

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Thaís Moreira Osório

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CHALCONAS E
HIDRAZONAS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE
Staphylococcus aureus RESISTENTES À METICILINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Florianópolis, 2011.

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

083a Osório, Thais Moreira

Atividade antimicrobiana de chalconas e hidrazonas frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina [dissertação] / Thais Moreira Osório ; orientador, Artur Smânia Júnior. - Florianópolis, SC, 2011.
107 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Chalconas. 3. Hidrazonas. 4. Agentes antibacterianos. 5. Citotoxicidade de mediação celular. 6. Reação em cadeia de polimerase. I. Smânia Junior, Artur. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

CDU 57

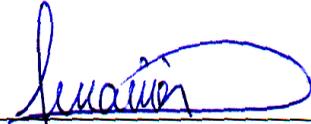
“Atividade antibacteriana de chalconas e hidrazonas frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.”

POR

THAIS MOREIRA OSÓRIO

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:

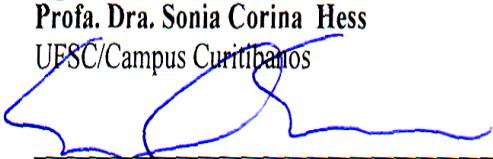


Prof. Dr. Artur Smania Junior
MIP/CCB/UFSC

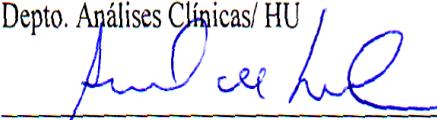
Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Sonia Corina Hess
UFSC/Campus Curitiba



Dra. Simone Senna
Depto. Análises Clínicas/ HU



Profa. Dra. Andrea de Lima Pimenta
Universite de Cergy-França



Profª. Drª. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC
Florianópolis, Março de 2011.

PI

Dedico este trabalho a Deus, que guia meus passos. Aos meus pais e irmãos pelo amor e, em especial, ao meu esposo Cristiano, que sempre me incentivou incondicionalmente nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois me concedeu saúde para que conseguisse chegar até aqui.

Ao Professor Artur Smânia Júnior, pela aceitação imediata em me orientar e confiança no meu trabalho. Além dos preciosos ensinamentos e apoio.

À Professora Elza Albino Smânia, pela amizade, apoio e auxílio quando necessitei.

Aos meus pais Renaldo e Rosa que, mesmo distantes, sempre me dedicam muito amor e são os responsáveis pelo início da minha trajetória de estudos e que, apesar das dificuldades, sempre acreditaram no meu potencial.

Às minhas irmãs Taiuany e Tailizy, responsáveis por momentos de amor e alegria. Assim como minhas irmãs paternas e meus sobrinhos.

Ao meu marido, amor da minha vida, companheiro incondicional, incentivador e alicerce nos momentos difíceis.

Aos meus avós e tios, pois saber que os tenho deixou a caminhada mais leve.

Aos amigos Graziela e Thomaz, pelo carinho, amizade e atenção.

À Daniele e à Keroline, que embora longe, sempre dispensaram uma palavra amiga.

Aos amigos Juliana, Borges e Ana Júlia, pela amizade e momentos de descontração.

Ao meu sogro Arildo pela amizade e incentivo.

À minha sogra Bia e meu cunhado Eduardo pelo carinho e torcida.

Aos Professores Eduardo e Mercedes, que assim como a Dr. Adriana Simões Pires, acreditaram na minha capacidade desde o princípio da minha vida acadêmica.

Aos colegas de mestrado, em especial a Fernanda, a Rebeca e a Celina, pois tornam esta jornada mais divertida e aos colegas Jéssica e Douglas, pela ajuda nos testes de citotoxicidade.

Agradeço a doutoranda Alessandra Mascarello, pela síntese e auxílio quanto aos compostos estudados.

À equipe do Laboratório de Virologia Aplicada, especialmente à professora Célia Barardi, à doutoranda Aline Viancelli e ao graduando Lucas, pelo grande auxílio e suporte para a realização dos testes moleculares.

Aos colegas de laboratório Laila e Rômulo, pela amizade, desabafos, risos e apoio.

À administração do Laboratório Santa Luzia e do Hospital Universitário, pela cessão das cepas.

Aos professores Franco Delle Monache e Ricardo Nunes, pela provisão dos compostos.

À secretária do Programa, Joice, pela simpatia e pela disposição em sempre ajudar.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos.

À Capes – Reuni pela bolsa de estudos.

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Sem vocês jamais teria chegado até aqui.

Thaís Osório

*“Confiança é importante, mas não basta
dizer a si mesmo: vou conseguir.
É preciso acreditar nisso.”
Legrand*

RESUMO

O aumento crescente de bactérias resistentes devido a múltiplos fatores, incentiva à busca por novas substâncias farmacologicamente ativas contra estes patógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de 34 chalconas e de 10 hidrazonas contra 14 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), coletadas em ambiente hospitalar da Grande Florianópolis. Como controle, foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Inicialmente, a resistência à meticilina foi verificada através do método de difusão radial em ágar, no qual todas as cepas recebidas foram testadas frente aos antimicrobianos oxacilina (6µg) e cefoxitina (30µg). Foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de detectar a presença do gene *mecA*, o estudo molecular foi complementado com o uso da amplificação randômica do DNA (RAPD), a fim de determinar o grau de correlação entre as cepas. As cepas confirmadas como sendo MRSA, juntamente com as cepas referência de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) foram avaliadas frente às chalconas e às hidrazonas através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM), pelo método de microdiluição em caldo. A CIM e a CBM foram consideradas as menores concentrações das substâncias-teste necessárias para inibir o crescimento ou provocar a morte bacteriana, respectivamente. Ambas foram expressas em µg/mL. Além disso, os compostos bioativos foram avaliados quanto à sua citotoxicidade *in vitro*. A análise do potencial citotóxico foi realizada em culturas de células da linhagem celular VERO, através do método colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT). Os resultados foram expressos como a concentração de cada amostra, que reduziu em 50% a viabilidade celular (CC₅₀). O cálculo de índice de seletividade (IS) foi realizado para que pudesse ser observado se os compostos foram tóxicos nas concentrações mínimas de inibição. Com isso, foi possível concluir que as hidrazonas apresentam melhor IS do que as chalconas, o que indica que são compostos com maior perspectiva de virem a se tornar futuros fármacos. De todos os compostos testados, as hidrazonas G6 e F29 apresentaram os menores valores de CIM, bem como os melhores índices de seletividade. Com relação a caracterização genotípica das cepas estudadas, ficou evidente que o gene *mecA* foi encontrado na maioria das cepas de MRSA, e enquanto que o RAPD revelou que a maioria das cepas utilizadas são correlacionadas evolutivamente. Conclui-se, portanto, que das 44 substâncias testadas, cinco são

substâncias promissoras como novos antimicrobianos e os estudos químicos e microbiológicos com as mesmas devem ser continuados.

Palavras-chave: Chalconas. Hidrazonas. Atividade Antibacteriana. Atividade Citotóxica. PCR. RAPD.

ABSTRACT

Increase in antibiotic resistance due to multiple factors encourages the search for new compounds active against multiresistant pathogens. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of thirty-four chalcones and ten hydrazones against fourteen strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), obtained in hospitals of the Great Florianópolis area (Southern Brazil). *S. aureus* strain ATCC 25923 was used as control. Initially, the resistance to methicillin was detected by the method of radial diffusion in agar, in which all strains were tested against the antimicrobials oxacillin (6µg) and cefoxitin (30µg). Polymerase chain reaction (PCR) was employed to detect the *mecA* gene. The molecular analysis was completed using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. Strains confirmed as MRSA, along with reference strains of *S. aureus* (ATCC 25923) and *E. coli* (ATCC 25922) were evaluated against the hydrazones and chalcones by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by the broth microdilution method. The MIC and MBC were considered the lowest concentrations necessary to inhibit the growth or destroy the bacteria, respectively. Both measurements were expressed in µg/mL. Furthermore, the bioactive compounds were evaluated for their cytotoxicity *in vitro*. The analysis of the cytotoxic potential was performed in Vero cell cultures using a colorimetric method with tetrazolium (MTT). The results were expressed as the concentration of each sample, which reduced cell viability by 50% (CC50). Afterward, the selectivity index (IS) was calculated to determine if the compounds were toxic at minimal inhibitory concentrations. Based on this result it was possible to conclude that the hydrazones have better IS than the chalcones. This suggests that these compounds are more prominent than the chalcones to become potential therapeutical drugs. The hydrazones G6 and F29 had the lowest values for CIM and were also among the compounds that showed the highest levels of selectivity. Furthermore, the genotypic characterization of the strains revealed that the *mecA* gene was found in the majority of the strains of MRSA and RAPD, suggesting that most of the strains studied are evolutionarily related. It can be concluded that from the 44 compounds testes, five are potentially promising, including antibiotic-like substances and new chemical, and that microbiological studies to better evaluate these compounds should be continued.

Keywords: Chalcones. Hydrazones. Antibacterial Activity. Cytotoxic. PCR. RAPD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da penicilina.....	41
Figura 2: Estrutura química da meticilina.....	41
Figura 3: Evolução da Resistência aos antimicrobianos em <i>S. aureus</i> ..	41
Figura 4: Esquema da biossíntese dos flavonóides.....	45
Figura 5: Núcleo fundamental das chalconas.....	46
Figura 6: Estrutura química das chalconas eripostirene (a) e angolensina (b).....	49
Figura 7: Estrutura química das licochalconas A.....	49
Figura 8: Formação de hidrazonas a partir de cetonas.....	50
Figura 9: Condensação de cetonas α , β -insaturadas com hidrazinas.....	50
Figura 10: Estrutura das chalconas pesquisadas.....	57
Figura 11: Estrutura das hidrazonas pesquisadas.....	60
Figura 12: Teste de Disco Difusão.....	70
Figura 13: Concentração inibitória mínima da hidrazona G6.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões interpretativos de diâmetros do halo de inibição para <i>S. aureus</i>	63
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima de 10 hidrazonas.....	67
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima de 34 chalconas.....	67
Tabela 4 - Teste de Disco Difusão.....	70
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima das chalconas contra 7 cepas MRSA.....	72
Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima das chalconas contra 7 cepas MRSA.....	72
Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima das hidrazonas contra 7 cepas MRSA.....	73
Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima das hidrazonas contra 7 cepas MRSA.....	73
Tabela 9 - Citotoxicidade de hidrazonas e chalconas em células VERO.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC:** *American Type Culture Collection*
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CBM: Concentração Bactericida Mínima
DMSO: Dimetilsulfóxido
D.O.: Densidade óptica
MEM: *Minimal Essential Medium*
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
MTT: [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
BHI: Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion*)
CC50: Concentração que reduz a viabilidade das células em 50%
INT: *p-IodoNitroTetrazolium Violet*
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PBPs: *penicillin binding protein*
RAPD: Amplificação randômica do DNA

