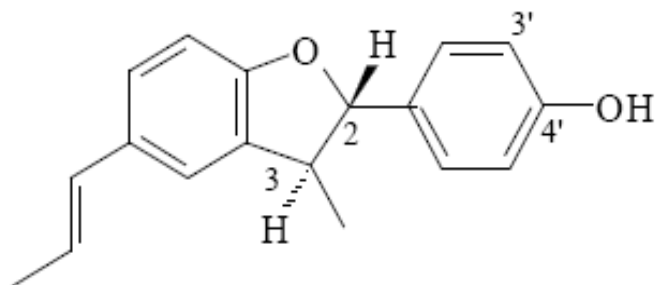
O termo lignana designa um conjunto de compostos naturais cujo esqueleto resulta da união de carbonos  $\beta$  na cadeia lateral, de duas unidades derivadas do 1-fenilpropano. Geralmente, se designa o termo neolignana ao conjunto de dímeros do 1-fenilpropano, onde a forma de união é diferente. As lignanas podem se diferenciar em seis grupos estruturais e as neolignanas, devido às enumeradas possibilidades de acoplamento, podem apresentar uma maior diversidade estrutural (em torno de quinze grupos estruturais diferentes). A distribuição das neolignanas é mais restrita do que as lignanas estando presente nas famílias Magnoliales, Piperales e Aristoloquiales (BRUNETON, 1991)

O termo neolignana foi concebido por Otto Richard Gottlieb para designar dímeros de fenilpropanóides ligados por outras posições que não as  $\beta$ - $\beta'$ . Em 1978 Gottlieb redefiniu o termo neolignana sob o ponto de vista quimiotaxonômico, onde neolignanas poderiam ser consideradas dímeros de propenil ou alilfenóis, visto que a sua ocorrência é restrita em *taxons* aparentados Magnoliaceae e Piperaceae. No entanto esta definição não tem sido completamente aceita por falta de dados biossintéticos, prevalecendo à definição de neolignanas como dímeros ligados por outras posições diferentes das  $\beta$ - $\beta'$  (GOTTLIEB, 1974; 1978, *apud* SARTORELLI *et al.*, 2001).

Considera-se que a biossíntese de lignanas e neolignanas envolve o acoplamento oxidativo mediado por enzimas estereoespecíficas, visto que a maioria dos que ocorrem naturalmente são opticamente ativos (SARTORELLI *et al.*, 2001). Diversas neolignanas isoladas de espécies de Piperaceae apresentaram atividades biológicas como anti-fator de agregação plaquetária, antifúngica e inseticida (CHAURET *et al.*, 1996; SARTORELLI *et al.*, 2001).

Em estudo prévio, Benevides, Sartorelli e Kato (1999) isolaram diferentes neolignanas presentes no extrato de acetato de etila das raízes de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC., dentre as quais conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6. Em estudos realizados por Freixa *et al.* (2001), Pessini *et al.* (2005) e De Campos *et al.* (2005) a substância conocarpano demonstrou atividade antifúngica frente a leveduras com concentração inibitória mínima (CIM) entre 6,3 e 25 µg/mL e atividade pronunciada frente a dermatófitos com CIM ≤ 1 a 9 µg/mL.

O conocarpano também demonstrou resultados relevantes para a atividade antibacteriana frente às bactérias Gram-positivas; *S. aureus* e *Bacillus subtilis* com CIM de 6,25 µg/mL (PESSINI *et al.*, 2003). Em estudos realizados por De Campos *et al.* (2007) o conocarpano demonstrou ser inativo contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), porém apresentou CIM entre 4 a 7 µg/mL frente às bactérias Gram-positivas, sendo que frente a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) a CIM foi de 4 µg/mL .



**Figura 1 : Estrutura do conocarpano**

### 3.2 *Staphylococcus aureus*

O nome dos estafilococos foi designado por Alexander Ogston após ter usado a expressão “*staphyle*” (conjunto das uvas). Os estafilococos são cocos Gram-positivos com cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, imóveis, aeróbios facultativos e fermentadores de glicose (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Estes microrganismos crescem nos meios de culturas mais comuns, apresentando capacidade de crescer em meio de cultura contendo 10% de cloreto de sódio, ou em meio quimicamente definidos, contendo glicose, aminoácidos, tiamina e ácido nicotínico (MURRAY *et al.*, 2000).

O gênero *Staphylococcus* contém cerca de trinta espécies diferentes e muitas fazem parte da microbiota normal (MURRAY *et al.*, 2000; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). É um importante patógeno do ser humano que pode provocar desde uma infecção cutânea de pouca importância até uma ampla gama de doenças, incluindo infecções sistêmicas potencialmente fatais, infecções oportunistas e doença das vias urinárias (TRABULSI *et al.*, 1999; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000; MURRAY *et al.*, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001; BARON, 2007; O’RIORDAN; LEE, 2004; KANAFANI; FOWLER, 2006). Além dessas infecções o *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações como intoxicação alimentar ou síndrome do choque tóxico (BARON; FINEGOLD, 1990; MURRAY *et al.*, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001; O’RIORDAN; LEE, 2004).

O microrganismo geralmente é associado com a colonização assintomática da pele e as superfícies mucosas dos seres humanos. Entretanto, o gênero *Staphylococcus* é também uma causa principal de infecções com potencial invasivo induzindo a osteomielites, endocardites, e bacteremia, conduzindo às infecções secundárias em alguns dos órgãos principais (O’RIORDAN; LEE, 2004).

As infecções ocorrem mais frequentemente, quando a pele ou as barreiras de proteção são rompidas, depois da inserção de um corpo estranho, em pacientes imunes comprometidos. Os traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea constituem-se na principal causa de mudança de comportamento deste

microrganismo, para agente etiológico mais comum das infecções cutâneas (ZAVADINACK-NETTO *et al.*, 2001; O'RIORDAN; LEE, 2004).

As principais espécies de estafilococos encontrados em seres humanos são os *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. O *S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, apresentando baixo potencial patogênico, assim como o *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da pele e da região periuretral do homem e da mulher. Ao contrário, o *S. aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e também nas fossas nasais (MURRAY *et al.*, 2000; KONEMAM *et al.*, 2001).

Tradicionalmente o gênero *Staphylococcus* é dividido em duas categorias: coagulase positivo e coagulase negativo. Esta divisão se baseia na capacidade de coagular os plasmas sangüíneos, que é uma propriedade considerada, há muito tempo, como importante marcador de patogenicidade dos *S. aureus*. O *S. aureus* representa a única espécie envolvida em infecções humanas, por conseqüência, todas as outras espécies, envolvidas em infecções humanas, são descritas como *Staphylococcus* coagulases-negativos (TRABULSI *et al.*, 1999; MURRAY *et al.*, 2000).

Os estafilococos são susceptíveis a altas temperaturas bem como desinfetantes e soluções anti-sépticas. Entretanto, estes microrganismos são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo em superfícies desidratadas. A transferência dos microrganismos pode ocorrer por contato direto ou através de fomites (MURRAY *et al.*, 2000).

Como os estafilococos são encontrados na pele e na nasofaringe, a eliminação das bactérias é comum, sendo responsável principalmente por muitas infecções hospitalares. O *S. aureus* é um dos patógenos hospitalares mais importantes e mais disseminados, representando a terceira causa mais comum de infecções sangüíneas, sendo também particularmente problemático em berçários. Além de *S. aureus*, outras espécies de *Staphylococcus* correspondem, atualmente, à maior causa coletiva de infecções sangüíneas adquiridas em hospitais, sendo também altamente prevalentes como agentes responsáveis por infecções de

ferimentos (ZAVADINACK-NETTO *et al.*, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

O *S. aureus* é um organismo versátil com diversos mecanismos de virulência, (KANAFANI; FOWLER, 2006), incluindo pelo menos cinco toxinas citolíticas ou produtoras de lesão da membrana, bem como uma toxina esfoliativa, e cinco enterotoxinas (KONEMAN *et al.*, 2001; SCHAECHTER *et al.*, 2002; O'RIORDAN; LEE, 2004; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir um exopolissacarídeo, chamado de cápsula, que pode impedir a fagocitose do microrganismo pelos leucócitos polimorfonucleares. Esta substância pode facilitar a aderência dos microrganismos às células dos hospedeiros e aos dispositivos protéicos. Outro fator de virulência do *S. aureus* é a proteína A, que está presente na parede celular e tem a capacidade de unir-se à região Fc da molécula de imunoglobulina G (IgG). Também a proteína G atua interferindo na opsonização e na ingestão dos microrganismos pelos leucócitos. Ainda, os constituintes da parede celular destes microrganismos, como os glicopeptídeos e ácido teicóico lhes conferem maior resistência, contribuindo para o fator de virulência. Outros fatores de virulência são: as enzimas (catalase, fibrinolisinases, hialuronidase, lipases e fosfolipase C específica para fosfatidilinoisitol), hemolisinas ( $\alpha$ -hemolisina,  $\beta$ -hemolisina,  $\delta$ -hemolisina e  $\tau$ -hemolisina) e as toxinas (leucocidina, exfoliatinas e as enterotoxinas A-E) (KONEMAN *et al.*, 2001; O'RIORDAN; LEE, 2004).

Embora o *S. aureus* possa ser suscetível à ação de vários fármacos ativos contra bactérias Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol), este microrganismo também é conhecido pela sua elevada capacidade em desenvolver resistência a diversos destes fármacos. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha do fármaco com base nos resultados de testes de suscetibilidade. A penicilina é o fármaco de escolha caso a linhagem seja sensível. As linhagens resistentes são produtoras de  $\beta$ -lactamase (penicilinase), uma enzima que inibe a ação do fármaco atuando no anel  $\beta$ -lactâmico do antimicrobiano, e são codificadas por

genes plasmidiais. O emprego de meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas, tais como a oxacilina, nafcilina e cloxacilina, resistentes à ação das penicilinases representou um avanço significativo na terapia antiestafilocócica. Porém a resistência a esses antimicrobianos foi detectada dois anos após o início da sua utilização (MURRAY *et al.*, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001).

### 3.3 Agentes antimicrobianos

O homem e os micróbios partilham uma vida em comum que se perde na sombra do tempo. Desde o princípio, os microrganismos provocam doenças nos homens, porém as causas destas doenças só começaram a serem descobertas no século XIX, a partir de 1878, embora só recentemente a natureza infecciosa de muitas doenças tenha sido descoberta. Desde o início da história da humanidade o homem utiliza diversas substâncias para combater as infecções decorrentes das doenças causadas pelos microrganismos (TAVARES, 1996).

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3.000 anos atrás, quando os médicos chineses utilizavam bolores, com ação antibacteriana e antifúngica, para tratar tumores inflamatórios e feridas infeccionadas, onde recomendavam usar emplastos com uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixa. A descoberta de novos agentes antimicrobianos costumava ser uma questão meramente casual (TAVARES, 1996). O empirismo reinou até a descoberta das bases microbiológicas da infecção, no século XX (as sulfonamidas, em 1936 e as penicilinas em 1939 (OLIVEIRA, 2001).