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
ml	Militro
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
ng	Nanogramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVOS.....	29
1.1.1 Objetivo geral	29
1.1.2 Objetivos específicos	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS	31
2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA	34
2.3 MICRORGANISMO ALVO: <i>S. aureus</i> RESISTENTES À METICILINA.....	38
2.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS.....	43
2.5 CHALCONAS.....	45
2.5.1 Aspectos estruturais e químicos.....	45
2.5.2 Biossíntese das chalconas.....	48
2.5.3 Atividade antimicrobiana das chalconas	48
2.6 HIDRAZONAS.....	50
2.6.1 Aspectos estruturais e químicos.....	50
2.6.2 Aplicações das hidrazonas.....	51
2.7 CITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS	51
2.8 TÉCNICAS MOLECULARES.....	52
3 JUSTIFICATIVA.....	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 CHALCONAS E HIDRAZONAS.....	55
4.2 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA	60
4.2.1 Solventes utilizados na solubilização e diluição dos compostos.....	60
4.2.2 Meios de culturas.....	61
4.2.3 Reagente para a revelação dos testes	61
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	62
4.3.1 Microrganismos teste	62
4.3.2 Ativação e teste de pureza das bactérias.....	62
4.3.3 Preparo do inóculo bacteriano.....	62
4.3.4 Teste de disco difusão em ágar.....	62
4.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima	63
4.3.6 Determinação da concentração bactericida mínima	64
4.4 TESTES MOLECULARES	64
4.4.1 Reação em cadeia da polimerase	64

4.4.2 Amplificação randômica do DNA de <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina	65
4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT).....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO A – Análise dos genes de resistência através da PCR e identificação molecular das cepas bacterianas de MRSA.....	101
ANEXO B – Análise genotípica das cepas bacterianas de MRSA através da técnica de RAPD utilizando o iniciador Eric 2.....	102
ANEXO C- Análise genotípica das cepas bacterianas de MRSA através da técnica de RAPD utilizando o iniciador AP-7.....	103
ANEXO D – Dendograma elaborado a partir do RAPD utilizando iniciador AP-7.....	104
ANEXO E – Dendograma elaborado a partir do RAPD utilizando iniciador Eric 2.....	105

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante. Essa informação é facilmente comprovada pelos inúmeros registros referentes aos povos primitivos que habitaram a terra. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se nos recursos da natureza (CALIXTO & SIQUEIRA, 2008).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, sendo que o reino vegetal fornece uma diversidade de substâncias químicas com variabilidade em suas estruturas e em suas atividades biológicas (MONTANARI & BONZANI, 2001).

Assim sendo, os produtos naturais têm desempenhado papel significativo para a descoberta de novos fármacos com funções importantes no tratamento de doenças humanas (NEWMAN *et al.*, 2003).

O interesse pelos medicamentos derivados de plantas, também conhecidos como fitoterápicos ou fitomedicamentos, tem aumentado expressivamente em todo o mundo, em especial, em alguns países desenvolvidos da Europa e nos Estados Unidos (CALIXTO, 2000). No Brasil, esta mesma realidade é observada. Em um levantamento realizado no período entre os anos de 1984 a 2004, pelo site “*Web of Science*”, observou-se que poucas áreas da pesquisa cresceram tanto no país como as pesquisas com plantas. Na América Latina, o Brasil é o líder absoluto das publicações internacionais na área de plantas, totalizando 41,6% (CALIXTO, 2005).

Os compostos derivados de plantas são empregados como fármacos na terapêutica moderna, além de serem usados como estruturas básicas para síntese de algumas moléculas mais complexas. Atualmente, cerca de 30% dos medicamentos disponíveis para o tratamento de enfermidades, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, notadamente das plantas. Em algumas doenças como o câncer, os fitoterápicos chegam a 60% (BOLDI, 2004; KOEHN & CARTER, 2005).

As plantas possuem capacidade ilimitada de sintetizar metabólitos primários e secundários (OJALA, 2001). Os metabólitos secundários, na maioria relacionados com o fenol e seus derivados, são produtos de baixo peso molecular, que se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida da planta

(DOMINGO & LÓPEZ-BREA, 2003). Essas moléculas, além de serem sintetizadas por plantas, também estão presentes em fungos, bactérias, protozoários, insetos e animais, sendo produzidas em resposta aos estímulos externos como alterações nutricionais, modificações das condições do ambiente (como pH e temperatura), infecções e competição. Aproximadamente um terço dos fármacos mais vendidos no mundo são produtos naturais ou derivados de metabólitos, como a penicilina, que foi descoberta e industrializada durante a segunda Guerra Mundial. O incrível sucesso do desenvolvimento dos produtos naturais com atividade antibacteriana no período de pós-guerra estimulou pesquisas sobre o tema (STROHL, 2000). Segundo Standler e Keller (2008), mais de 1500 metabólitos, estudados entre os anos de 1993 e 2001, apresentaram atividade antibiótica ou antitumoral.

Os antibióticos são metabólitos secundários, produzidos por várias espécies de microrganismos que, em baixas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente outros patógenos. Este conceito exclui os compostos produzidos sinteticamente que, juntamente com os compostos naturais e seus derivados, são denominados de antimicrobianos (GOODMAN, 2003).

Desde a introdução da antibioticoterapia na clínica médica, há mais de 60 anos, esta se tornou a principal estratégia de controle das infecções. No entanto, bactérias resistentes surgem quase que simultaneamente aos antimicrobianos lançados no mercado (WALSH, 2003).

Diferentes espécies de bactérias têm apresentando multirresistência aos fármacos disponíveis para seu tratamento, como por exemplo, cepas de *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*. Outra bactéria que vem ampliando sua resistência é *Staphylococcus aureus* (MIN *et al.*, 2007).

Com o aumento na incidência de cepas bacterianas multirresistentes aos antimicrobianos, se torna imprescindível o desenvolvimento de novas estratégias que visem o combate a esses microrganismos (GRINHOLC *et al.*, 2008). Há uma série de novas propostas neste sentido, tais como antimicrobianos que inibem a biossíntese dos ácidos graxos, ou ainda a biossíntese dos isoprenóides; inibição de aderência bacteriana e do mecanismo de *quorum sense* (TAVARES, 2009).

Embora os agentes antimicrobianos venham sendo utilizados pela humanidade na prática médica desde a década de 40 (DONÁDIO *et al.*, 2002), formulações dessa natureza baseadas em componentes

químicos das plantas ainda são incipientes, o que estimula o direcionamento para estudos de triagem de novas moléculas com propriedades antimicrobianas a partir dos fitoquímicos (COWAN, 1999).

Certas plantas, quando infectadas por microrganismos patogênicos (vírus, bactérias, fungos) ou sob condições de estresse (clima árido, frio, ação de luz ultravioleta) respondem a estes estímulos produzindo novos metabolitos secundários, aos quais se dá o nome de fitoalexinas (PINTO *et al.*, 2002). As fitoalexinas desempenham nos vegetais, um papel semelhante ao dos anticorpos nos animais (ZEIGER & LINCOLN, 2004).

As fitoalexinas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas e diterpenos (CAVALCANTI *et al.*, 2005). Este grupo inclui também as chalconas naturais e seus derivados sintéticos, que têm despertado grande interesse químico e farmacológico por apresentarem uma variedade de atividades biológicas (WON & LIU, 2005). As chalconas constituem uma das maiores classes de produtos naturais, com ampla distribuição em plantas rasteiras e em superiores (NOWAKOWSKA, 2007).

Uma aplicação plausível para as chalconas é no controle de infecções bacterianas, tendo em vista suas propriedades biológicas já relatadas (NI *et al.*, 2004). Além das chalconas, as hidrazonas representam outro grupo de compostos químicos com estruturas promissoras. Essas substâncias pertencem a uma classe de compostos orgânicos, que são iminas derivadas da hidrazina (PACANSKY *et al.*, 1990), que têm recebido um crescente interesse por suas propriedades, como agentes anti-tuberculose e antioxidantes (VIGORITA *et al.*, 1994; HERMES-LIMA *et al.*, 2000).

A descoberta de novas moléculas dotadas de ação antimicrobiana é de grande importância, principalmente, para combater as infecções hospitalares por cepas multirresistentes que são responsáveis por altos índices de morbidade e letalidade. Atualmente, *S. aureus* resistentes à oxacilina ou meticilina são reconhecidas como importantes patógenos causadores de infecções nosocomiais em todo o mundo; e com o surgimento e a disseminação de cepas cada vez mais virulentas e multirresistentes, há necessidade de buscar novos compostos farmacologicamente ativos contra este patógeno (VELASQUEZ-MEZA, 2005).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo a investigação da atividade antimicrobiana de chalconas e hidrazonas frente isolados de

Staphylococcus aureus resistentes à metilina, uma vez que esses microrganismos representam uma grande ameaça à saúde pública.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Estudar a atividade antimicrobiana de chalconas e hidrazonas frente às cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina, visando contribuir para o controle deste importante patógeno.

1.1.2 Objetivos específicos

- Triar compostos ativos frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923;
- Confirmar a resistência à metilina de cepas de *S. aureus* isoladas em hospitais da Grande Florianópolis pelo método de difusão em ágar;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas das chalconas e hidrazonas para as cepas de MRSA;
- Determinar a concentração bactericida mínima das chalconas e hidrazonas que inibirem o crescimento bacteriano;
- Determinar o grau de correlação entre as cepas;
- Analisar o potencial de citotoxicidade das chalconas e hidrazonas em cultura celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS

O homem e os microrganismos partilham uma vida em comum desde a pré-história, entretanto, muitos microrganismos são responsáveis por provocar doenças em humanos. A correlação entre os microrganismos e as doenças começou a ser elucidada no século XIX, principalmente, devido aos estudos de Pasteur e Kock, que demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades que acometiam o homem e outros animais (TAVARES, 2009).

A administração de antibióticos é utilizada com a finalidade de eliminar ou impedir o crescimento destes agentes patogênicos, sem gerar danos ao indivíduo medicado (GRAHAME-SMITH & ARONSON, 2004). A palavra antibiótico deriva do termo antibiosis, que literalmente significa “contra a vida” (anti = contra; bios = vida). Segundo o conceito original de Waksman, estabelecido em 1942, atribui-se o nome de antibióticos às substâncias produzidas por seres vivos, normalmente microrganismos, mas também por alguns vegetais superiores, dotadas de atividade antimicrobiana, atuando como tóxicos seletivos, em pequenas concentrações, tendo então a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos. O componente crítico dessa definição é a “seletividade” ou a “toxicidade seletiva”, pois significa que o composto deve inibir ou matar o microrganismo sem inibir ou matar o organismo hospedeiro (ROBBERS *et al.*, 1997; AMATO NETO *et al.*, 2000; TAVARES, 2009).

A primeira importante descoberta entre os antibióticos, a penicilina, ocorreu acidentalmente quando o médico escocês Alexandre Fleming, em 1928, observou uma cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada com o fungo *Penicillium notatum* (atualmente denominado *P. chrysogenum*) e que, ao redor deste fungo, não havia crescimento de *S. aureus*. Fleming constatou, ainda, que a substância capaz de inibir o crescimento produzida pelo fungo era filtrável, não-tóxica para animais e que exercia atividade antimicrobiana também contra outras cepas bacterianas. (TAVARES, 2009). Robert Robinson e colaboradores, em 1943, identificaram a estrutura da penicilina-G, viabilizando sua síntese. Em 1944 foram isolados a estreptomicina e vários outros antibióticos produzidos pela bactéria *Streptomyces griseus*. Em 1949, Florey, Chain e colaboradores iniciaram a utilização experimental da penicilina no tratamento de processos infecciosos em seres humanos (AMARANTE, 2002; FRAGA, 2003).

Embora a pesquisa de novos antibióticos sempre tenha sido contínua, o número de descobertas reduziu em relação àquelas da “era de ouro dos antibióticos”, ou seja, do ano de 1940 até 1970, quando a maioria das famílias de compostos foi identificada (MCDEVITT & ROSENBERG, 2001).

As substâncias denominadas de antibióticos são aquelas produzidas completamente ou em parte por processo biológico, enquanto que os chamados quimioterápicos são produzidos por síntese laboratorial, sendo utilizados com várias finalidades terapêuticas, eventualmente como anti-infecciosos. Já o termo antimicrobiano é empregado para designar o conjunto de antibióticos e quimioterápicos (AMATO NETO *et al.*, 2000).

Os agentes antimicrobianos podem apresentar variadas formas de classificação, segundo sua origem, espectro de ação, efeito sobre as bactérias, estrutura química, entre outras. A classificação segundo sua origem agrupa os antimicrobianos em naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Segundo ao espectro de ação são separados em três categorias: amplo espectro, espectro intermediário e espectro reduzido. Quanto aos efeitos básicos nas bactérias, são bacteriostáticos e bactericidas. Os agentes bacteriostáticos inibem o crescimento da célula bacteriana, enquanto os bactericidas matam as bactérias (ROSSI & ANDREAZZI, 2005; YONEYAMA & KATSUMATA, 2006). A ação bacteriostática ou bactericida de um antimicrobiano está relacionada com o alvo onde a mesma atua na célula bacteriana. No entanto, este conceito é relativo, e está na dependência da concentração atingida pelo fármaco no meio onde se situa o microrganismo e da sensibilidade deste (TAVARES, 2009).

Os antimicrobianos possuem vários alvos de ação, podendo atuar sobre a:

a) Parede celular: o peptidoglicano é o constituinte fundamental da parede celular bacteriana, conferindo rigidez à célula. A formação deste constituinte pode ser inibida por qualquer antimicrobiano que seja capaz de interferir na síntese de peptidoglicano, como as penicilinas, as cefalosporinas, a vancomicina e a bacitracina, causando um efeito destrutivo na bactéria. Estes antibióticos inibem a síntese da parede celular, por agirem em várias etapas da formação do mucopeptídeo, o peptidoglicano, geralmente por mecanismo competitivo e inibitório. Participam também desse processo enzimas autolíticas, cuja formação em excesso é induzida pelos mesmos antibióticos. Como decorrência, a parede celular que se forma é incompleta, a bactéria adquire a forma de esferoplasto e acaba por sofrer lise;

b) Membrana Plasmática: as alterações físico-químicas ocasionam a morte bacteriana, pois a permeabilidade seletiva é comprometida, levando a saída de elementos vitais. Os antimicrobianos que têm a membrana como alvo, como as polimixinas, acabam por liberar o conteúdo celular para o exterior. Dependendo do grau de alteração da integridade da membrana citoplasmática, íons, moléculas pequenas ou mesmo macromoléculas podem evadir do meio intracelular, com prejuízo variável ao seu metabolismo. Além disso, a morte pode ocorrer devido à alterações do sistema respiratório da célula, uma vez que essas substâncias podem se ligar aos constituintes normais da membrana, atuando como verdadeiros detergentes, e provocando assim, sua desorganização funcional. A membrana também pode ser afetada por um efeito secundário, em que antibióticos agem na síntese protéica, formando proteínas anormais, conhecidas como “proteínas erradas”, as quais podem vir a originar uma membrana defeituosa.

c) Síntese de proteína: a síntese protéica pode sofrer interferência dos antibióticos em várias fases do seu desenvolvimento, como na formação dos RNAs (mensageiro, ribossomal e transportador), na fixação do RNAm ao ribossomo, por alterações no ribossomo ou ainda na fixação do RNAt ao ribossomo. Como decorrência da inibição da síntese protéica os microrganismos sensíveis aos antibióticos como as tetraciclina, entre outros, deixam de crescer e se tornam incapazes de multiplicar-se, a bactéria acaba morrendo devido a não-renovação de seus constituintes vitais. Estes fármacos também podem atuar na formação de proteínas anormais, que ao serem incorporadas à membrana celular, enzimas respiratórias e outras estruturas essenciais, provocam alteração em sua função, o que acarreta no bloqueio do metabolismo celular.

d) Síntese de ácidos nucleicos: antimicrobianos como a rifampicina e o metronidazol, interferem na síntese de DNA ou RNA, ou ainda de ambos. A rifampicina atua especificamente sobre a RNA polimerase dependente do DNA, o que leva a supressão da formação da cadeia na síntese do RNA. Já o metronidazol age sobre a DNA girase, inibindo a transcrição da informação gênica; impedindo o desenvolvimento completo do espiral do DNA, levando as células à morte. Em consequência da ação sobre a síntese do DNA, as bactérias deixam de se reproduzir, e o bloqueio da síntese do RNA causa a inibição da formação de proteínas, a qual é dependente dos três tipos de RNA. Como resultado dessas ações, o efeito destes antibióticos é primariamente bacteriostático (AMATO NETO *et al.*, 2000; TAVARES, 2009).

Um grave problema associado ao uso de antibióticos é a utilização dos mesmos com muita frequência, principalmente os mais antigos, tornando-os ineficazes, devido ao surgimento e seleção de cepas resistentes aos mesmos (TIBBETTS *et al.*, 2003). Outro problema se refere ao uso equivocado na medicina humana, como por exemplo, o emprego dos antibióticos no tratamento de infecções virais, para os quais não apresentam nenhum tipo de efeito (PETRONE *et al.*, 2004).

Portanto, o uso desenfreado dos antibióticos e sem uma cuidadosa avaliação das suas indicações promoveu às bactérias defesas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência (VARALDO *et al.*, 2009).

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Diz-se que uma bactéria é resistente a um determinado antibiótico quando a mesma é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória que este fármaco atinge no sangue (TAVARES, 2009). O fenômeno da resistência bacteriana aos diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções de tratamento das infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (WISE, 2003). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, poucos recursos são empregados na monitorização de ações sobre o uso racional de antibióticos e também são limitados os dados sobre o uso desses agentes em hospitais (NICOLINI *et al.*, 2008).

Denomina-se resistência simples quando o microrganismo é resistente a um só fármaco; resistência múltipla quando é resistente simultaneamente a dois ou mais fármacos. Diz-se resistência cruzada quando o mecanismo bioquímico de resistência a um fármaco é o mesmo para outras (TAVARES, 2009).

Existem dois tipos de resistência bacteriana, a natural ou a adquirida. A resistência natural ou intrínseca é inerente a uma determinada espécie bacteriana e compõe a herança genética cromossômica do microrganismo. A resistência natural é um caráter hereditário, transmitido verticalmente a células-filhas, comandado por genes, que determinam a ausência de receptores para a ação de antibióticos ou a existência de estruturas e mecanismos que impedem a ação do fármaco. Esta é representada por grupos bacterianos que não são sensíveis a determinados antibióticos, como por exemplo, os microrganismos Gram-negativos resistentes à penicilina-G. Já a resistência adquirida ou secundária consiste no surgimento do fenômeno de resistência a um ou vários antimicrobianos numa população

bacteriana originalmente sensível a estes mesmos antimicrobianos. Ocorre pelo desenvolvimento de mecanismos de defesa, seja através de mutações ou pela aquisição de material genético exógeno (AMATO NETO *et al.*, 2000; ROSSI & ANDREAZZI, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005; AL HARONI, 2008; TAVARES, 2009).

A mutação bacteriana é um fenômeno de ocorrência espontânea ou induzida, que pode resultar na codificação de genes de resistência aos antimicrobianos. A mutação espontânea ocorre no momento da divisão celular, enquanto que a induzida é provocada por determinados agentes mutagênicos, tais como raios X, raios ultravioletas e o ácido nitroso (AMATO NETO *et al.*, 2000; TAVARES, 2009).

Os plasmídeos e bacteriófagos são materiais genéticos externos aos cromossomos relacionados com a resistência antimicrobiana, além de outros elementos móveis de inserção no DNA, como os transposons e os integrons. Estes genes podem ser transferidos de organismo para organismo, inclusive entre espécies distintas mediante mecanismo de transferência de genes tais como, conjugação, transdução e transformação (HALL & STOKES, 1993; HALL, 2004).

A transferência da resistência, ou seja, dos genes que a codificam, pode ocorrer tanto durante a divisão celular bacteriana, por transferência vertical, como também de uma bactéria para outra, por transferência horizontal. Na transferência vertical a população bacteriana da progênie passa a ter os genes de resistência, originalmente encontrado no genoma da célula progenitora. No caso da transferência horizontal a informação genética é transferida de uma bactéria para outra da mesma espécie ou, até mesmo, de cepas de gêneros distintos, pelos mecanismos de conjugação, transformação ou transdução (AMATO NETO *et al.*, 1994).

Na conjugação, o material genético de uma célula bacteriana viável é transferido para outra, através do contato físico entre elas. Atualmente, este mecanismo constitui o mais frequente processo de transferência de resistência bacteriana aos antimicrobianos em hospitais, favorecido pela pressão seletiva devido ao uso desses fármacos nesse ambiente. Já o fenômeno da transdução ocorre pela transferência de genes bacterianos por intermédio de bacteriófagos, sendo que esses últimos utilizam o DNA bacteriano para sua própria multiplicação e, podem incorporar ao genoma das novas partículas de fragmentos de DNA cromossômico ou plasmidial da bactéria parasitada, contendo genes de resistência. Geralmente, ocorre apenas entre espécies bacterianas relacionadas entre si. Já a transformação é o processo pelo qual a aquisição da informação genética se dá através da incorporação de DNA solúvel, proveniente de parte do cromossomo ou do plasmídeo,

liberado no meio por outra bactéria. Em condições naturais, a transformação pode ocorrer quando uma bactéria sofre morte por lise e parte do seu DNA livre no ambiente é incorporado por outra. Normalmente, só ocorre entre bactérias da mesma espécie (AMATO NETO *et al.*, 2000; TAVARES, 2009).

A expressão dos genes de resistência bacteriana aos antimicrobianos reflete nos mecanismos químicos de resistência, que podem ser enquadrados em cinco amplas categorias (HEISIG, 2001; ROSSI & ANDREAZZI, 2005; AL HARONI, 2008).