No início do século XX, surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. Os trabalhos pioneiros neste campo devem-se a Paul Ehrlich, que inclusive elaborou as primeiras teorias sobre o mecanismo de ação dos fármacos antimicrobianos. As descobertas de Ehrlich e seus contemporâneos revolucionaram a terapêutica e provocaram o desenvolvimento da pesquisa e da indústria químico-farmacêutica objetivando a obtenção de novas substâncias medicamentosas sintetizadas em laboratório. A finalidade era obter fármacos de baixa toxicidade, para

o homem, de tal modo que pudessem ser utilizadas nas infecções sistêmicas (TAVARES, 1996).

Segundo Souza *et al.* (2003) o agente terapêutico deve alcançar o sítio da infecção em concentração suficiente para inibir ou eliminar o agente infeccioso com toxicidade mínima para o hospedeiro. Assim, os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são agentes antimicrobianos, que podem ser classificados de acordo com o modo de como são obtidos.

Antibióticos, de *antibiosis*, são substâncias antiinfecciosas, de origem natural, produzidas metabolicamente por microrganismos, enquanto que os agentes "análogos dos antimicrobianos" são produzidos por vegetais ou animais e os quimioterápicos são substâncias antimicrobianas sintéticas (FONSECA, 1999).

Muitas variáveis influenciam no curso de uma determinada infecção e conseqüentemente na terapia que inclui a concentração do agente antimicrobiano, suas propriedades farmacológicas, a patologia da lesão e seu ambiente bioquímico, bem como o comportamento metabólico do microrganismo. Destes vários fatores, a susceptibilidade inerente dos microrganismos é o objeto para a medida direta *in vitro*, e fornece um ponto de referência para selecionar a terapia mais apropriada (BARON, 2007).

De modo geral, os agentes antibacterianos podem manifestar sua atividade por vários mecanismos, que podem ser descritos de forma resumida como (FONSECA, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003):

- Inibidores da respiração e/ou fosforilação oxidativa: As substâncias deste grupo não podem ser usadas na terapêutica, pois atuam em processos comuns a todas as células, são igualmente tóxicos para a bactéria e hospedeiro;

- Inibidores da síntese da parede celular: Por atuarem em estruturas não existentes nas células humanas, os agentes antimicrobianos com este local de ação são bastante seguros e amplamente utilizados. Estes atuam no processo de replicação celular, produzindo parede com "defeitos" estruturais;

- Inibidores das funções da membrana celular: Neste tipo enquandram-se dois tipos de ação. Os agentes hidrofóbicos, que agem produzindo desorganização da estrutura da membrana, e os, ionóforos, que produzem alterações na permeabilidade

da membrana, por modificações na distribuição de íons ou nos sistemas ativos de permeação por atuarem em estruturas comuns a todas as células, porém todos estes agentes são igualmente tóxicos para a bactéria e hospedeiro, sendo empregados clinicamente em escala limitada;

- Inibidores da síntese de ácidos nucléicos: A maioria destes agentes interage com o DNA, tendo pouca toxicidade seletiva e são geralmente empregados como agentes antitumorais, entretanto alguns podem ser usados por via sistêmica como antimicrobianos;

- Inibidores da síntese de proteínas: Os agentes com este local de ação podem atuar sobre a subunidade ribossômica maior ou menor, tanto em células procarióticas (subunidade 30S e 50S) quanto eucarióticas (subunidade 40S e 50S). Se eles se limitam a atuar em qualquer subunidade das células bacterianas, tem menor probabilidade de provocar efeitos tóxicos nos hospedeiros do que aqueles que atuam tanto em células procarióticas como eucarióticas.

Vários estudos foram realizados com a finalidade de conhecer o sítio de ação dos agentes antimicrobianos, porém estes estudos são relativamente complexos, pois várias modificações ocorrem nos microrganismos expostos a um agente antimicrobiano, tornando-se difícil o estabelecimento do local primário da lesão celular, levando como conseqüência, a deterioração das atividades vitais (PELCZAR; CHAN, 1993).

Os antimicrobianos são produzidos, na sua grande maioria, por microrganismos como os fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Micromonospora* e de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* (TAVARES, 1996), que fazem a síntese total ou parcial das moléculas. No caso, de síntese parcial, as moléculas são concluídas em laboratório a fim de aprimorar as propriedades antimicrobianas ou farmacológicas (MIMS *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999).

As plantas também têm sido alvo de investigações para a obtenção de compostos ou substâncias com atividade antimicrobiana. O uso de plantas medicinais no mundo, e especial na América do Sul, tem contribuído significativamente para o cuidado de saúde. Muitas plantas são usadas no Brasil em



forma de extratos, infusão ou de emplastos para tratar infecções comuns sem nenhuma evidência científica da eficácia (HOLETZ *et al.*, 2002).

Os produtos naturais são considerados uma importante fonte de novos agentes antimicrobianos. Os fármacos que derivaram dos produtos naturais, modificadas ou fármacos semi-sintéticos das fontes naturais corresponderam a 78% das drogas novas aprovadas pelo FDA entre 1983 e 1994 (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997).

As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversas substâncias, incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, quinonas, terpenos, polipeptídeos, polifenóis além de óleos essenciais que, por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas, porém muitos destes compostos já demonstraram atividade antimicrobiana (CLARKE *et al.*, 2001; COWAN, 1999; SIMÕES, 1998).

Outro aspecto relevante é a possibilidade de uma substância de origem natural ser utilizada em associações como outros antimicrobianos, tendo como maior motivação à ampliação do espectro de ação ou a intensificação da atividade antimicrobiana. Alguns estudos têm mostrado que além de atividades sobre um determinado microrganismo, substâncias obtidas de plantas apresentam também atividade contra linhagens de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, como também o efeito sinérgico entre substâncias de plantas associadas a outras substâncias vegetais, ou ainda a antimicrobianos inativos, potencializando sua atividade (TSUCHIYA *et al.*, 1996, BELOFSKY *et al.*, 2004; FERNANDES Jr. *et al.*, 2005; BETONI *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2007; HORIUCHI *et al.*, 2007).

### **3.4 Resistência bacteriana**

Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica e específica, Ehrlich e colaboradores, em 1907, verificaram que a resistência podia ocorrer em elementos de uma mesma população microbiana,

observando que em culturas de tripanossomas tratados com arsênico ou com determinados corantes havia a sobrevivência de alguns exemplares da mesma colônia. O advento do uso clínico de sulfonamidas, em 1933, e, em seguida, da penicilina, em 1941, levou à constatação de que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 1996).

Durante toda a história houve uma batalha contínua entre seres humanos e os microrganismos que causam infecção e a doença. A peste bubônica, tuberculose, malária e mais recentemente, a síndrome de imunodeficiência adquirida, afetaram parcelas substanciais da população humana, causando morbidade e mortalidade em números significativos. No século XX, houve um avanço no desenvolvimento de antimicrobianos que ajudaram no tratamento de várias infecções, porém a euforia da descoberta de agentes antimicrobianos no combate as infecções foi vivida brevemente, pois as bactérias responderam rapidamente manifestando vários mecanismos de resistência a estes antimicrobianos. Assim a resistência bacteriana demonstrou ser um fator importante a ser considerado, visto que o nível e a complexidade dos mecanismos de resistência exibidos pelos patógenos bacterianos sempre aumenta (TENOVER, 2006).

A disseminação da resistência aos antimicrobianos está diretamente associada ao uso extensivo e inapropriado de drogas antimicrobianas e conduz ao rápido desenvolvimento de resistência específica ao fármaco por microrganismos causadores de doenças. A descoberta e o uso clínico de vários antimicrobianos conhecidos é concomitante ao surgimento de bactérias que resistem à sua ação (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A resistência bacteriana é uma resposta evolucionária inevitável ao uso de antimicrobianos. Este fenômeno da alteração de patógenos susceptíveis por uma espécie mais resistente continua até os dias de hoje, principalmente em ambientes hospitalares (FRENCH, 2005).

A administração dos antimicrobianos tem o efeito de alterar a flora microbiana humana normal, diminuindo o número de organismos susceptíveis, porém

aumentando conseqüentemente os números de organismos resistentes (HARDY *et al.*, 2004), entretanto desde o início do uso dos antimicrobianos, observou-se grande queda na morbidade de várias infecções; paralelamente começaram a surgir cepas bacterianas resistentes ao fármaco. Desde então, foi observado a repetidas descobertas de novos antimicrobianos, cada vez mais caros e com espectro mais ampliado, sempre acompanhado do rápido aparecimento de resistência bacteriana. O uso abusivo e errôneo de antimicrobianos, tanto em nível hospitalar quanto ambulatorial, tem sido considerado como o principal fator associado ao desenvolvimento de resistência bacteriana, quanto maior a dose e a duração do uso de antimicrobianos, maior o risco de colonização e infecção por bactérias multirresistentes (OLIVEIRA, 2001; FRENCH, 2005; TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana causa enormes problemas terapêuticos com implicações na saúde pública. Muitas bactérias possuem resistência intrínseca a vários grupos de antimicrobianos; mas o problema da resistência aos antimicrobianos é colocado, quando emerge por alterações genéticas, quando as bactérias sofrem mutações originando formas resistentes (SOARES, 2001).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos fármacos. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no germe durante seu processo reprodutivo e que resultam de erros de cópia na seqüência de bases que formam o DNA, responsáveis pelo código genético (TAVARES, 1996).

As bactérias se tornam resistentes aos antimicrobianos em virtude de alterações no seu DNA cromossomal (resistência por mutação) ou de aquisição de DNA extracromossomal (resistência transferível). Estas duas ocorrências básicas promovem a síntese de enzimas e de outras proteínas que inativam os antimicrobianos ou impedem o seu acesso ao local de ação. A predominância de cepas resistentes em uma população bacteriana inicialmente sensível pode ser conseqüência da administração excessiva de antimicrobianos (ZANON; NEVES, 1987).

Os microrganismos adquirem resistência através de diversos mecanismos, entretanto, os clinicamente relevantes incluem a síntese de enzimas que inativam o fármaco, prevenção do acesso ao sítio alvo (inibição da absorção ou aumento da excreção) ou modificação do sítio alvo (BLACK, 1996; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Wright (2005), descreve que a resistência antimicrobiana pode ocorrer através de três mecanismos principais: alteração da interação da droga com o sítio alvo, bomba de efluxo e destruição ou modificação direta do fármaco, porém existem outros mecanismos que inativam o antimicrobiano, incluindo a hidrólise, a transferência do grupo ativo, e mecanismo redox.

A alteração no sítio alvo do agente antimicrobiano é um mecanismo comum de resistência. O sítio alvo muda freqüentemente como resultado da mutação espontânea de um gene bacteriano no cromossomo e da seleção de cepas resistentes. Os exemplos incluem mutação na RNA polimerase e na DNA girase tendo por resultado a resistência às rifampicinas e às quinolonas, respectivamente. Em outros casos, a aquisição da resistência pode envolver transferência de genes de resistência de outros organismos por algum mecanismo de troca genética (conjugação, transdução ou transformação). Os exemplos destes mecanismos incluem a aquisição dos genes do *mecA* que codificam a resistência do *S. aureus* à meticilina (LAMBERT, 2005).

A alteração na permeabilidade da membrana e a ativação da bomba de efluxo são dois mecanismos de resistência que foram encontrados em várias infecções ocasionadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, sugerindo que estes mecanismos podem ser bons alvos para novas drogas (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

Tem sido observado que alguns antimicrobianos podem ser indutores de resistência em determinadas espécies bacterianas. Este fenômeno manifesta-se principalmente com os novos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporinas das segunda e terceira gerações, carbapenemas e outros) e é descrito, sobretudo com bacilos gram-negativos dos gêneros *Serratia*, *Citrobacter*; *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*. A emergência da resistência entre estes microrganismos durante a terapêutica com aqueles antimicrobianos resulta da desrepressão de

genes cromossômicos previamente existentes no microrganismo, os quais comandam a produção de enzimas ou regulam o funcionamento de sítios de ação dos antimicrobianos (TAVARES, 1996).

Com relação ao *S. aureus*, foi observado uma significativa redução na taxa de mortalidade provocada por infecções causadas por este microrganismo em decorrência ao advento dos antimicrobianos, porém estas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a todos os agentes antimicrobianos produzidos (HARDY *et al.*, 2004).

Há basicamente dois mecanismos responsáveis pela resistência de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos que possuem anel  $\beta$ -lactâmico. Um mecanismo é a produção de  $\beta$ -lactamases, que são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à penicilina e que levaram ao desenvolvimento de penicilinas antiestafilocócicas, ou seja, penicilinas semi-sintéticas. A meticilina era um destes compostos e foi introduzida na prática clínica em 1959, sendo estável à destruição pela  $\beta$ -lactamases bacteriana, resistente às  $\beta$ -lactamases. Outro mecanismo é uma alteração nas proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs). Além disso, a resistência pode ser devida a alterações na permeabilidade, impedindo o antimicrobiano de atingir o seu receptor (UTSUI; YAKOTA, 1985; TOMASZ; NACHMAN; LEAF, 1991).

A introdução da penicilina no tratamento das infecções causadas por *S. aureus* reduziu de maneira importante nas infecções ocasionadas por este microrganismo. Porém, na Inglaterra se observou que aproximadamente 60% de estafilococos isolados foram resistentes à penicilina, e posteriormente os *S. aureus* isolados demonstraram níveis mais elevados de resistência. Os primeiros isolados clínicos de *S. aureus* multirresistentes foram detectados em 1957, e em 1960 os estafilococos tinham adquirido resistência para a grande maioria dos antimicrobianos disponíveis (JESSEN *et al.*, 1999 *apud* VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

*S. aureus* é naturalmente susceptível a muitas classes dos antimicrobianos, entretanto, também apresenta uma grande habilidade de desenvolver resistências múltiplas. A resistência do *S. aureus* a penicilina devido à produção do penicilinase apareceu logo após a introdução da penicilina e afetava 85% dos microrganismos isolados dos hospitais e na comunidade (FRENCH, 2005).

No Brasil, acima de 80% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e cerca de 70% dos isolados de pacientes da comunidade apresentam resistência às penicilinas naturais e, por extensão, a ampicilina e amoxicilina (TAVARES, 2000). Em praticamente todas as partes do mundo, os estafilococos comunitários, sejam coagulase-positivo ou coagulase-negativo, mostram elevada resistência (acima de 70%) a benzilpenicilina (penicilina G); bem como à penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina. Para combater estes estafilococos foram descobertas as penicilinas antiestafilocócicas, tais como a meticilina e a oxacilina e seus derivados, e as cefalosporinas da primeira e segunda gerações. Entretanto, ainda no início da década de 60 os *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) emergiu como um patógeno nosocomial (BARBER, 1961; KALLINGS, 1962; LANE, 1962).

Enquanto as bactérias resistentes continuarem a aumentar, novos problemas de resistência continuarão a emergir, complicando e impedindo o tratamento de doenças infecciosas. O problema da resistência abrange não somente as bactérias, mas também infecções fúngicas, virais e parasíticas. O diagnóstico correto dos agentes responsáveis pela infecção, identificando o microrganismo e a seleção apropriada da terapia para o tratamento destas infecções assegura o uso rápido e eficaz dos agentes antimicrobianos (LEVY, 2005).

Quando a eficácia da penicilina foi inicialmente avaliada, a sensibilidade deste microrganismo era de 95% (MARTIN, 1967). Entretanto, esse número diminuiu progressivamente nas décadas seguintes, como pode ser observado em relato de 1969 por Harris e Wise (1969), que encontraram 62,3% de microrganismos sensíveis. Esse nível de sensibilidade fez com que Martin (1967) ainda considerasse as penicilinas como fármacos de escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus*. Entretanto, Wood e Wolinsky (1971) encontraram apenas 27% de cepas sensíveis às penicilinas, número muito parecido com os 26% relatados por Ross *et al.* (1974), em infecções comunitárias de crianças, colocando em questionamento a indicação deste antimicrobiano para o tratamento de infecções por *S. aureus*. (ZAVADINACK-NETTO *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Hughes *et al.* (1976), demonstravam diminuição para 15 % de sensibilidade das cepas de *S. aureus*, isoladas de infecções comunitárias,

demonstrando crescente aquisição de resistência. Com relação a outros antimicrobianos, este microrganismo apresentava sensibilidade que varia de 80 a 100%, dependendo do agente antimicrobiano como eritromicina, lincomicina, oxacilina, aminoglicosídeos, rifampicina ou fármacos mais eficazes como a vancomicina e derivados. O monitoramento permanente do perfil de susceptibilidade deste microrganismo em ambiente hospitalar é imperativa, entretanto, é necessário conhecer o perfil nas infecções comunitárias, pois o uso indiscriminado de antimicrobianos poderá mudar o comportamento deste microrganismo, como tem ocorrido em relação à penicilina (ZAVADINACK-NETTO *et al.*, 2001).

Em 1996, porém, ocorreu o surgimento de estirpes de *S. aureus* com reduzida sensibilidade à vancomicina (CIM > 8-16 µg/mL), inicialmente no Japão e a seguir nos Estados Unidos da América e atualmente pode ser encontrado em outras países. Estes estafilococos chamados inicialmente de VISA e GISA (siglas em inglês indicando *Staphylococcus aureus* (SA) com resistência intermediária à vancomicina ou aos glicopeptídeos), são atualmente denominados simplesmente de VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a Vancomicina) e encontram-se em expansão em hospitais japoneses. Seu mecanismo de resistência está relacionado a uma ativação da síntese da parede celular, havendo hiperprodução das proteínas ligadoras de penicilinas, espessamento da parede celular e o aprisionamento das drogas pela hiperprodução de componentes da parede. Estafilococos com resistência aos glicopeptídeos foram encontrados no Brasil, registrando-se o isolamento de *S. aureus* resistentes a vancomicina em casos no Rio de Janeiro e casos de estafilococos coagulase-negativos resistentes a vancomicina e/ou teicoplanina em São Paulo (TAVARES, 2000).

As novas classes do antimicrobiano utilizadas nestes casos específicos são a linezolid e a oxazolidinona. Mais recentemente, a daptomicina foi introduzida na prática clínica nos EUA em 2003 e na Europa no ano de 2006, sendo esperado que estes agentes novos ajudem a combater as cepas resistentes de *S. aureus* (SCHITO, 2006).

Uma possibilidade para reduzir a resistência bacteriana é a utilização de múltiplas substâncias para tratar uma infecção. Apesar de tratamentos empregando

combinações de antimicrobianos em doses subterapêuticas possibilitarem o surgimento de cepas multirresistentes, é mais difícil que bactérias desenvolvam resistência a duas substâncias com diferentes mecanismos que a um único agente, quando o tratamento é realizado de forma adequada. A aplicação de combinações de antibióticos de ação sinérgica já vem sendo adotada há anos, como a clássica combinação clavulanato-amoxicilina (Clavulin®), ainda hoje uma arma eficiente contra grande parte das infecções bacterianas adquiridas em comunidade. Torna-se importante que estudos sejam realizados objetivando o desenvolvimento ou a possibilidade de substâncias serem administradas em conjunto (SILVEIRA *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma crise global emergente e a compreensão dos mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias para a terapia anti-infecciosa (KUMAR; SCHWEIZER, 2005), bem como a pesquisa, descoberta e produção de novos agentes antimicrobianos revelam-se crescentes e necessárias. O surgimento de microrganismos resistentes pode acontecer facilmente e é um risco clínico de importância relevante. Processos genéticos de seletividade podem conduzir ao aparecimento de “supermicrobios”. As medidas defensivas a serem tomadas incluem a busca por novos agentes antimicrobianos (TAVARES 1996; MIMS *et al.*, 1999; LIMA, 2001; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

### **3.5 Teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro***

O teste de susceptibilidade aos fármacos é indicado sempre que se isola o microrganismo e se deseja saber a sua sensibilidade frente a diversos agentes antibacterianos.

A sensibilidade dos microrganismos à ação dos fármacos antimicrobianos pode ser determinada *in vitro* por meio do antibiograma. O teste pode ser utilizado para a verificação do efeito bactericida, ou seja, efeito letal, ou efeito bacteriostático ou seja, efeito de inibir o crescimento do microrganismo, bem como para a demonstração das drogas que exercem estes efeitos. O antibiograma consiste no



cultivo do microrganismo, cuja sensibilidade se quer avaliar, em presença de um ou vários antimicrobianos, verificando-se a ausência de desenvolvimento do microrganismo no meio onde estão presentes as drogas ativas (TAVARES, 1996; SOUZA, *et al.*, 2003). A atividade antimicrobiana é medida *in vitro* para determinar a sensibilidade de um microrganismo a concentrações conhecidas de determinado agente antimicrobiano (JORGE, 1997).

Os testes têm sido realizados por meio de duas metodologias, a difusão em ágar e a diluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ou bactericida mínima (CBM) (SERUFO; CLEMENTE, 2001).

No teste de difusão a informação obtida é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microrganismo, mas não para estabelecer uma comparação da potência antimicrobiana. O método apresenta problemas com as substâncias que não se difundem no meio (SOUZA *et al.*, 2003).

O método de diluição pode ser realizado em meios de cultura líquidos ou sólidos. Consiste na preparação de diluições sucessivas do antimicrobiano, semeando frente a cada diluição o inóculo bacteriano em número padronizado e após a incubação, verificar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu a multiplicação bacteriana (TRABULSI *et al.*, 1999).

Vários fatores podem limitar ou falsear o resultado dos testes que medem a atividade antimicrobiana *in vitro*, como o meio de cultivo empregado, que deve ser apropriado, sem haver interferência dos seus componentes sobre a atividade da droga, o pH do meio, a temperatura e a atmosfera de incubação, o tamanho do inóculo, a concentração da droga que deve ser padronizada (TAVARES, 1996).

Mediante a importância da descoberta de produtos com eficácia comprovada para tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes, o presente trabalho teve como propósito demonstrar através da avaliação antimicrobiana, a propriedade antibacteriana do conocarpano seus derivados e análogos frente a cepas de *S. aureus* resistentes.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção do conocarpano e seus derivados e análogos.**

A substância conocarpano seus derivados acetilado, benzoilado e metilado e os análogos  $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol (figura 3) foram obtidos e cedidos por Dr<sup>a</sup>. Rosi Zanoni da Silva orientada pelos Professores Dr. Rosendo Augusto Yunes e Dr. Valdir Cechinel Filho, no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As substâncias foram obtidas através de síntese química e alterações estruturais.

### **4.2 Material microbiológico**

As cepas das bactérias utilizadas foram 24, fornecidas por um laboratório de Análises Clínicas de um Hospital do município de Itajaí, SC, sendo submetidas à confirmação da espécie bacteriana.