A inativação direta da molécula antimicrobiana se refere à produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos, como é o caso da enzima β -lactamase, que degrada os antibióticos β -lactâmicos. É o mecanismo predominante e mais eficaz de resistência bacteriana. No caso das enzimas β -lactamases, essas inativam o agente antimicrobiano através da hidrólise do anel β -lactâmico da molécula (NIKAIDO, 1994; YONEYAMA & KATSUMATA, 2006). Já a modificação da estrutura-alvo na célula bacteriana consiste na diminuição da sensibilidade aos antibióticos gerada pela modificação do alvo estrutural engloba diversas estratégias dos microrganismos, com o objetivo de interferir ou limitar a interação do antibiótico com o patógeno, prevenindo o efeito bacteriostático ou bactericida (AL HARONI, 2008). Um exemplo é a vancomicina, que tem como sítio-alvo a extremidade D-alanina-D-alanina do pentapeptídeo precursor do peptidoglicano. As cepas resistentes sintetizam peptídeos com extremidades alteradas, na maioria das vezes sendo uma D-alanina-D-lactato, e que acaba por ter baixa afinidade à vancomicina (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998; TRAN & JACOBY, 2002). A modificação da estrutura-alvo na célula bacteriana chama mais a atenção dos pesquisadores, pois o acúmulo do antimicrobiano dentro da célula bacteriana mostra-se fundamental para a sua atuação, sendo que as bombas de efluxo podem estar presentes, tanto na resistência intrínseca, como na adquirida, para os diversos antibióticos, levando a energia celular utilizada a reduzir a concentração citoplásmica do fármaco (STOVER *et al.*, 2000; HOSKINS *et al.*, 2001). Alguns mecanismos propostos para o efluxo dos antimicrobianos incluem transportadores multidroga para exportar os compostos nas bactérias Gram-negativas, sendo esta resistência facilmente transferida (BLACKMORE *et al.*, 2001; LEVY, 2002). Já a redução da concentração do antimicrobiano no citoplasma bacteriano pelo efluxo ativo refere-se na alteração da permeabilidade, uma vez que, para os antibióticos exercerem suas funções efetivamente, esses devem ter acesso aos alvos intracelulares. Para isso, no caso das bactérias Gram-

negativas, o fármaco deve conseguir ultrapassar a membrana externa, cuja permeabilidade é limitada, sendo responsável por conferir grande resistência neste grupo bacteriano. Estes organismos regulam a permeabilidade de sua membrana externa através da presença de canais hidrofílicos conhecidos como porinas. A alteração nesta estrutura ou a perda destes canais pode interferir na entrada de substâncias antimicrobianas na célula. Contudo, estudos recentes afirmam que a membrana externa só é realmente efetiva na resistência microbiana quando atua de forma combinada com outros mecanismos. Os biofilmes são exemplo disto, pois conferem à bactéria altos níveis de resistência a muitos antimicrobianos, porque impedem ou limitam a entrada desses nas células (POOLE, 2002). A resistência devida à permeabilidade pode ainda estar relacionada com diferenças no peptidoglicano e na membrana plasmática. A alteração da permeabilidade celular e via metabólica alternativa é a utilização de uma via metabólica alternativa pelo microrganismo, sendo esta via diferente daquela inibida pelo fármaco. Este mecanismo é codificado em genes plasmidiais, sendo importante causa de resistência em enterobactérias (MCDERMOTT *et al.*, 2003).

A resistência bacteriana vem aumentando rapidamente e os riscos dessa transformação se reflete principalmente sobre pacientes imunocomprometidos (devido a AIDS, quimioterapia para o câncer e transplante de órgãos), pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos e, ainda, sobre aqueles que permanecem internados por períodos de tempo prolongado (geralmente idosos) e recebendo tratamentos múltiplos com antibióticos. Os pacientes acima mencionados podem representar um real veículo de propagação da resistência, a qual se acelera pelas mudanças sociais e tecnológicas, tais como as viagens aéreas, que favorecem a transmissão de bactérias resistentes entre localidades distantes. (LIVERMORE, 2003; THOMSON *et al.*, 2004).

O uso rotineiro de antibióticos como promotores de crescimento em animais também constitui um sério problema de saúde pública, especialmente, quando as mesmas classes de antibióticos são utilizadas em humanos, sendo uma possível fonte de bactérias resistentes (WEGENER, 2003). A versatilidade das populações bacterianas na adaptação à toxicidade ambiental, associada à facilidade da transferência do material genético, demonstra que a resistência antibiótica é um fenômeno biológico inevitável e que continuará sendo um problema clínico crônico (MCDERMOTT *et al.*, 2003).

As principais conseqüências da resistência bacteriana consistem no aumento do custo e do tempo de tratamento, utilização de medicamentos mais caros e até mesmo mais tóxicos, aumento do tempo de hospitalização, isolamento do paciente, aumento da frequência e da gravidade das infecções hospitalares, além do aumento do índice de mortalidade associada a este tipo de infecção (GURGEL & CARVALHO, 2008).

O desenvolvimento da resistência bacteriana pode ser controlado com a restrição do uso de antibióticos, ou seja, que a sua prescrição seja permitida apenas para o controle e tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana e, sempre que possível, orientada por antibiograma. Além disso, a administração sistêmica, o uso de concentrações adequadas, respeitando a duração do tratamento, e as associações de múltiplos fármacos, também são medidas preventivas à resistência. A educação continuada dos profissionais da área da saúde e o trabalho de equipes multiprofissionais são importantes para a prevenção da resistência (HAMILTON-MILLER, 2004).

Dentre os microrganismos que têm gerado grande preocupação devido à multirresistência aos fármacos disponíveis para tratamento, destaca-se *S. aureus*.

2.3 MICRORGANISMO ALVO: *S. aureus* RESISTENTES À METICILINA

O nome dos estafilococos foi designado por Alexander Ogston após ter usado a expressão em francês “*staphyle*” (conjunto das uvas). O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias Gram-positivas, cocóides, imóveis quando cultivadas em meio sólido, com cerca de 1 µm de diâmetro, que são microrganismos anaeróbios facultativos fermentadores de glicose e não formadores de esporos. O principal reservatório de *Staphylococcus aureus* é o homem (TELLAROLLI *et al.*, 2003; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

As amostras identificadas como *Staphylococcus aureus* estão entre as espécies mais frequentemente isoladas nos seres humanos. Essa bactéria normalmente coloniza a pele e as membranas mucosas. Contudo, elevadas concentrações desse microrganismo podem colonizar as axilas, a porção anterior das narinas e o períneo e podem também estar distribuídas em outros nichos, como a orofaringe, a boca, a vagina, o trato intestinal e as glândulas mamárias, tornando-se bactérias potencialmente patogênicas quando encontram porta de entrada, ou na existência de doença, que predisponha ao desenvolvimento de infecção.

Algumas infecções mais sérias provocadas por este patógeno, são doenças graves e disseminadas, como pneumonias, meningites, carbúnculo renal, bacteremias e endocardites (MURRAY *et al.*, 2003), sendo que *S. aureus* é um patógeno comum que afeta indivíduos de todas as idades, mas acomete principalmente os jovens e os idosos (CDC, 2004).

Estudos epidemiológicos recentes sugerem que *S. aureus* representa, atualmente, o principal agente etiológico das infecções assistidas nos setores de emergência nos Estados Unidos (VANDENESCH *et al.*, 2003; MORAN *et al.*, 2006). Um dado surpreendente, publicado em 2005, apontou o *S. aureus* como responsável pela grande maioria dos casos de endocardite infecciosa (EI) em todo o mundo (FOWLER *et al.*, 2005). No Brasil e nos EUA, a incidência da EI associada ao *S. aureus* foi de 37,5% e de 37,2%, respectivamente, no período de junho de 2000 a dezembro de 2003 (FOWLER *et al.*, 2005).

A extraordinária plasticidade desta bactéria como patógeno humano tem sido atribuída aos numerosos fatores de virulência que este microrganismo produz, estando ancorado à superfície celular bacteriana ou sendo secretado para o meio extracelular, incluindo pelo menos cinco toxinas citolíticas ou produtoras de lesão da membrana, bem como uma toxina esfoliativa, e cinco enterotoxinas (KATAYAMA, *et al.*, 2000; KONEMAN *et al.*, 2001; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir um exopolissacarídeo, chamado de cápsula, que foi descrita pela primeira vez por Gilbert em 1931. Em 1982, Karakawa e Vann relataram pela primeira vez, que cepas de *S. aureus* apresentam oito sorotipos capsulares (O'RIORDAN & LEE, 2004). Estudos de sorotipagem estafilocócicas isoladas de coleções de várias regiões geográficas têm revelado que os sorotipos 5 e 8 representam 25% e 50%, respectivamente, daqueles isolados em seres humanos (LEE *et al.*, 1990). Em 1985, Sompolinsky e colaboradores incluíram três novos sorotipos em sua coleção, elevando o número a onze sorotipos capsulares. A cápsula tem por principal função atuar como fator de virulência e, assim, proteger a bactéria contra a fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares (TRABULSI *et al.*, 2008). As cápsulas de *S. aureus* também promovem a formação de abscesso, assim como podem servir para facilitar a aderência dos microrganismos às células dos hospedeiros. Outro fator de virulência do *S. aureus* é a proteína A, que está presente na parede celular, sendo composta por uma única cadeia polipeptídica com quatro resíduos de tirosina, expostos em sua

superfície, que determinam a sua capacidade de unir-se à região Fc da molécula de imunoglobulina G (IgG), impedindo que estes anticorpos interajam com as células fagocitárias. Outros constituintes da parede celular destes microrganismos são os glicopeptídeos e os ácidos teicóicos, que parecem estar envolvidos na ativação do complemento e na aderência, contribuindo para a virulência. Entre os produtos extracelulares que influenciam na virulência bacteriana, podem ser citadas: as enzimas catalase, fibrinolisin, hialuronidase, lipases e fosfolipase C específica para fosfatidilinoisitol, as hemolisinas (α -hemolisina, β -hemolisina, δ -hemolisina e τ -hemolisina) e as toxinas (leucocidina, exfoliatinas e as enterotoxinas A-E) (KONEMAN *et al.*, 2001; O'RIORDAN & LEE, 2004; TRABULSI *et al.*, 2008).

Anteriormente à introdução de antimicrobianos na prática clínica, a letalidade de bacteremia por *Staphylococcus aureus* chegou a ultrapassar 80%, e mais de 70% dos pacientes desenvolviam infecções metastáticas (LOWY, 2003). No início da década de 1940, com a introdução da penicilina, o prognóstico desses pacientes melhorou (MARANAN *et al.*, 1997; LOWY, 2003). No entanto, já em 1942 foram relatadas cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina (MARANAN *et al.*, 1997). A resistência à penicilina foi reconhecida e aumentou inicialmente entre as cepas hospitalares, seguidas de cepas da comunidade, e já no final dos anos 1960, as porcentagens de resistência hospitalares e comunitárias chegaram a 90% e 70%, respectivamente, em algumas regiões da Europa (JESSEN *et al.*, 1969). Atualmente, a maioria das cepas de *S. aureus* que causam infecção, ou simplesmente colonizam adultos saudáveis, é resistente à penicilina (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Considerando os altos índices de resistência de isolados de *S. aureus* à penicilina e sabendo-se que essa resistência se deve à hidrólise enzimática do anel beta-lactâmico, no final de 1950, cientistas iniciaram estudos sobre modificações estruturais no anel básico da penicilina, com o intuito de proteger a molécula da ação enzimática dos microrganismos. Assim, em 1959, foi realizada a modificação estrutural no radical R do anel básico da penicilina (Figura 1), sintetizando o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), molécula semi-sintética que passou a ser denominada de metilicina (Figura 2), e que apresentava melhor atividade contra *S. aureus* produtores de betalactamases (TAVARES, 2009).

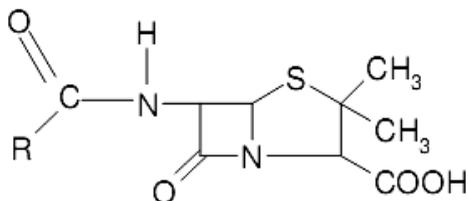


Figura 1: Estrutura química da penicilina

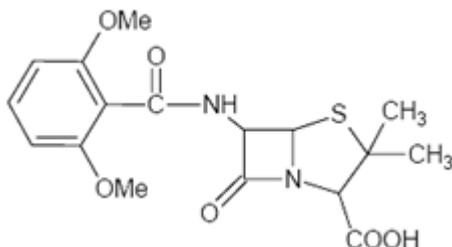


Figura 2: Estrutura química da meticilina

Contudo, pouco tempo depois da introdução da meticilina, em 1961, na Europa, já foram relatados casos de cepas de *S. aureus* resistentes a este fármaco (Figura 3) (VIVONE & MOREIRA, 2005; CHAMBERS & DELEO, 2009).

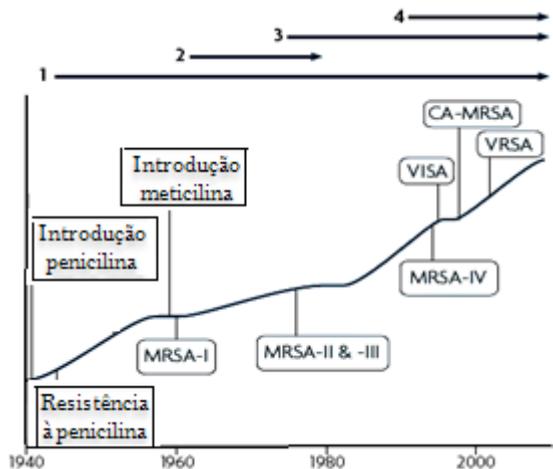


Figura 3: Evolução da Resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* (Modificada de CHAMBER & DELEO, 2009).

Nas décadas seguintes aos primeiros relatos de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), estas se tornaram um grave problema de saúde pública mundial (ZETOLA *et al.*, 2005). Atualmente, são consideradas importantes agentes de infecções hospitalares e comunitárias (MICHELIM *et al.*, 2005; SOUZA & FIGUEIREDO, 2008).

A preocupação referente ao aumento da incidência de cepas de MRSA não está apenas relacionada ao fato das cepas serem resistentes a este quimioterápico, mas sim, por exibirem resistência, simultaneamente, a todos os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos) e, frequentemente, a outras classes de antimicrobianos utilizadas na terapêutica, como os aminoglicosídeos, o cloranfenicol, a clindamicina, as fluorquinolonas, os macrolídeos, restringindo muito as opções de tratamento para o paciente (VERONESI & FOCACCIA, 2004; MOREILLON, 2008).

Staphylococcus aureus possui cinco proteínas ligadoras de penicilina, as PBPs (“*penicillin binding protein*”), que são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede celular bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais à síntese de parede celular e têm alta afinidade (sítios-alvo) para os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos se deve à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP2’, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, uma seqüência de 2130 pares de bases (pb) do DNA de origem não estafilocócica, que é responsável pela resistência das cepas MRSA a todos os antibióticos beta-lactâmicos (SOUZA *et al.*, 2005 a). Esta proteína está ausente nos *S. aureus* sensíveis a tais antibióticos (LENCASTRE *et al.*, 1994; MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

As infecções causadas por MRSA são nosocomiais, isto é, são adquiridas quase que exclusivamente nos hospitais, devido a permanência dos pacientes a longos períodos de internação, a colonização ou infecção pela exposição prévia aos antibióticos, a admissão na unidade de tratamento intensivo, as cirurgias, entre outros fatores. As infecções adquiridas fora das dependências hospitalares são chamadas infecções adquiridas na comunidade (BURTON & ENGELKIRK, 2005; SOUZA & FIGUEIREDO, 2008; CHAMBERS, 2006). Cerca de 70% dos isolados de *Staphylococcus aureus* de infecções nosocomiais, nos principais hospitais brasileiros, são resistentes à meticilina (TELLAROLLI *et al.*, 2003; BURTON &

ENGELKIRK, 2005). Outras espécies do gênero *Staphylococcus* têm sido isoladas em infecções hospitalares e também têm demonstrado resistência aos vários antimicrobianos utilizados em terapêutica (TAVARES, 2000; SADER *et al.*, 2006). Já a maioria das infecções comunitárias causadas pelo *S. aureus* é sensível à meticilina (LODISE & MCKINNON, 2003). No entanto, um alerta global recente ocorreu através de publicações que apontam a emergência de um “novo patógeno”, designado CA-MRSA (do inglês; *community-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus*), capaz de causar infecções, algumas vezes fatais, em indivíduos que não apresentam história de risco para infecções por estafilococos, podendo assim acometer crianças e adultos jovens saudáveis, inclusive atletas. As cepas de CA-MRSA apresentam padrões fenotípicos e genotípicos diferentes das cepas de MRSA classicamente envolvidas em infecções nosocomiais ou associadas a serviços de saúde (VADENESCH *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Dessa forma, os estudos que procuram novos fármacos eficientes contra MRSA são extremamente importantes, pois visam abrandar as altas taxas de morbidade e mortalidade causadas por esta bactéria. Assim, a química medicinal tem sido imprescindível e essencial à saúde pública, tornando-se um importante alicerce no incremento do arsenal terapêutico (CLARK, 2002; THOMAS, 2003).

2.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um papel muito importante no processo de desenvolvimento de fármacos. Os produtos naturais utilizados para tratar e prevenir doenças, desde a origem do homem, têm sido provenientes de plantas, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres (KOEHN & CARTER, 2005; CHIN *et al.*, 2006). Sendo assim, o Brasil, com a grandeza do seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que ainda hoje, congrega o maior número de pesquisadores (SANDES & DI BLASI, 2000), devendo-se isso, principalmente, ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas para o isolamento e a purificação de substâncias (BERDY, 1989).

Tanto os métodos clássicos de isolamento de produtos naturais quanto à utilização de processos de síntese química na geração destas substâncias, são uma fonte promissora de novas substâncias potencialmente úteis como protótipos (STROBEL, 2002; MACIAS *et al.*, 2003). Além dos métodos mencionados acima, podem ser usados na busca de novos medicamentos a química combinatória e a modelagem molecular (BALUNAS & KINGHORN, 2005; CHIN *et al.*, 2006).

Apesar de todo o avanço da síntese química, da química combinatória e do planejamento racional de fármacos, as dificuldades no aproveitamento dos recursos naturais com o objetivo de desenvolver fármacos incluem o longo dispêndio de tempo, elevados custos, falta de leis específicas para a exploração da biodiversidade, escassez de informações sobre a identidade dos compostos naturais e a dificuldade no trabalho com estes produtos (STROHL, 2000; HARVEY, 2000). Entretanto, os produtos naturais são uma das principais fontes de agentes terapêuticos inovadores para as doenças infecciosas, e muitas moléculas naturais ou sintetizadas a partir do modelo natural servem como importantes estruturas medicamentosas (COS *et al.*, 2006; VUORELA *et al.*, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Além da fonte de síntese dos fármacos, grande parte dos adjuvantes farmacêuticos empregados na pesquisa também é de origem vegetal (SCHENKEL *et al.*, 2002). Portanto, os produtos naturais continuarão desempenhando um papel fundamental como substâncias ativas e modelos moleculares para a descoberta e validação de novos fármacos (VUORELA *et al.*, 2004).

Em 1969 havia cerca de um milhão de substâncias derivadas de produtos naturais isoladas de diversas fontes, contribuindo para o desenvolvimento da biotecnologia e da bioengenharia, além de novas demandas na terapia humana (BERDY, 1989). Os produtos naturais e medicamentos derivados destes são usados para tratar 87% das categorias de doenças humanas, incluindo os agentes antibacterianos, antineoplásicos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossuppressores, entre outros (NEWMAN *et al.*, 2003). De acordo com Lima (2007) e Andricopulo e colaboradores (1996), a química medicinal tem evoluído expressivamente, visto que, dentre os fármacos disponíveis no mercado farmacêutico, a síntese orgânica é responsável por 75% deles. Existem várias classes de substâncias orgânicas inseridas neste conjunto, dentre as quais podem ser citados os compostos fenólicos, grupo onde se encontram as chalconas e seus derivados sintéticos, que possuem estrutura química relativamente simples e podem sofrer modificações

estruturais, visando a ampliação de suas atividades biológicas (CARVALHO *et al.*, 2002).

2.5 CHALCONAS

2.5.1 Aspectos estruturais e químicos

As chalconas são compostos fenólicos derivados do metabolismo vegetal secundário. Os compostos fenólicos apresentam como estrutura fundamental um anel aromático, com um grupamento hidroxila substituindo ao menos um hidrogênio. As chalconas possuem um núcleo fundamental denominado benzal-acetofenona (ALLINGER *et al.*, 1976). Na biossíntese dos flavonóides e isoflavonóides, as chalconas e seus isômeros (*cis* e *trans*), quimicamente conhecidos como 1,3-difenil-2-propen-1-ona são intermediários comuns, considerados precursores (Figura 4) e frequentemente encontrados em concentrações significativas em plantas de uso medicinal (NI *et al.*, 2004; NOWAKOWSKA, 2007). As primeiras estruturas chalcônicas foram sintetizadas em laboratório em meados de 1800, e seu isolamento de plantas ocorreu a partir do ano de 1910 (SHIMOKORIYAMA, 1962).

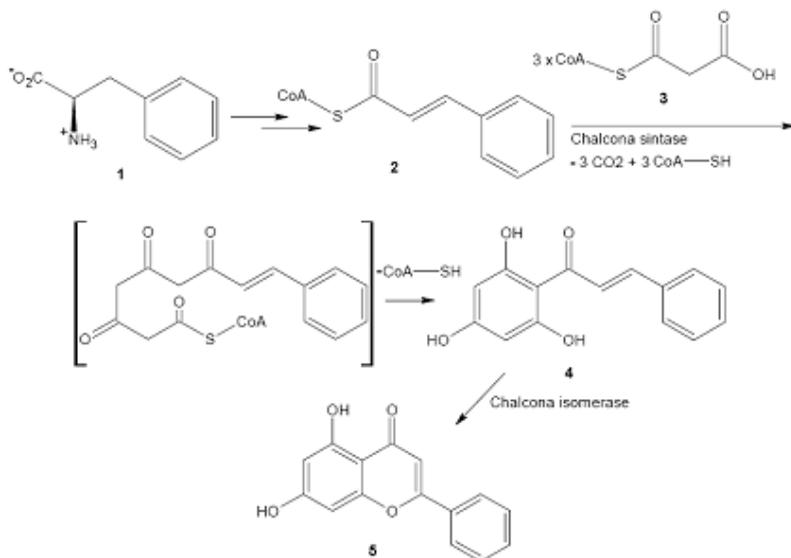


Figura 4: Esquema da biossíntese dos flavonóides: 1 = L-fenilalanina; 2 = cinamoil-CoA; 3 = malonil-CoA; 4 = chalcona hidroxilada; 5 = flavona

As chalconas naturais ocorrem principalmente como pigmento amarelo nas pétalas, justificando o nome (derivado do grego *chalkos* = bronze), que passam à cor vermelha em meio alcalino, mas também têm sido encontradas em diferentes estruturas vegetais, como em caules, raízes, folhas, frutos e sementes, podendo estar sob a forma livre ou ligada a açúcares (glicosídeos) e proteínas (SCHENKEL *et al.*, 2002). Na natureza podem ser encontradas desde em plantas rasteiras e até em arbóreas, dentre as quais podemos citar os gêneros *Angélica* (TABATA *et al.*, 2005), *Piper* (MEISSNER & HABERLEIN, 2005) e *Ruscus* (BOYLE *et al.*, 2003).

As chalconas possuem papel importante em sistemas ecológicos, em função das cores que produzem nos vegetais, pois estão envolvidas na polinização, sendo atraentes aos insetos e/ou pássaros. Grande parte da cor amarela das plantas se deve à presença de carotenos, mas em certos membros das famílias Asteraceae, Oxalidaceae, Scrophulariaceae, Gesneriaceae, Acanthaceae e Liliaceae, as chalconas também contribuem significativamente na pigmentação da corola (ZUANAZZI, 2002). Além disso, também atuam nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, fotorreceptores e repelentes de predadores (ZUANAZZI, 2002).