#### **4.2.1 Isolamento e identificação dos microrganismos**

A confirmação da espécie bacteriana das 24 cepas bacterianas Gram-positivo resistentes fornecidas por um laboratório de Análises Clínicas de um Hospital do município de Itajaí, SC, foi realizada através de testes clássicos de identificação como: coloração de Gram, prova de catalase, prova de coagulase, isolamento em ágar Baird-Parker, ágar Vogel Johnson e ágar Manitol como padronizados pelo NCCLS, 1993 (atualmente CLSI) como descrito em Koneman *et al.* (2001). Também foi empregado um Kit de identificação para cocos Gram-positivos (BBL Cristal/BD) e interpretado conforme orientações do fornecedor.

Vinte cepas que apresentaram resultado positivo para *S. aureus* foram selecionadas para a avaliação da atividade antimicrobiana do conocarpano, seus derivados e análogos, estas cepas foram mantidas em ágar nutriente e conservadas

sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI, sendo repicadas em intervalos de 30 dias para manter as colônias viáveis.

As cepas que confirmaram o resultado para a espécie *S.aureus* foram posteriormente submetidas ao ensaio de susceptibilidade a antibacterianos (antibiograma) para obtenção do perfil de resistência e determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM, respectivamente) para cada cepa isolada.

#### **4.2.2 Manutenção dos microrganismos**

As cepas bacterianas foram mantidas em ágar nutriente e conservadas sob refrigeração (4 °C) no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do curso de Farmácia da UNIVALI.

Para o preparo dos inóculos bacterianos, foram utilizadas as cepas de *S. aureus* de isolados clínicos, denominadas com a inicial “S” e o número seqüencial.

Cada cepa da bactéria foi transferida do meio de manutenção para o meio BHI por 24 horas, para a ativação da respectiva cultura, posteriormente a cepa bacteriana foi estriada em ágar Mueller-Hinton (MERCK) e incubada a 37°C por 18-24 horas.

### **4.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**

#### **4.3.1 Preparo dos inóculos**

Para o preparo do inóculo foram selecionados de 4 a 5 colônias da bactéria isolada em ágar Mueller-Hinton e transferida para tubo de ensaio com 5 mL de solução NaCl 0,86% estéril, seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada por espectrofotometria a 520 nm, por comparação com a escala de 0,5 de McFarland (CLSI, 2005).

O inóculo final para o ensaio de antibiograma foi de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células/mL, enquanto que para o ensaio da CIM, o inóculo final foi entre 1 a  $5 \times 10^5$  células/mL para alcançar entre 1 e  $5 \times 10^3$  células em cada diluição (100  $\mu$ L) (NCCLS, 1993).

#### **4.3.2 Difusão radial em ágar**

A avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos foi realizada pelo ensaio de difusão radial em ágar, como preconizado por CLSI (2005). Os procedimentos foram uniformizados e padronizados para que resultados satisfatórios fossem obtidos. O meio de cultura utilizado foi o ágar Mueller-Hinton em quantidade suficiente para a obtenção de uma espessura uniforme de meio (5 mm).

Com auxílio de zaragatoa (*swab*) foi inoculada a suspensão da cepa bacteriana na placa, sendo posteriormente colocado os discos com antimicrobiano. Os antimicrobianos testados foram: vancomicina 30  $\mu$ g, ampicilina 10  $\mu$ g, eritromicina 15  $\mu$ g, sulfazotrina 25  $\mu$ g, gentamicina 10  $\mu$ g, cefoxitina 30  $\mu$ g, penicilina G 10 U, oxacilina 1  $\mu$ g, tetraciclina 30  $\mu$ g, amoxicilina 10  $\mu$ g, clindamicina 2  $\mu$ g e cefalotina 30  $\mu$ g. Todos os antimicrobianos foram obtidos da Laborclin. Posteriormente as placas foram incubadas entre 35 e 37 °C.

Depois de completado o tempo de incubação (18 a 24 horas), foi medido os diâmetros dos halos de inibição, determinando a sensibilidade aos antimicrobianos, por comparação com padrões descritos em CLSI, 2005 (tabela 1).

**Tabela 1:** Padrões interpretativos de diâmetros do halo de inibição para *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobiano	Conteúdo do disco	Diâmetro do Halo de Inibição em mm		
		R	I	S
<b>Ampicilina</b>	10 µg	≤ 28	-	≥ 29
<b>Amoxicilina</b>	10 µg	≤ 28	-	≥ 29
<b>Cefalotina</b>	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
<b>Cefoxitina</b>	30 µg	≤ 24	-	≥ 25
<b>Clindamicina</b>	2 µg	≤ 14	15-20	≥ 21
<b>Eritromicina</b>	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23
<b>Gentamicina</b>	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
<b>Oxacilina</b>	1 µg	≤ 10	11-12	≥ 13
<b>Penicilina G</b>	10 U	≤ 28	-	≥ 29
<b>Sulfazotrina</b>	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
<b>Tetraciclina</b>	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
<b>Vancomicina</b>	30 µg	-	-	≥ 15

Legenda: R (resistente); I (intermediário); S (sensível); U (unidade).

Fonte: CLSI, 2005.

#### **4.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM)**

O método consistiu na preparação de diluições sucessivas da amostra a ser testada (conocarpano, conocarpano acetilado, conocarpano benzoilado, conocarpano metilado,  $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol), em meio de cultura BHI (caldo cérebro coração). Após semeadura da cepa bacteriana em estudo e o tempo necessário para incubação, é verificada a menor concentração da amostra foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo utilizado no ensaio.

Os valores da CIM foram determinados através do método de microdiluição conforme descrito em NCCLS (1993), utilizando BHI como meio de cultura. As substâncias conocarpano, seus derivados (acetilado, benzoilado e metilado) e análogos ( $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol), foram dissolvidas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada (4:6) e posterior diluição em placa de microdiluição atingindo concentrações que variaram de 0,05 a 30  $\mu\text{g/mL}$ , bem como também foi testado o intervalo entre 100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Após a adição do inóculo bacteriano, previamente preparado conforme descrito no item 4.3.1, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 12 horas.

A CIM foi determinada em espectrofotômetro Drake/QUICK ELISA a 405 nm, sendo determinada a CIM como a menor ou igual concentração que apresentou densidade óptica menor ou igual à densidade óptica do tempo zero. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.3.4 Concentração bactericida mínima (CBM)**

Para determinar a concentração bactericida mínima, com auxílio de replicador (sigma), as culturas do ensaio de CIM (item 4.3.3) foram submetidas à suas respectivas subculturas em meio ágar Mueller-Hinton, isento de amostra e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. Após a incubação as culturas foram inspecionadas para a verificação visual do crescimento microbiano.

Para a interpretação dos resultados é considerado que, a inibição no ensaio de CIM e crescimento do microrganismo na subcultura (CBM) significou ação bacteriostática, e a ausência de crescimento na subcultura significou ação bactericida (BARON; FINEGOLD, 1990).

#### **4.3.5 Avaliação da associação dos antimicrobianos**

A avaliação da associação dos antimicrobianos com a substância conocarpano, foi realizada pelo método de difusão radial em ágar, como descrito no item 4.3.2, com modificações. O método da difusão foi realizado em meio ágar Mueller-Hinton preparados com adição de conocarpano em concentrações que

variaram de 1 a 4  $\mu\text{g/mL}$  e da mesma forma foram utilizados discos dos agentes antimicrobianos frente ao inóculo das cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* .

Os antimicrobianos testados foram os mesmos descritos no item 4.3.2.

Depois de completado o tempo de incubação (18 a 24 horas), foram medidos os diâmetros dos halos de inibição.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Seleção das cepas resistentes**

Das 24 cepas fornecidas pelo laboratório de análises clínicas, 20 revelaram cepas com características de *S. aureus*. As 4 cepas restantes foram identificadas como sendo do gênero estreptococos.

Para a determinação do perfil de resistência destas 20 cepas foi realizado o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *S. aureus* resistentes obtidas de isolado clínico.

#### **5.1.1 Perfil de resistência das cepas bacterianas**

O teste de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos é uma das funções preliminares de um laboratório de diagnóstico microbiológico. Os resultados têm implicações terapêuticas importantes para o paciente e para a sociedade, permitindo a identificação das bactérias resistentes e fornecendo uma base fundamental para medidas de controle da infecção e escolha adequada da terapia a ser adotada (SUNDSFJORD *et al.*, 2004). A seleção de antimicrobianos no estudo da susceptibilidade *in vitro* tem como objetivo definir adequadamente a melhor opção do agente antimicrobiano para o tratamento das terapias antimicrobianas, promovendo o uso racional destes agentes (GONZÁLEZ, 2002).

Considerando que a proposta deste trabalho foi a avaliação antimicrobiana do conocarpano seus derivados e análogos frente às cepas de *S. aureus* com perfil de resistência aos antimicrobianos tradicionais, a determinação do perfil de resistência das cepas isoladas do ambiente hospitalar foi de fundamental importância.

O perfil de resistência consistiu no cultivo das cepas bacterianas isoladas, cuja sensibilidade se avaliou em presença de vários agentes antimicrobianos, verificando-se a ausência de desenvolvimento do microrganismo no meio onde estava presente uma seleção dos antimicrobianos mais usados na clínica.



O antibiograma foi utilizado para averiguar a sensibilidade das cepas isoladas do ambiente hospitalar devido a grande variabilidade na resistência.

Como critério para escolha das cepas à serem empregadas nos testes da atividade antimicrobiana foram selecionadas as cepas bacterianas que apresentaram resistência à pelo menos um dos 12 antimicrobianos testados. A verificação do perfil de resistência aos antimicrobianos empregou o método da difusão radial em ágar (antibiograma) que permite classificar as cepas em *resistente*, *intermediária* ou *sensível* aos antimicrobianos testados, de acordo com as normas preconizadas pelo CLSI (2005) (tabela 1).

Os termos *sensível*, *intermediário* ou *resistente*, oriundos das mensurações dos diâmetros dos halos de inibição, correlacionam-se com o grau de sensibilidade ao antimicrobiano empregado e são interpretados da seguinte maneira: *sensível* sugere que a cepa pode ser adequadamente tratada com as doses usualmente recomendadas; *intermediário* ocorre quando o diâmetro do halo encontra-se próximo ao resistente e *resistente* quando os microrganismos não são inibidos pelas concentrações usuais de antimicrobiano (CLSI, 2005).

Os resultados do perfil de resistência aos antimicrobianos para as cepas de *S. aureus* isoladas do ambiente hospitalar são apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2:** Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus*, obtidas de material clínico, de acordo com CLSI, 2005.

Cepa	Antimicrobiano											
	VAN	AMP	ERI	SUT	GEN	CFO	PEN	OXA	TET	AMO	CLI	CFL
S01	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
S02	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
S03	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
S04	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
S05	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S06	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S07	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S08	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S09	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S10	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S11	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S12	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S13	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
S14	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S15	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S16	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	I
S17	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S18	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	I	R
S19	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S
S20	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S

Legenda: VAN (Vancomicina 30 µg); AMP (Ampicilina 10 µg); ERI (Eritromicina 15 µg); SUT (Sulfazotrina 25 µg); GEN (Gentamicina 10 µg); CFO (Cefoxitina 30 µg); PEN (Penicilina G 10 U); OXA (Oxacilina 1 µg); TET (Tetraciclina 30 µg); AMO (Amoxicilina 10 µg); CLI (Clindamicina 2 µg); CFL (Cefalotina 30 µg); R (Resistente); I (Intermediário); S (Sensível).