A classificação primária das chalconas analisa o número de substituintes presentes no núcleo B, que pode ser nos carbonos um, dois ou três. As chalconas de origem natural apresentam sempre substituintes e, entre os mais comuns, localizados no núcleo aromático, estão as hidroxilas, metoxilas, *O*-glicosilas, *C*-glicosilas e *C*-alquilas (ZUANAZZI, 2002).

Quimicamente, as chalconas são flavonóides de cadeia aberta, em que os dois anéis aromáticos são unidos por um sistema de três carbonos, constituindo cetonas α , β insaturadas, onde tanto a carbonila (C=O) quanto a porção olefínica (-C=C-) estão ligadas a grupamentos aromáticos (Figura 5) (RAO & TZENG, 2004).

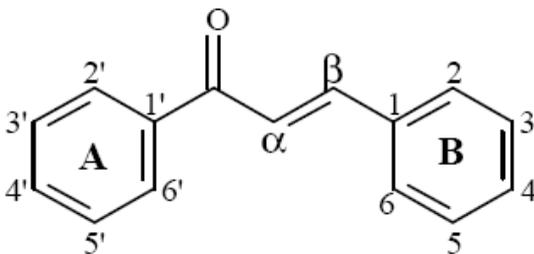


Figura 5: Núcleo fundamental das chalconas

Do ponto de vista químico, são várias as modificações que podem ser realizadas nas chalconas. De acordo com a natureza dos substituintes, podemos classificar as interações quanto aos efeitos estéricos causados por substituintes volumosos, aos efeitos eletrônicos decorrentes da diferença de eletronegatividade entre átomos ou grupos substituintes, ou a presença de sítios ácido/base de Lewis, possibilitando a formação de pontes de hidrogênio e/ou complexos intra e intermoleculares (CESARIN *et al.*, 2001). Desta forma, as alterações estruturais mais descritas para as chalconas são: substituições nos anéis A e B em diferentes posições (JURCSAK & ZANINI, 1999) e adições halogênicas na dupla ligação (BIEBER, 1999). O vínculo intramolecular entre o hidrogênio do grupo hidroxila na posição C-2' e o átomo de oxigênio carbonílico tem um efeito óbvio em muitas propriedades físico-químicas de chalconas hidroxiladas nesta posição, tais como absorvidade, formação de quelantes metálicos, propriedades espectroscópicas, comportamento ácido-básico, dentre outras (DEVIA *et al.*, 1999).

Muitas chalconas foram aprovadas para o uso na clínica médica ou para triagens em humanos (DIMMOCK *et al.*, 1999). Além disso, também vem sendo utilizada pela indústria alimentícia, sendo que a chalcona glicirrizina, com sabor adoçante, tem sido utilizada comercialmente como aditivo alimentar no Japão (KIMURA *et al.*, 2001).

A presença de derivados hidroxilados é uma característica química marcante das chalconas, assim como a insaturação α , β , às quais são atribuídas diversas atividades biológicas (NI *et al.*, 2004; HIJOVA, 2006), dentre as quais estão: bactericida (DIMMOCK *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2004; ÁVILA, 2008) e bacteriostática, inclusive contra *Mycobacterium tuberculosis* (PAPPANO *et al.*, 1985), antiviral (ISHITSUKA *et al.*, 1982; DIMMOCK *et al.*, 1999), antifúngica (DIMMOCK *et al.*, 1999; BOECK *et al.*, 2005), antimalárica (LI *et al.*, 1995; DIMMOCK *et al.*, 1999; DOMINGUEZ *et al.*, 2005) e antileishmânia (DIMMOCK *et al.*, 1999; BOECK, 2006). Além disso, há relatos de efeitos antioxidante (ANTO *et al.*, 1995; DIMMOCK *et al.*, 1999), antiinflamatório (BATT *et al.*, 1993; DIMMOCK *et al.*, 1999; WON & LIU, 2005) e antitumoral (YAMAMOTO *et al.*, 1991; DIMMOCK *et al.*, 1999; RAO & TZENG, 2004; WON & LIU, 2005).

A atividade antimicrobiana das chalconas, dentre as demais atividades, é a mais citada (ADEWUNMI *et al.*, 1987; LÓPEZ *et al.*, 2001; VALLA *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana, em especial a atividade antifúngica, esteja associada à

reatividade da função cetona (LÓPEZ *et al.*, 2001; BOECK *et al.*, 2005). Desta forma, a unidade cetônica, assim como aceptores na reação de Michael, liga-se aos grupamentos tiol de certas proteínas, inibindo a biosíntese da parede celular fúngica (BOWDEN *et al.*, 1990).

Por estes motivos, as chalconas têm sido objeto de vários estudos teóricos e experimentais, principalmente visando a determinação de suas estruturas, sua reatividade química, sua atividade antimicrobiana, sua capacidade de inibição e indução enzimática, entre outras aplicações no campo terapêutico (DEVIA *et al.*, 1999).

2.5.2 Biossíntese das chalconas

A origem de todos os metabólitos secundários de plantas se resume a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais, que são o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico dá origem aos aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. É formado através da condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4- fosfato (SANTOS *et al.*, 2002). Alguns metabólitos secundários derivam não apenas do ácido chiquímico ou do acetato, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos taninos condensados e dos flavonóides, grupo onde se encontram as chalconas (SANTOS *et al.*, 2002).

O esqueleto básico das chalconas é resultante das rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A primeira origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, responsável pela unidade fenilpropano, formada por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos. A segunda resulta no outro anel aromático (anel A), pela inclusão de unidades de malonil-CoA ao esqueleto básico das chalconas (SANTOS *et al.*, 2002).

2.5.3 Atividade antimicrobiana das chalconas

Em relação à atividade antimicrobiana, a efetividade das chalconas e seus derivados frente a microrganismos Gram-positivos é freqüentemente maior do que contra bactérias Gram-negativas. No entanto, alguns análogos também podem inibir o crescimento de microrganismos Gram-negativos (OPLETALOVA, 2000), como já relatado para a bactéria *Escherichia coli* (ALVAREZ *et al.*, 2004). Já como relato da efetividade de tais compostos frente às espécies

bacterianas Gram-positivas se pode citar *Bacillus cereus* (ÁVILA, 2008), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (ALCARAZ *et al.*, 2004; ÁVILA, 2008), *Staphylococcus epidermidis* (DIMMOCK *et al.*, 1999), dentre outras.

Cinco componentes fitoquímicos da raiz da leguminosa *Erythrina poeppigiana* (corticeira) foram isolados, sendo três isoflavonóides (eripoegina A, dimetilmedicarpina e sanduicensina) e duas chalconas, eripostirene (4, 2'-dihidroxi-4'-metoxi-5'-prenil-chalcona) (Figura 6a) e a angolensina (α -metildioxibenzoína) (Figura 6b). Todos os compostos mostraram atividade antibacteriana contra treze isolados de *S. aureus*, sendo que dos cinco compostos analisados, a chalcona eripostirene apresentou a menor CIM frente à essa bactéria (SATO *et al.*, 2003).

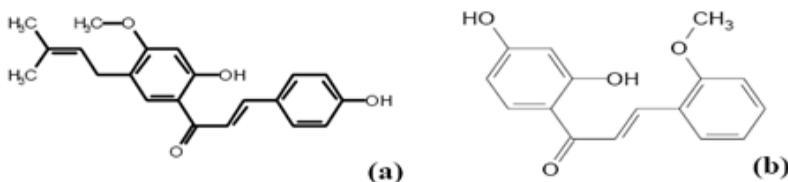


Figura 6: Estrutura química das chalconas eripostirene (a) e angolensina (b)

Entre as retrochalconas, isto é, as que apresentam substituintes oxigenados ligados em posições C-2,3, ou C-2,3,4, ou ainda, C-2,4,6 (ZUANAZZI, 2002), a licochalcona A (Figura 7) foi isolada da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza inflata*). Nielsen e colaboradores (2004) testaram análogos desta chalcona contra *S. aureus* e concluíram que a presença do grupo hidroxila em posição C-4' é importante para a atividade antibacteriana.

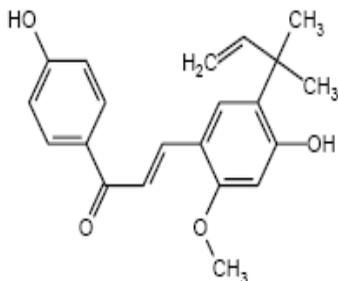


Figura 7: Estrutura química das licochalconas A

Zampini e colaboradores (2005) estudando outra espécie vegetal, a *Zuccagnia punctata*, observaram que os metabólitos desta

planta apresentavam relevante atividade antimicrobiana. Esta espécie ocorre em regiões áridas e semi-áridas no oeste Argentino, sendo conhecida devido às suas propriedades antissépticas, e pelo seu uso no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, asma, artrite e reumatismo. O extrato etanólico deste vegetal apresenta alto conteúdo de compostos fenólicos, sendo a 2',4'- dihidroxichalcona, o principal componente químico presente e, provavelmente, o responsável pela atividade antibacteriana apresentada pelo extrato etanólico.

2.6 HIDRAZONAS

2.6.1 Aspectos estruturais e químicos

As hidrazonas são iminas derivadas da hidrazina. Dentre as reações descritas para aldeídos e cetonas, a condensação com derivados hidrazina gera derivados comumente chamados de hidrazonas, sendo esta reação catalisada por ácidos ou bases (Figura 8). A catálise básica ocorre com desidratação do intermediário tetraédrico, desprotonação do nitrogênio e eliminação do íon hidróxido; já na catálise ácida a quebra da carbinolamina intermediária ocorre com a expulsão de uma molécula de água (CAREY & SUNDBERG, 2007).

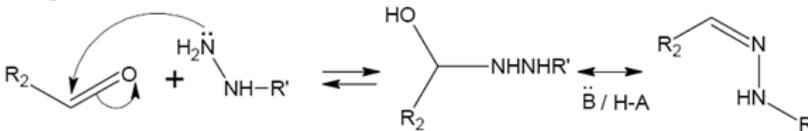


Figura 8: Formação de hidrazonas a partir de cetonas

A condensação das cetonas α , β -insaturadas com hidrato de hidrazina ou fenilhidrazinas substituídas foi relatada por El-Rayes e colaboradores (1984), no entanto, as hidrazonas foram geradas somente como intermediários reacionais de derivados pirazolínicos, provavelmente, devido à instabilidade das iminas formadas (Figura 9).

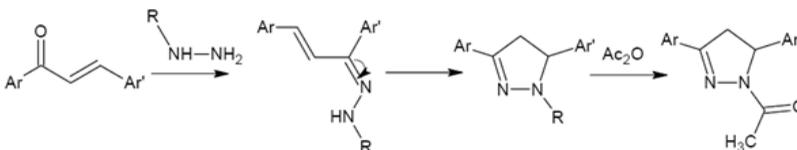


Figura 9: Condensação de cetonas α , β -insaturadas com hidrazinas

2.6.2 Aplicações das hidrazonas

Esses derivados são interessantes por suas diversas aplicações. Em síntese orgânica, são empregados na análise qualitativa de grupamentos carbonila, já na química analítica podem ser usados na elaboração de padrões para espectrofotometria. Na indústria, são empregadas como plastificantes, estabilizadores de polímeros e iniciadores de polimerização (PACANSKY *et al.*, 1990). Também atuam como herbicidas, inseticidas e estimulantes de crescimento de plantas (ROBINSON, 1963).

Diversas substâncias contendo as funções hidrazida e hidrazona são descritas na literatura, apresentando inúmeras e pronunciadas atividades biológicas, entre elas, anticonvulsivantes e antimicrobianas (BARBOSA & LEVI, 2000). Há relatos da atividade antioxidante dos ácidos isonicotínicos-hidrazônicos (HERSHKO *et al.*, 1994; HERMES-LIMA *et al.*, 2000), que também foram avaliados quanto ao potencial de atividade biológica no tratamento da tuberculose (MASSARANI *et al.*, 1971; VIGORITA *et al.*, 1994). As hidrazonas também estão sendo alvo de pesquisas como agentes bactericidas e bacteriostáticos (SAMUS *et al.*, 1994), apresentando atividades antiinflamatória, antitumoral, analgésica, anti-malária e antiplaquetária (ROLLAS & KÜÇÜKGÜZEL, 2007).

2.7 CITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS

Um composto para ser candidato a um novo antimicrobiano não necessita apenas inibir o crescimento microbiano, mas também apresentar toxicidade seletiva, ou seja, interferir no crescimento ou matar a bactéria sem causar danos consideráveis ao hospedeiro.

O termo citotoxicidade refere-se a toxicidade de um composto para células em cultura, o que não prediz nenhum efeito seletivo sobre células tumorais e normais (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991). A toxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que levam a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular resultante depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do composto em penetrar na célula, entre outros (HU & HSIUNG, 1989).

A utilização dos testes de citotoxicidade *in vitro* representa uma ferramenta útil e promissora nas primeiras etapas de seleção de compostos antitumorais (LEÓN *et al.*, 2006), e tais testes são necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de dano das funções celulares básicas (EISENBRAND *et al.*, 2002).

A citotoxicidade é avaliada através das alterações de permeabilidade celular, das funções mitocondriais, da morfologia e da proliferação celulares (EISENBRAND *et al.*, 2002). O ensaio do MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos afetam seletivamente as mitocôndrias, resultando em uma superestimação da toxicidade (SMEE *et al.*, 2002). A habilidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT & LANG, 1986).

2.8 TÉCNICAS MOLECULARES

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método genotípico rápido, sensível e específico utilizado na pesquisa de genes previamente conhecidos, porém é um método pouco utilizado pelos laboratórios clínicos de rotina por apresentar custo elevado e necessitar estrutura laboratorial adequada. A PCR para a detecção do gene *mecA* é considerada o método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes, incluindo aqueles com resistência heterogênea e por isso é utilizada em vários estudos que analisam a sensibilidade e especificidade de diversos métodos fenotípicos (DERESINSKI, 2005).

Do ponto de vista epidemiológico, é de grande importância a determinação da origem dos organismos envolvidos na etiologia das infecções bacterianas. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), propicia um método de detecção e identificação direta de patógenos (MEYER *et al.*, 1991). A técnica de PCR apresenta três etapas: extração do ácido nucléico, sua amplificação e posterior visualização do produto. O desempenho satisfatório do método depende, entre outros, da escolha acertada dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e da técnica

utilizada na extração do ácido nucléico da amostra (COLLINS *et al.*, 1994).

O objetivo dos estudos de genotipagem é fornecer evidências laboratoriais de que agentes etiológicos epidemiologicamente relacionados, ou seja, isolados durante um período determinado de tempo e em uma área geográfica específica, também seriam geneticamente relacionados e, assim, representariam uma mesma cepa que se disseminou (TENOVER *et al.*, 1995). Tais informações podem auxiliar na elaboração de estratégias mais eficientes que visam à redução dos casos de infecção, uma vez que a partir dos perfis moleculares é possível inferir relações genéticas existentes entre os diferentes clones e detectar o fluxo gênico (KAPUR *et al.*, 1995). Segundo Kapur e colaboradores (1995), através da amplificação de determinados genes e subsequente análise genética dos fragmentos, podem ser obtidas informações da filogenia e da sistemática microbiana, de uma maneira rápida e eficiente (Van BELKUM *et al.*, 1998). A análise de RAPD, também conhecido como PCR com iniciador arbitrário (AP-PCR), retira o requerimento de iniciadores escolhidos sem o conhecimento do genoma (WILLIAMS *et al.*, 1990) e a sua utilização tem fornecido alto nível de caracterização (DAMIANI *et al.*, 1996; SAULNIER *et al.*, 1997). A técnica AP-PCR pode ser usada para uma primeira triagem para verificação da proximidade entre linhagens de MRSA (Van BELKUM *et al.*, 1995).

3 JUSTIFICATIVA

Os estudos de novas classes de substâncias vêm sendo impulsionado pela necessidade da disponibilização de novos fármacos para as patologias que ainda não possuem tratamento efetivo e seguro. Outro fator que estimula este tipo de estudo é a prevalência crescente de diversas bactérias multiresistentes aos fármacos disponíveis, constituindo este um problema sério de saúde pública. Com isso, a busca por novos agentes antimicrobianos é uma tarefa importante e desafiadora (ROLLAS & KÜÇÜKGÜZEL, 2007). Extratos obtidos de plantas e suas respectivas substâncias isoladas representam fonte promissora para este fim, bem como as substâncias sintéticas obtidas em laboratório (SUFFREDINI *et al.*, 2006; CYRUS *et al.*, 2008). Sendo assim, todas as propriedades biológicas associadas às chalconas e hidrazonas instigaram este estudo, o qual foi associado à busca de novas substâncias ativas contra cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina.

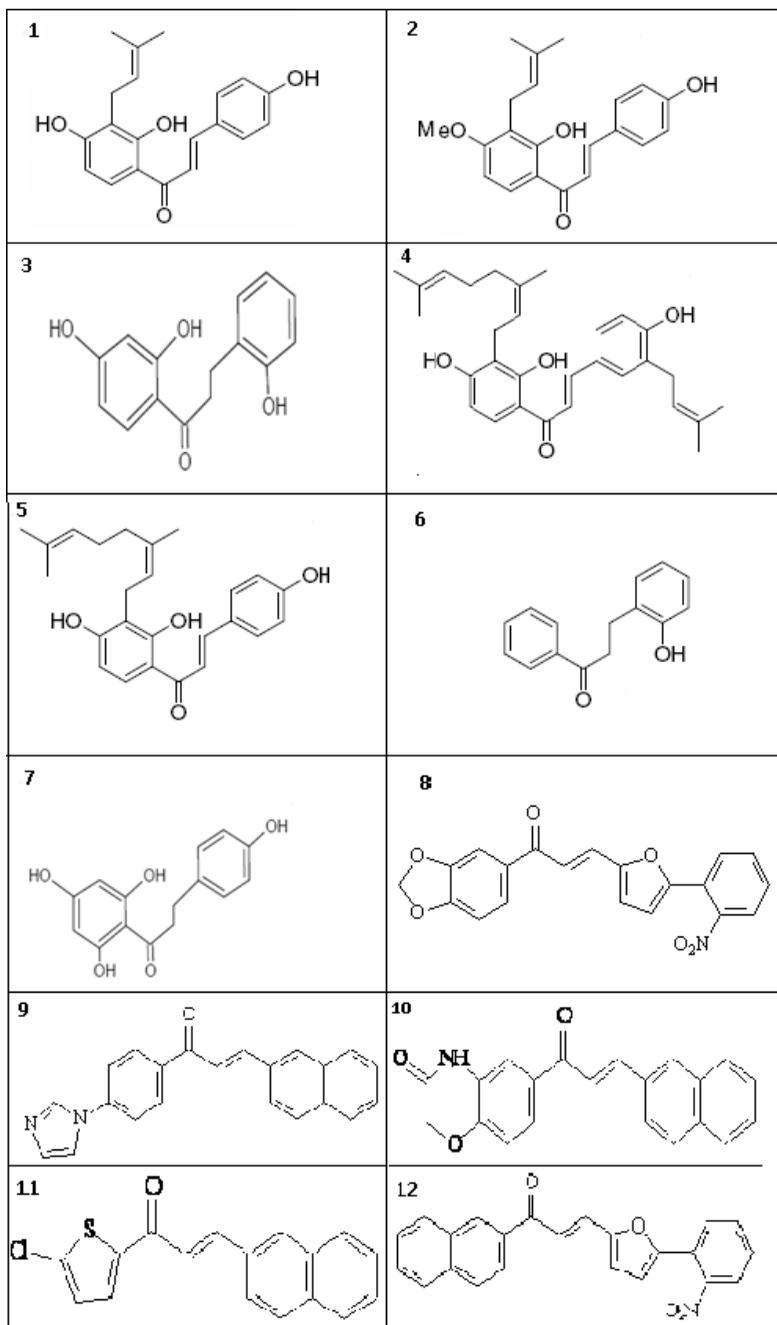
4 MATERIAIS E MÉTODOS

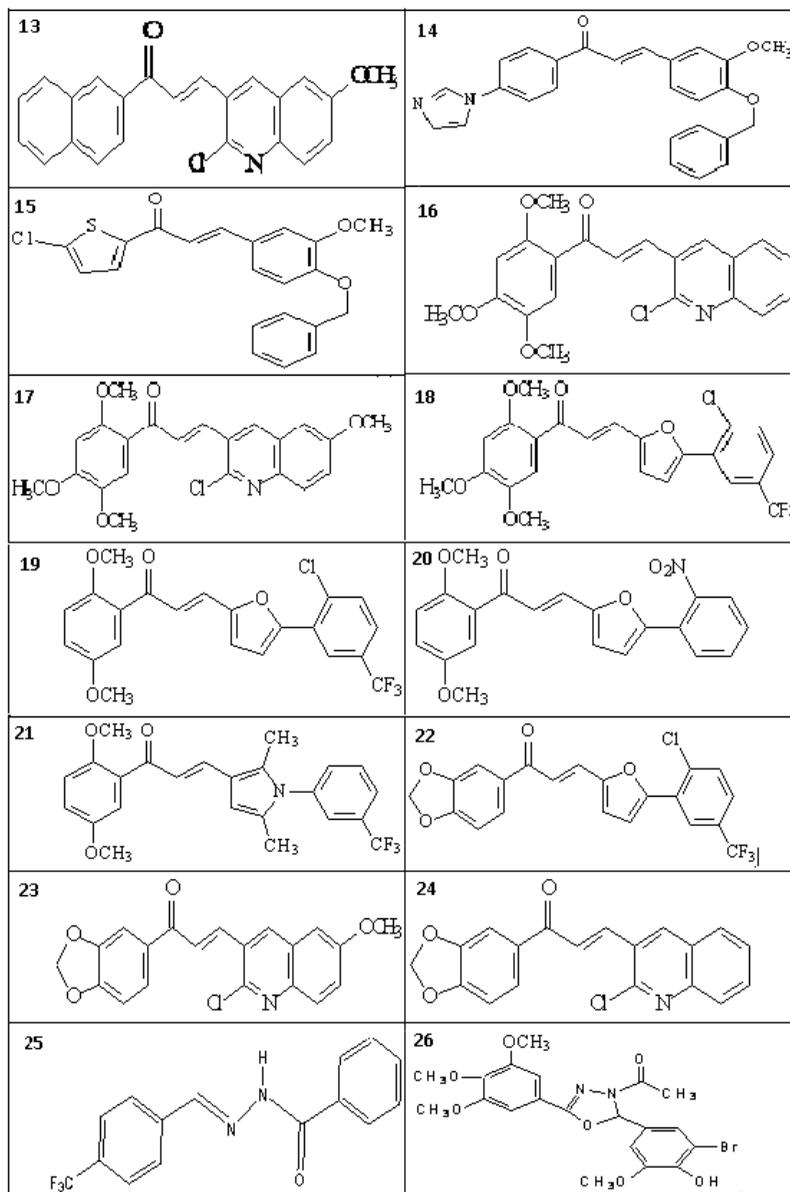
4.1 CHALCONAS E HIDRAZONAS

Foram utilizadas 34 chalconas e 10 hidrazonas. A atividade antiestafilocócica das 7 primeiras chalconas listadas abaixo foi previamente descrita por Ávila *et al.* (2008), investigadas frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923. As sete primeiras chalconas abaixo foram fornecidas pelo Professor Franco Delle Monache, do Instituto di Chimica da Università Cattolica Del Sacro Cuore (Roma – Itália), enquanto que as demais foram fornecidas pelo Professor Ricardo José Nunes, do Laboratório de Estrutura e Atividade, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Essas substâncias foram sintetizadas pela doutoranda Alessandra Mascarello. A nomenclatura das chalconas estudadas são citadas a seguir e as suas estruturas estão apresentadas na Figura 10.