A crescente aquisição de resistência aos antimicrobianos vem preocupando os pesquisadores há décadas, pois embora os primeiros trabalhos a estudar o uso de penicilina no tratamento de infecções por *S. aureus* relatassem sensibilidade de 95% na década de 50 (MARTIN, 1967), essa alta sensibilidade foi diminuindo progressivamente. Em 1970 estudos demonstraram que 85% das cepas de *S. aureus* do ambiente hospitalar e de ocorrência comunitária apresentavam resistência as penicilinas (FRENCH, 2005).

A determinação do perfil de susceptibilidade das cepas bacterianas isoladas do ambiente hospitalar, mostrou que 50% das cepas foram resistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos testados, exceto a vancomicina, que foi o único antimicrobiano capaz de inibir todas as cepas testadas.

A vancomicina é um antimicrobiano glicopeptídico usado no tratamento das infecções bacterianas. Geralmente é o antimicrobiano utilizado na terapia contra *S. aureus*, como último recurso em casos de multirresistência (GONZÁLEZ-PIÑERA, 1998; SUNDSFJORD *et al.*, 2004).

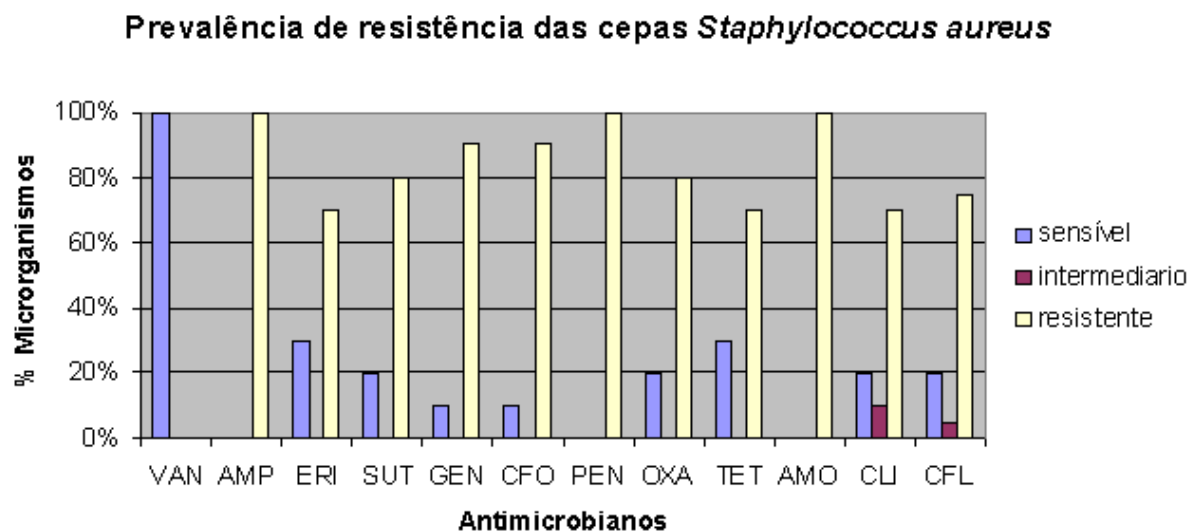
Todas as 20 cepas testadas apresentaram resistência à penicilina G, ampicilina e amoxicilina, provavelmente relacionada à presença da enzima  $\beta$ -lactamase, esta enzima hidrolisa a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, causando inativação do antimicrobiano frente aos microrganismos (SOARES, 2001; RAYNER; MUNCKHOF, 2005; TENOVER, 2006). O resultado encontrado corrobora com os resultados demonstrado por Tavares (2000) sugerindo que as cepas selecionadas de isolados clínicos produzem  $\beta$ -lactamases, inativando assim os antimicrobianos que apresentam na sua estrutura o anel  $\beta$ -lactâmico.

As cepas de *S. aureus* de isolados clínicos testados apresentaram maior prevalência de microrganismos resistentes a oxacilina (80%) quando comparado com os resultados relatados por Tavares (2000), Sader *et al.* (2001) e French (2005), que demonstraram valores entre 30 e 66%. A oxacilina, por ser uma penicilina sintética que apresenta na sua cadeia lateral um radical fenil preso à estrutura isoxazolil, torna este antimicrobiano mais protegido da ação das  $\beta$ -lactamases, provavelmente através do bloqueio no ponto de ligação destas enzimas com a penicilina, porém os estafilococos já desenvolveram outro mecanismo de resistência, através da alteração nas proteínas fixadoras de penicilinas, alterando o sítio de ação (TAVARES, 1996, MURRAY, 2000).

Segundo Tavares (2000), os estafilococos resistentes aos  $\beta$ -lactâmico, penicilinas-resistentes (metecilina e oxacilina) freqüentemente mostram-se também resistentes aos macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, clindamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim. Este achado também foi observado no presente estudo, através da determinação do perfil de resistência, demonstrando a

multirresistência aos antimicrobianos testados frente às cepas bacterianas isoladas do ambiente hospitalar, sendo que é comum um determinado microrganismo apresentar resistência a diversos antimicrobianos, principalmente os da mesma classe terapêutica. Os valores da prevalência das cepas resistentes a um determinado antimicrobiano variam significativamente dependendo da comunidade (SADER *et al.*, 2004).

Como pode ser observado na figura 2, 70% das cepas de *S. aureus* apresentaram resistência aos antimicrobianos tetraciclina, eritromicina e clindamicina, 75% das cepas foram resistentes à cefalotina, 80% das cepas apresentaram resistência ao sulfazotrina, 90% demonstraram resistência a cefoxitina e gentamicina.



Legenda: VAN (Vancomicina 30 $\mu$ g); AMP (Ampicilina 10  $\mu$ g); ERI (Eritromicina 15  $\mu$ g); SUT (Sulfazotrina 25  $\mu$ g); GEN (Gentamicina 10  $\mu$ g); CFO (Cefoxitina 30  $\mu$ g); PEN (Penicilina G 10 U); OXA (Oxacilina 1 $\mu$ g); TET (Tetraciclina 30  $\mu$ g); AMO (Amoxicilina 10  $\mu$ g); CLI (Clindamicina 2  $\mu$ g); CFL (Cefalotina 30  $\mu$ g).

**Figura 2: Gráfico da prevalência de resistência das cepas de *S. aureus* de isolados clínicos frente aos antimicrobianos.**

A determinação da susceptibilidade das cepas *S.aureus* obtidas de isolados clínicos permitiu a comprovação da resistência bacteriana frente aos antimicrobianos testados e conseqüentemente à seleção dos microrganismos para a realização dos testes da avaliação da atividade antimicrobiana do conocarpano, seus derivados e análogos.

## 5.2 Atividade antibacteriana

As propriedades antimicrobianas dos compostos ou substâncias obtidas de origem vegetal tem sido confirmadas através de intensas pesquisas em todo o mundo. Estas propriedades geralmente são estudadas, avaliadas e confirmadas, ou não, através de ensaios *in vitro*, como o teste de susceptibilidade. Em relação aos microrganismos, geralmente são selecionadas cepas padronizadas, porém em alguns casos podem-se utilizar microrganismos isolados de materiais biológicos (RIOS; RECIO, 2005; SOUZA *et al.*, 2003; MITSCHER, 1972), com o propósito de conhecer a possível ação da substância frente a cepas que podem ter alterações genéticas ou bioquímicas.

A investigação de possíveis produtos de origem natural que possam estar agindo como agentes antimicrobianos, principalmente frente a microrganismos que apresentam perfil de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados, tem sido incentivada desde 1977 pela Organização Mundial da Saúde (LOGUERCIO *et al.*, 2005).

O conocarpano tem apresentado excelente atividade contra cepas padrões de *S. aureus* (PESSINI *et al.*, 2003; DE CAMPOS *et al.*, 2006), promovendo assim o interesse no estudo desta substância quanto ao potencial antibacteriano sobre cepas resistentes deste mesmo microrganismo. Com o objetivo de otimizar a atividade biológica do conocarpano, mudanças foram realizadas na molécula da substância por Da Silva (2006). Ressalta-se que a partir de uma substância biologicamente ativa podem-se realizar modificações moleculares, também chamada de variação molecular ou manipulação molecular, que certamente se constitui no método mais

usado e recompensador para otimizar uma atividade biológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; PIETERS; VLIETINCK, 2005; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A substância conocarpano, seus derivados (metilado, benzoilado e acetilado) e análogos ( $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol), foram testadas quanto à capacidade em inibir o crescimento bacteriano das cepas de *S. aureus* resistentes, obtidas de isolados clínicos. A determinação da CIM, realizada através do método da microdiluição e leitura em espectrofotômetro, utilizou 17 cepas de *S. aureus* resistentes das 20 cepas obtidas através da seleção inicial, isto porque três cepas (S18, S19 e S20), tornaram-se inviáveis durante a manutenção dos microrganismos.

Dentre as substâncias testadas (conocarpano, conocarpano acetilado, conocarpano benzoilado, conocarpano metilado) somente o conocarpano apresentou atividade antibacteriana até a concentração máxima testada de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 3). Mesmo considerando-se o fato que substâncias que apresentem CIM acima de 100  $\mu\text{g/mL}$ , provavelmente não sejam candidatas ao uso clínico (MISTCHER *et al.*, 1972; RIOS; RECIO, 2005), as substâncias foram testadas até a concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , pois além de avaliar o potencial antimicrobiano, também desejou-se verificar se as modificações moleculares realizadas na substância conocarpano, poderiam estar causando algum efeito em sua atividade.

**Tabela 3:** Concentração Inibitória Mínima do conocarpano e seus derivados metilado, acetilado e benzoilado frente às cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos.

Cepa	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	Conocarpano	C-metilado	C-acetilado	C-benzoilado	Vancomicina
<b>S01</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S02</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S03</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S04</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S05</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S06</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S07</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S08</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S09</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S10</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S11</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S12</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S13</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S14</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S15</b>	1,87	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S16</b>	1,87	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>S17</b>	1,87	> 1000	> 1000	> 1000	NR
<b>Padrão</b>	0,93	> 1000	> 1000	> 1000	2

Legenda: C-metilado (conocarpano metilado); C-acetilado (conocarpano acetilado); C-benzoilado (conocarpano benzoilado); NR (não realizado); Padrão (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Além da avaliação da susceptibilidade frente a diferentes cepas de *S. aureus* resistentes do conocarpano e seus derivados, também foi realizada a avaliação dos análogos do conocarpano, como as substâncias  $\alpha$ -di-isoegenol e dihidroisoegenol, (tabela 4). A substância dihidroisoegenol não apresentou atividade até a concentração máxima testada (1000  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto que a substância  $\alpha$ -di-isoegenol apresentou uma discreta ação antibacteriana, porém somente frente

a duas cepas (S05 e S06). Os resultados encontrados para este análogo ( $\alpha$ -di-isoegenol) são suficientes para classificá-lo como praticamente inativo.

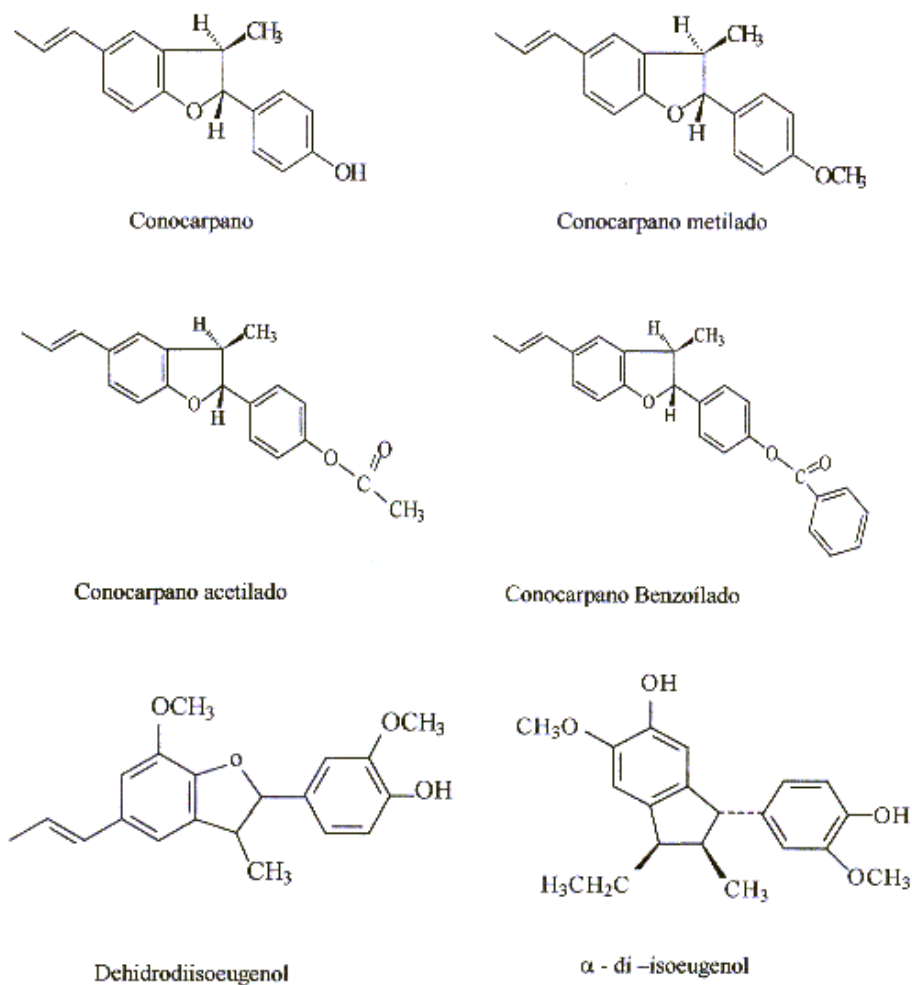
**Tabela 4:** Concentração Inibitória Mínima das substâncias análogas do conocarpano,  $\alpha$ -di-isoegenol e dihidroisoegenol frente às cepas resistentes *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos.

Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	$\alpha$ -di-isoegenol	dihidroisoegenol
<b>S01</b>	> 1000	> 1000
<b>S02</b>	> 1000	> 1000
<b>S03</b>	> 1000	> 1000
<b>S04</b>	> 1000	> 1000
<b>S05</b>	1000	> 1000
<b>S06</b>	1000	> 1000
<b>S07</b>	> 1000	> 1000
<b>S08</b>	> 1000	> 1000
<b>S09</b>	> 1000	> 1000
<b>S10</b>	> 1000	> 1000
<b>S11</b>	> 1000	> 1000
<b>S12</b>	> 1000	> 1000
<b>S13</b>	> 1000	> 1000
<b>S14</b>	> 1000	> 1000
<b>S15</b>	> 1000	> 1000
<b>S16</b>	> 1000	> 1000
<b>S17</b>	> 1000	> 1000
<b>Padrão</b>	> 1000	> 1000

Legenda: Padrão (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)



A falta de atividade observada nas substâncias derivadas e as análogas do conocarpano provavelmente são devidas à substituição do sítio ativo. Os resultados da CIM encontrados para as substâncias derivadas do conocarpano através da acetilação, metilação e benzilação, bem como as análogas  $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol (tabela 3 e 4) podem estar diretamente relacionados com as diferentes estruturas químicas destas substâncias (figura 3).



**Figura 3: Representações das estrutura moleculares do conocarpano seus derivados acetilado, benzoilado e metilado e os análogos  $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol.**

Com relação à estrutura das substâncias testadas, conocarpano e as derivadas e análogos, o conocarpano é a molécula menos lipofílica e o derivado benzoilado é a substância mais lipofílica. Um outro parâmetro importante a ser considerado na avaliação da correlação da estrutura e atividade é a reatividade da molécula devido suas propriedades eletrônicas, pois a interação entre fármaco e receptor não se realiza apenas pelo acoplamento hidrofóbico, mas também pela ligação polar que requer uma determinada densidade eletrônica em certos átomos (AVENDANO; CLARAMUNT, 2003). Dessa maneira, o conocarpano e seu derivado metilado apresentam propriedades eletrônicas semelhantes, diferentemente dos derivados acetilado e benzoilado.

Além dos parâmetros descritos anteriormente, o tamanho dos substituintes é muito importante nas interações fármaco-receptor, pois é freqüentemente observada a afinidade por um tipo de receptor depende do volume de um determinado substituinte (AVENDANO; CLARAMUNT, 2003), convém ainda notar que os derivados acetilado e benzoilado apresentam substituintes que poderiam estar levando ao impedimento estérico.

Outro parâmetro importante a ser avaliado leva em consideração a pesquisa realizada por De Campos (2006), onde se observou que a substância conocarpano apresentou resultados relevantes em relação à atividade antibacteriana, porém constatou-se que alterações estruturais, principalmente a falta da hidroxila na posição 4 da estrutura fenil-propenil-benzofurano, alterou a atividade antimicrobiana, pois quando este grupo estava ausente não foi observada atividade. Este mesmo efeito foi observado no presente trabalho.

Através da correlação entre estrutura e atividade das substâncias derivadas e análogos do conocarpano, sugere-se que o efeito que pode estar interferindo na perda da atividade antibacteriana possa estar relacionado com a hidrofobicidade, pois a substância conocarpano menos lipofílica quando comparada como os derivados e análogos. Este é um dos parâmetros importantes para avaliar as propriedades das substâncias orgânicas, pois a hidrofobicidade de um fármaco é decisiva na absorção, distribuição, eliminação e interação entre fármaco e receptor (AVENDANO; CLARAMUNT, 2003).

Através do presente estudo também observou-se que, devido a falta do grupamento hidroxila ligado na posição 4 da estrutura fenil-propenil-benzofurano nos derivados do conocarpano, metilado, acetilado e benzoilado, os mesmos não demonstraram atividade antimicrobiana. Entretanto, os análogos  $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol apresentam o grupamento hidroxila na referida posição, porém a perda da atividade antibacteriana possa estar relacionada com o grupamento metoxi, que pode estar exercendo um impedimento estérico na ligação entre fármaco e receptor.

Por outro lado, o conocarpano se mostrou muito ativo contra as cepas de *S. aureus* testadas com valores de CIM que variaram de 1,87 a 0,93  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 3), ou seja, a substância conocarpano apresentou valores de CIM abaixo dos valores encontrados para a vancomicina (2  $\mu\text{g/mL}$ ), frente à cepa padrão *S. aureus* (ATCC 25923). A comparação entre as CIMs das substâncias conocarpano e vancomicina torna-se relevante, visto que, a vancomicina é um antimicrobiano de última escolha para o tratamento de infecções provocadas por estafilococos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Estes resultados demonstram que o conocarpano apresenta excelente atividade antimicrobiana, ficando evidenciado o potencial desta substância como um possível agente antibacteriano.

Em contrapartida os resultados das CIMs encontrados por De Campos (2006) demonstraram valores de 4  $\mu\text{g/mL}$  para a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 6538P, diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo. Isso pode ser justificado pelas diferenças metodológicas utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana. Os resultados encontrados no presente trabalho para CIM (ensaio realizado através da microdiluição em meio líquido) foram inferiores (1,87  $\mu\text{g/mL}$ ), provavelmente devido ao fato que a substância conocarpano encontrava-se mais disponível no meio líquido, ou seja, com maior contato com o microrganismo, o que possivelmente não ocorreu com a mesma intensidade quando utilizou-se o meio sólido (ensaio realizado em ágar).

Após a determinação da CIM, avaliou-se também a concentração bactericida mínima (CBM) para as substâncias conocarpano seus derivados metilado, acetilado e benzoilado e para os análogos  $\alpha$ -di-isoeugenol, dihidroisoeugenol (tabela 5).

**Tabela 5:** Concentração bactericida mínima (CBM) de conocarpano frente às cepas resistentes *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos.

Cepa	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
S01	> 30
S02	15
S03	1,87
S04	0,93
S05	> 30
S06	1,87
S07	3,75
S08	3,75
S09	30
S10	3,75
S11	3,75
S12	7,5
S13	7,5
S14	7,5
S15	3,75
S16	15
S17	7,5
Padrão	3,75

Legenda: Padrão (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessário para inviabilizar a célula microbiana. Agentes antimicrobianos que possuem ação bactericida, causam danos irreversíveis às células bacterianas. Os agentes conhecidos como bacteriostáticos atuam inibindo o crescimento bacteriano evitando sua multiplicação, mas não causando sua morte. Quando os valores da CBM são comparados com a CIM, pode-se avaliar se a substância em análise é bactericida ou bacteriostático (BARON; FINEGOLD, 1990).

Os valores da CBM variaram entre 0,93 e >30  $\mu\text{g/mL}$  para a substância conocarpano, entretanto para as demais substâncias os valores da CBM foram

superiores a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , visto que as mesmas já não apresentaram valores de CIM. Apesar das diferenças entre a CIM e CBM do conocarpano, os resultados encontrados confirmaram que a substância possui atividade bactericida, o que é considerado uma característica desejável para os agentes antimicrobianos, tornando-os clinicamente mais interessantes para utilização em ambientes hospitalares.

Considerando o fato que para ser empregado no tratamento de infecções, os antimicrobianos devem ser ativos em concentrações preferencialmente menores que 10  $\mu\text{g/mL}$ , e comparando os resultados encontrados com a vancomicina, que é um antimicrobiano de uso hospitalar restrito empregado no tratamento específico para bactérias Gram-positivas (TAVARES, 1996), confirmamos que a atividade antimicrobiana encontrada para o conocarpano pode ser classificada como excelente.

Um aspecto a ser considerado é a diversidade molecular dos produtos naturais, sendo muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos avanços tecnológicos, ainda é restrito (NODARI; GUERRA, 2000). Portanto, não causa estranheza que a estrutura do conocarpano, não se assemelha a nenhuma estrutura dos antimicrobianos de uso clínico. Dessa maneira, não foi possível correlacionar a estrutura do conocarpano com o mecanismo de ação dos antimicrobianos de uso clínico.

Em contrapartida, o conocarpano, assim como outros agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores, podem agir como reguladores do metabolismo intermediário dos microrganismos, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática, seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas e parede celular ou ainda, interferindo no metabolismo secundário dos microrganismos (COWAN, 1999; SINGH; SHUKLA, 1984).

### 5.3 Avaliação da associação entre antimicrobianos

Através dos resultados obtidos na determinação da CIM, ficou evidenciado o grande potencial antimicrobiano da substância conocarpano, despertando o interesse na observação do seu comportamento juntamente com antimicrobianos de uso clínico que não foram efetivos às cepas resistentes de *S. aureus*.

Diante da possibilidade da substância conocarpano poder estar agindo sinergicamente com outros antimicrobianos de uso clínico, foram selecionadas 5 cepas que apresentaram perfil de resistência ao maior número de antimicrobianos no teste de susceptibilidade (S05, S06, S08, S11 e S12) e a cepa padrão ATCC 25923 para a avaliação de uma possível interferência na atividade antibacteriana dos 12 antimicrobianos.

Combinações racionais entre antimicrobianos aumentam a eficácia e diminuem a toxicidade, ampliam o espectro em infecções por múltiplos germes, previnem emergência de resistência, evitam a inativação do antimicrobiano por  $\beta$ -lactamases ou reduzem a metabolização dos antimicrobianos. Algumas associações já são bem conhecidas quanto à ação sinérgica, como as associações de penicilina e aminoglicosídeo (a penicilina favorece o aumento da penetração do segundo na célula bacteriana), vancomicina e gentamicina, teicoplanina e gentamicina (infecções por estafilococos), anfotericina B e 5-fluorocitosina, quinupristina e dalfopristina (MOREIRA, 2004).

Combinações de antimicrobianos para tratamentos de infecções mistas por aeróbios e aneróbios são cefazolina e metronidazol, ceftriaxona e metronidazol, ampicilina e sulbactam, piperacilina e tazobactam, ticarcilina e clavulanato, imipenem e aminoglicosídeo, ciprofloxacina e metronidazol. Combinações que previnem emergência de resistência são tuberculostáticos, rifampicina e gentamicina (estafilococos), rifampicina e quinolona (estafilococos), amoxiciclina e metronidazol ou claritromicina (*Helicobacter pylori*), bismuto coloidal com tetraciclina e metronidazol (*H. pylori*) (MOREIRA, 2004).

Considerando que a CIM para o conocarpano no presente estudo foi de 0,93 a 1,87  $\mu\text{g/mL}$ , e que estudo anterior apresentou CIM de 4  $\mu\text{g/mL}$  (DE CAMPOS *et al.*,

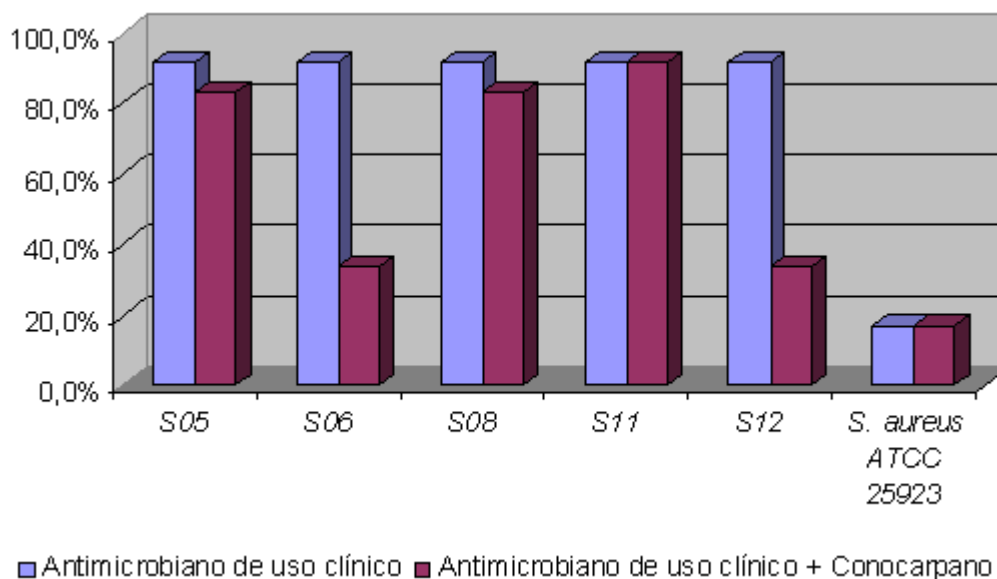
2007), o potencial do conocarpano sobre linhagens de microrganismos multirresistentes em associação aos 12 antimicrobianos foi realizado em diferentes concentrações (1, 2, 3 e 4 µg/mL). O resultado do teste de susceptibilidade (antibiograma) foi obtido através da determinação do halo de inibição (Quadro 1).

**Quadro 1:** Perfil de susceptibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes, aos antimicrobianos de uso clínico associados ao conocarpano.

Cepa	Concentração conocarpano (µg/ mL)	Antimicrobiano de uso clínico / Halo de inibição (mm)											
		VAN	AMP	ERI	SUT	GEN	CFO	PEN	OXA	TET	AMO	CLI	CFL
S05	4	23	26	R	R	R	R	R	R	R	25	R	18
	3	23	24	R	R	R	R	R	R	R	25	R	18
	2	22	24	R	R	R	R	R	R	R	24	R	18
	1	22	23	R	R	R	R	R	R	R	21	R	14
	0	21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S06	4	25	28	31	30	26	30	18	26	32	27	R	35
	3	23	26	30	29	26	28	18	26	31	26	R	33
	2	22	26	31	30	26	26	16	22	30	25	R	32
	1	20	24	31	30	26	26	16	21	30	25	R	30
	0	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S08	4	24	26	R	R	R	R	R	R	R	27	R	18
	3	21	25	R	R	R	R	R	R	R	26	R	18
	2	21	24	R	R	R	R	R	R	R	26	R	17
	1	19	24	R	R	R	R	R	R	R	22	R	16
	0	19	20	R	R	R	R	R	R	R	21	R	16
S11	4	24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	3	23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	2	22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	1	22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	0	22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S12	4	20	21	28	32	28	29	R	20	34	25	R	30
	3	20	20	26	32	26	26	R	16	31	18	R	28
	2	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	1	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	0	19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ATCC 25923	4	23	32	28	33	30	35	20	26	32	25	30	32
	3	21	32	28	33	26	32	20	26	32	25	30	32
	2	21	32	27	33	25	32	20	26	32	25	30	32
	1	21	32	28	33	25	32	20	26	32	25	30	31
	0	21	32	28	33	25	31	20	26	32	23	30	30

Legenda: VAN (Vancomicina 30 µg); AMP (Ampicilina 10 µg); ERI (Eritromicina 15 µg); SUT (Sulfazotrina 25 µg); GEN (Gentamicina 10 µg); CFO (Cefoxitina 30 µg); PEN (Penicilina G 10 U); OXA (Oxacilina 1 µg); TET (Tetraciclina 30 µg); AMO (Amoxicilina 10 µg); CLI (Clindamicina 2 µg); CFL (cefalotina 30 µg); R: sem presença de halo de inibição.

Considerando os resultados do perfil de susceptibilidade apresentados no quadro 1, pôde ser verificado também o percentual de redução da resistência das cepas de *S. aureus* de isolados clínicos, como demonstrado na figura 4. De acordo com esta figura, o conocarpano apresentou resultados relevantes na alteração do perfil de susceptibilidade das cepas resistentes de *S. aureus* aos agentes antimicrobianos de uso clínico



**Figura 4: Prevalência de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes frente a antimicrobianos de uso clínico e associados com conocarpano.**

Os resultados obtidos para cepa padrão *S. aureus* (ATCC 25923) demonstraram que não ocorreu alteração no perfil de susceptibilidade, sendo que a cepa padrão apresentou resistência a apenas dois antimicrobianos de uso clínico testados (penicilina G e amoxicilina) (figura 4).

Com relação à cepa S11, os resultados encontrados mostraram que não houve alteração no perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de uso clínico, quando associado ao conocarpano até na concentração máxima de 4 µg/mL, demonstrando não interferir o efeito dos antimicrobianos testados.



Para as cepas de *S. aureus* (S05 e S08), que inicialmente apresentaram resistência a onze dos doze (91,7%) antimicrobianos de uso clínico testados, foi observado alteração no perfil de susceptibilidade quando associado ao conocarpano. A alteração na sensibilidade destas cepas bacterianas foi apenas para a cefalotina, indicando um incremento na atividade na presença da substância conocarpano para as concentrações de 1 e 3 µg/mL, respectivamente. Esta ação também pôde ser verificada para a ampicilina e amoxicilina, onde foi evidenciado o aumento no tamanho dos respectivos halos de inibição, apesar de não serem o suficiente para mudar de classificação quanto à susceptibilidade.

Os resultados encontrados para as cepas S06 e S12, demonstraram importante alteração no perfil de susceptibilidade, pois anteriormente, sem adição de conocarpano, as cepas apresentaram sensibilidade apenas à vancomicina, ou seja, resistente a 91,7% dos antimicrobianos testados (11). Quando adicionado o conocarpano ao meio de cultura, as cepas apresentaram resistência a quatro agentes antimicrobianos, representando 63,6% de redução de resistência aos antimicrobianos de uso clínico testados.

Ainda em relação às cepas S06 e S12, para os antimicrobianos ampicilina e amoxicilina, observou-se que, apesar de não ter ocorrido alteração do perfil de susceptibilidade de resistente para sensível, as cepas apresentaram valores maiores dos halos de inibição quando associadas ao conocarpano, sugerindo interferência na ação antimicrobiana, estando a substância potencializando a ação antibacteriana destes antimicrobianos. Estes resultados sugerem que a substância conocarpano apresenta melhora na atividade dos antimicrobianos de uso clínico testado.

Os mecanismos de sinergismo são variados, podendo estar relacionado a inibição seqüencial de mais uma etapa na mesma reação bioquímica, inibição de enzimas protetoras da bactéria, uso de combinação de agentes que atuam na parede celular, uso de agentes que atuam na parede celular com o objetivo de potencializar a ação de outros agentes ou uso de antimicrobianos que se ligam à subunidade 50S do ribossomo (STARLING; BISCOTTO, 2004).

Mediante os resultados encontrados, constatamos que dentre os antimicrobianos testados, apenas para a clindamicina não ocorreu alteração na sensibilidade ou aumento do halo de inibição (sensibilidade) quando associado com o conocarpano, já para a eritromicina que é um antimicrobiano que também atua na inibição da sub unidade 50S, observou-se alterações para duas cepas de *S. aureus* resistentes S06 e S12.

Os resultados encontrados na avaliação da sinergia para as cepas S05, S06, S08, S11 e S12, que apresentam resistência à penicilina G, amoxicilina e ampicilina, mesmo quando utilizadas em associação com o conocarpano, sugerem que aparentemente, a ação sinérgica da substância conocarpano não estaria efetivamente interferindo na ação das  $\beta$ -lactamases. Por outro lado, são variados os possíveis mecanismos que o conocarpano possa estar utilizando para potencializar a ação dos antimicrobianos de uso clínico ou potencializar a ação antimicrobiana da associação.

Os resultados encontrados demonstraram a ação sinérgica do conocarpano quando associado a antimicrobianos de uso corrente, confirmando seu potencial para aplicação clínica devido aos excelentes resultados obtidos, isoladamente ou em associações, principalmente frente a cepas de *S. aureus* multirresistentes.

Este estudo foi um progresso, contribuindo para o conhecimento sobre a atividade do conocarpano frente a cepas resistentes de *S. aureus*, bem como sua possível ação sinérgica com outros agentes antimicrobianos. Entretanto fazem-se necessárias outras pesquisas visando elucidar o mecanismo de ação do conocarpano, bem como a sua aplicação como agente antimicrobiano viável.

## 6 CONCLUSÕES

- As cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de ambiente hospitalar apresentaram perfil de susceptibilidade adequado (multirresistências aos antimicrobianos) para a realização dos testes de avaliação de atividade antimicrobiana do conocarpano, seus derivados e análogos.
- O conocarpano exibiu significativa atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* resistentes isolados de ambiente hospitalar, com CIM entre 0,93 e 1,87  $\mu\text{g/mL}$  e CBM entre 0,93 e  $>30 \mu\text{g/mL}$ .
- As substâncias derivadas do conocarpano metilado, acetilado e benzoliado, não apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* resistentes, até a concentração máxima testada de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .
- Os análogos do conocarpano ( $\alpha$ -di-isoeugenol e dihidroisoeugenol), não foram considerados ativos frente às cepas de *S. aureus* resistentes, sendo que apenas 2 cepas de um total de 17, apresentaram CIM de 1000, e as demais com CIM  $>1000 \mu\text{g/mL}$ .
- As alterações estruturais (acetilação, benzoilação e metilação) na molécula do conocarpano, provocaram perda de atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* resistentes.
- O conocarpano associado a outros antimicrobianos de uso clínico, apresentou ação sinérgica frente às cepas de *S. aureus* resistentes.

## 7 REFERÊNCIAS

AVENDAÑ-LOPEZ, C. (Coord.). **Introducción a la química farmacêutica**. 2 ed. Madrid: McGraw–Hill, 2001. 930p.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **Journal of clinical pathology**. v.14, n.4, p. 385-393, 1961.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Diagnostic microbiology**. 8 ed. St. Louis: Bailey & Scott's, 1990.

BARON, S. **Medical Microbiology**. 2003. Disponível em:  
<<http://gsbs.utmb.edu/microbook>>. Acesso em: junho 2007.

BELOFSKY, G.; PERCIVILL, D.; LEWIS, K.; TEGOS, G.P.; EKART, J. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 481-484, 2004.

BENEVIDES, P.J.C.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.

BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; JUNIOR, A.F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BLACK, J.G. **Microbiology: Principles & Applications**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 866p

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, 1991. 594p

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 162-195, 2005. *Erratum in: Natural Product Reports*, v. 23, n. 1, p.131, 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANG, P.C.; LI, H.Y.; TANG, H.J.; LIU, J.W.; WANG, J.J.; CHUANG, Y.C. *In vitro* synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 56-61, 2007.

CHAURET, D.C.; BERNARD, C.B.; ARNASON, J.T.; DURST, T. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 152-155, 1996.

CLARKE J.M.; GILLINGS, M.R.; ALTAVILLA, N.; BEALE, A.J. Testing natural products, for antimicrobial activity – potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 3, p. 261, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Standards for antimicrobial susceptibility testing**. Fifteenth Informational Supplement M100-S15, Wayne, PA, 2005.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. oct., p. 564-582, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

DA SILVA, R.Z. **Estudo Fitoquímico e Biológico da *Piper solmsianum* C. DC. Variedade *solmsianum* (Piperaceae)**. 2006. 221 f. Tese de Doutorado - Curso de Pós-Graduação de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DE CAMPOS, M.P.; CECHINEL FILHO, V.; DA SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; ZACCHINO, S.; JUAREZ, S.; CRUZ, R.C.B.; BELLA CRUZ, A. Evaluation of antifungal activity *Piper solmsianum* C. DC. Var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1527-1530, 2005.

DE CAMPOS, M.P. **Avaliação do Potencial Antimicrobiano de Extrato, Frações e Substâncias Puras Obtidas de *Piper solmsianum* C. D. R. VAR *solmsianum* (PIPERACEAE)**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

DE CAMPOS, M.P.; CECHINEL FILHO, V.; DA SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; BELLA CRUZ, A. Antibacterial activity of extracts, fractions and four compounds from *Piper solmsianum* C. DC. Var. *solmsianum* (Piperaceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62c, p. 173-178, 2007.

FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E.C.; BETONI, J.E.; ORSI, R.O.; DA CUNHA, M.L.; MONTELLI, A.C. American: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 563-566, 2005.

FONSECA, A. L. **Antibióticos na Clínica Diária**. 6 ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. 468p.

FREIXA, B.; VILLA, R. FERRO, E.A.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antifungal principles from *Piper fulvescens*. **Planta Medica**, v. 67, n. 9, p. 873-875, 2001.

FRENCH, G. L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1514-1527, 2005.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GONZÁLEZ, P.A. Diffusion susceptibility testing: selection of antimicrobial agents. **Revista Chilena de Infectologia**, v.19, n. 2, p. 82-84, 2002.

GONZÁLEZ-PIÑERA, J.G.; PENIÉ, J.B.; RODRÍGUEZ, M.Á., REYES, A.M.; MORA, E.; LESCAY, M. Glicopéptidos. **Acta Medica**, v.8, n. 1, p. 54-57, 1998.

HARDY K. J.; HAWKEY, P. M.; GAO, F.; OPPENHEIM, B. A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. **British Journal of Anaesthesia**, v. 92, n. 1, p. 121-130, 2004.

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. 1027-1031, 2002.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIVA, T. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 287-290, 2007.

HUGHES, G.B.; CHIDI, C.C; MACON, W.L. *Staphylococci* in community acquired infections: increased resistance to penicillin. **Annals of Surgery**, v. 183, n.4, p. 355-357, 1976.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 611p.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777p.

JORGE, A.O.C. **Microbiologia: atividade prática**. São Paulo: Santos, 1997. 146p.

KALLINGS, L.O. The susceptibility of Staphylococcal hospital strains to methyl-phenyl-isoxazolyl penicillin. **APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica)**, v. 54, p. 127-128, 1962.

KANAFANI, Z.A.; FOWLER, V.G.J. Infecções por *Staphylococcus aureus*: novos retos para um velho patógeno. **Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clínica**, v. 24, n. 3, p.182–193, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., M.W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

KOSTOVA, T.N.; NIKOLOY, N.M.; CHILPISA, L.N. Antimicrobial properties of some hidroxicoumarins and *Fraxinus ornus* bark extracts. **Journal Ethnopharmacology**, v. 39, n.3, p. 205-208, 1993.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10 , p. 1471-1485, 2005.

LANE, W.R. Methicillin resistance in Staphylococci. **The Medical journal of Australia**, v. 49, p. 962-965, 1962.

LEVY, S.B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1446-1450, 2005.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Óptica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, p. 479-499, 2001.

LOGUERCIO A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C. HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural Santa Maria**, v.35, n.2, p.371-376, 2005.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608p.

MARTIN, W.J. Newer penicillins . **The Medical clinics of North America**, v. 21, n. 2, p. 1107, 1967.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999.

MITSCHER, L.A.; LEU, R-P.; BATHALA, M.S.; WU, W-U.; BEAL, J.L.; WHITE, R. Antimicrobial agents from Higher plant. **Lloydia**, v. 35 n. 2, p. 157-166, 1972.

MOREIRA, L.B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Revista da AMRIGS**, v. 48 , n. 2, p. 73–152, 2004.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 604p.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts ad phytochemicals on antibiotic-resistant. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 247-256, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically**. M7-A3. NCCLS, Villanova, PA, 1993.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *In*: **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC, 2000.

O'RIORDAN, K.; LEE, J.C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 218-234, 2004.

OLIVEIRA, C.M. Uso racional dos antimicrobianos. *In*: PEDROSA, E.R.P.; ROCHA, M.O.C. **Antibioticoterapia**. Rio de Janeiro: MEDSI, v. 4, 2001. 755-768p.

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

PEDROSA, E.R.P.; ROCHA, M.O.C. **Antibioticoterapia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S. **Microbiology: Concepts and Applications**. New York: McGraw-Hill, 1993. 940p.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. *Var. pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

PESSINI, G.L.; PRADO DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. *Var. pallescens* (C. DC.) Yunck. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6A, p. 1130-1133, 2005.



PIETERS, L.; VLIETINCK A.J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n. 1-2, p. 57-60, 2005.

RAYNER, C.; MUNCKHOF, J. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. **International Medicine Journal**, v. 35, p. S3-S16, 2005.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROSS, S.; RODRIGUEZ, W.; CONTRONI, G.; KHAN, W. Staphylococcal susceptibility to penicilin G. **The journal of the American Medical Association**, v.229, n.3, p. 1075, 1974.

SADER, H.; MENDES, R.E.; GALES, A.C.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros—Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **Journal Pneumologia**, v. 27, n. 2, p. 59-67, 2001.

SADER, H.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C. SENTRY - Antimicrobial surveillance program report: Latin american and brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.1, p. 25-79, 2004.

SARTORELLI, P. BENEVIDES, P.J.C.; ELLENSOH, R.M.; ROCHA, M.V.A.F.; MORENO, P.R.H.; KATO, M.J. Enantioselective conversion of p-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. **Plant Science**, v. 161, p. 1083-1088, 2001.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 642p.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 3-8, 2006.

SERUFO, J. C.; CLEMENTE, W. T. Princípios gerais do diagnóstico laboratorial nas doenças infecciosas. *In*: PEDROSA, E.R. P.; ROCHA, M.O.C. **Antibioticoterapia**. Rio de Janeiro: MEDSI, v. 4, 2001. 657-682p.

SILVA, M.T.G.; SIMAS, S.M.; BATISTA, T.G.F.M.; CARDARELLI, P.; TOMASSINI, T.C.B. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 779-782, 2005.

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

SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, p. 313-315, 1984.

SOARES, M.A. Resistência antibiótica. **Pharmacia Brasileira**, v. jan./fev., p. 60-62, 2001.

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Métodos de Avaliação de Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: Editora da UNIVALI, 2003. 239p.

STARLING, C.E.F.; BISCOTTO, C.R. Associação Antimicrobiana. In: PEDROSA, E.R. P.; ROCHA, M.O.C. **Antibioticoterapia**. Rio de Janeiro: MEDSI, v. 4, 2001. 769-782p.

SUFFREDINI, I.B.; PACIÊNCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 287 -290, 2006.

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G.S.; HALDORSEN, B.C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S-O.; LITTAUER, P.; DAHL, K.H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica)**, v. 112, p. 815-837, 2004.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792p.

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

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S3-S10, 2006.

TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAFT, H. Stable Classes of Phenotypic Expression in Methicillin-Resistant Clinical Isolates of Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 124-129, 1991.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27-36, 1996.

UTSUI, Y.; YAKOTA, T. Role of an altered penicillin binding protein in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, p. 387-403, 1985.

VELÁZQUEZ-MEZA, M.E. Surgimento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. **Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública**, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005.

WOOD, W.H.; WOLINSKY, W. Treatment of Staphylococcal disease. **Hospital medicine**, v. 7, n. 2, p. 87, 1971.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1451-1470, 2005.

ZANON, U.; NEVES, J. **Infecções Hospitalares: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica, 1987. 228p.

ZAVADINACK-NETTO, M.; HERREIRO, F.; PERALTA, C.O.B.; YOSWHIRO I.; CIORLIN, E.; SAQUETI, E.E.; ANSILIEIRO, I.J.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V.L.D. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.