1. 4-hidroxi-isocordoina
2. 4-hidroxi-derricina
3. 2, 2', 4'-trihidroxi chalcona
4. 2',4,4'-trihidroxi-3-prenil-3-geranil chalcona
5. 2',4,4'-trihidroxi-3'-geranil chalcona
6. 2-hidroxidihidro-chalcona
7. 2',4,4',6'-tetrahidroxi-dihidro chalcona
8. (2*E*)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-2-propen-1-ona
9. (2*E*)-1-[4'-(1*H*-imidazol-1-il)fenil]-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona
10. (2*E*)-6-(3-(2-naftil)acrilol)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona
11. (2*E*)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona
12. (2*E*)-1-(2-naftil)-3-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-2-propen-1-ona
13. (2*E*)-1-(2-naftil)-3-(2-cloro-6-metoxi-quinolin-3-il)-2-propen-1-ona
14. (2*E*)-1-[4'-(1*H*-imidazol-1-il)fenil]-3-(3-metoxi-4-benziloxi-fenil)-2-propen-1-ona
15. (2*E*)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(3-metoxi-4-benziloxi-fenil)-2-propen-1-ona
16. (2*E*)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-3-(2-cloro-quinolin-3-il)-2-propen-1-ona
17. (2*E*)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-3-(2-cloro-6-metoxi-quinolin-3-il)-2-propen-1-ona
18. (2*E*)-1-(2',4',5'-trimetoxifenil)-3-[5-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-2-propen-1-ona

19. (2*E*)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-[5-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-2-propen-1-ona
20. (2*E*)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-[2,5-dimetil-1-(3-trifluorometil-fenil)-1*H*-pirrol-3-il]-2-propen-1-ona
21. (2*E*)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-[5-(2-cloro-5-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-2-propen-1-ona
22. (2*E*)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(2-cloro-6-metoksi-quinolin-3-il)-2-propen-1-ona
23. (2*E*)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(2-cloro-quinolin-3-il)-2-propen-1-ona
24. (2*E*)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-2-propen-1-ona
25. (*E*)-1-(4-bromofenil)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one
26. 1-(2-(3-bromo-4-hidroxy-5-metoksi-fenil)-5-(3,4,5-trimetoksi-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
27. 1-(2-(naphthalen-1-yl)-5-(3,4,5-trimetoksi-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
28. 1-(2-(2,4-diklorofenil)-5-(3,4,5-trimetoksi-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
29. 1-(2-(3,5-diklorofenil)-5-(3,4,5-trimetoksi-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
30. 1-(2-(2-kloro-quinolin-3-yl)-5-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
31. 1-(2-(4-hidroxi-3-nitro-fenil)-5-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
32. 1-(2,5-difenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
33. 1-(2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-5-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone
34. 1-(2-(2-nitro-fenil)-5-fenil)-1,3,4-oksadiazol-3(2*H*)-il)etanone





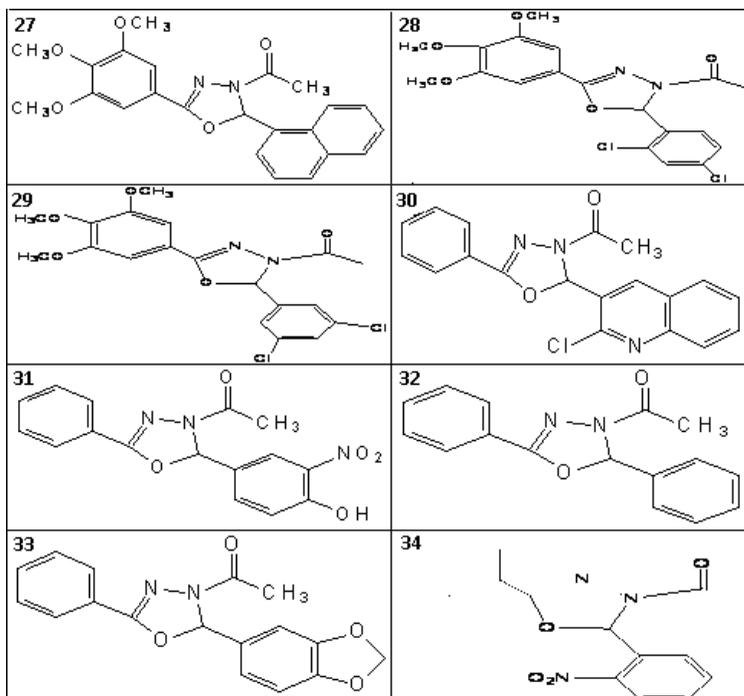


Figura 10: Estrutura das chalconas pesquisadas

As 10 hidrazonas também foram fornecidas pelo Prof. Nunes e sintetizadas no Laboratório de Estrutura e Atividade, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A nomenclatura das mesmas está descrita a seguir e as suas estruturas estão apresentadas na Figura 11.

1. (*E*)-*N'*-2-[(5-nitrofuran-2-il)metileno]-benzohidrazida
2. (*E*)-3,4,5-trimetoxi-*N'*-[(5-nitrotiofen-2-il)metileno]-benzohidrazida
3. (*E*)-*N'*-((5-(2-nitrophenyl)furan-2-yl)methylene)benzohidrazida
4. (*E*)-*N'*-((2,5-dimethyl-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrrol-3-yl)methylene)benzohidrazida
5. (*E*)-*N'*-((2-chloro-6-methoxyquinolin-3-yl)methylene)benzohidrazida
6. (*E*)-*N'*-(pyridin-3-ylmethylene)benzohidrazida
7. (*E*)-*N'*-(pyridin-4-ylmethylene)benzohidrazida
8. (*E*)-*N'*-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)benzohidrazida
9. (*E*)-*N'*-(4-(trifluoromethyl)benzylidene)benzohidrazida
10. (*E*)-*N'*-((3-chloroisoquinolin-4-yl)methylene) benzohidrazida

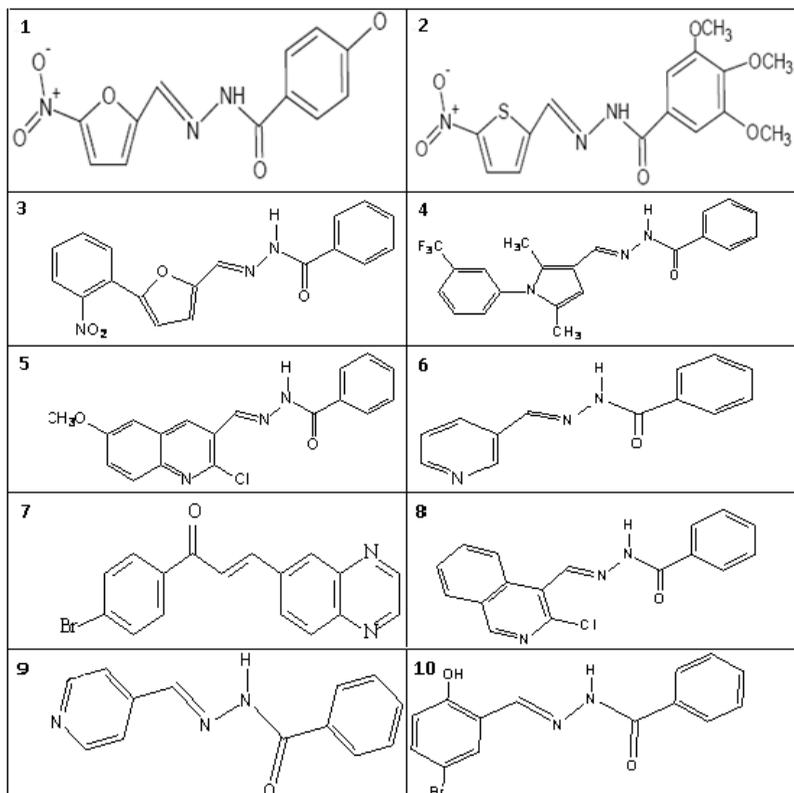


Figura 11: Estrutura das hidrazonas estudadas

4.2 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Solventes utilizados na solubilização e diluição dos compostos

As chalconas e as hidrazonas foram dissolvidas em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10% e diluídas no meio de cultura utilizado para os testes de atividade antimicrobiana. A diluição foi realizada utilizando 2 mg da amostra para 200 μ L de DMSO 10%. A partir desta solução, foram preparadas diluições seriadas, cuja concentração variou de 1000 a 1,96 μ g/mL, para uso nos testes de atividade antimicrobiana.

4.2.2 Meios de culturas

Para o crescimento das bactérias foi utilizado o caldo de infusão de cérebro e coração (“*Brain Heart Infusion*”, BHI). O teste de pureza das culturas foi realizado no meio de ágar sangue (“*Blood Agar Base*” adicionado de 5 % de hemácias de sangue de carneiro) e, para os testes de atividade antimicrobiana, bem como o preparo do inóculo bacteriano, o caldo e ágar de Müeller-Hinton. Todos os meios de cultura citados acima foram obtidos dos Laboratórios Difco. Para o cultivo das células VERO (linhagem celular de rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) foi usado o meio essencial mínimo em sais Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina B (0,025 µg/mL).

4.2.3 Reagente para a revelação dos testes

O crescimento bacteriano foi observado através da densidade óptica (DO) com uso de leitora de microplacas do tipo ELISA (modelo CLX800-BioTek Instrumentos, Inc). Nos casos em que a turvação ou coloração do produto natural interferiu na leitura da DO, o crescimento bacteriano foi detectado através do sal de tetrazólio (solução a 0.2 mg/mL de sal de *p-iodonitrotetrazolium violete* (INT) em etanol a 70%). A mudança de cor de amarelo claro para a cor púrpura acusa a presença de bactérias viáveis, as quais transformam o INT na respectiva formazana.

Para avaliar o potencial citotóxico das chalconas e hidrazonas foi utilizado o sal de tetrazolium MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*], que é um composto hidrossolúvel. Este sal quando em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em formazana de coloração azul-escuro, não solúvel em água e que fica armazenado no citoplasma celular. A quantidade de formazana, formada foi avaliada com auxílio de espectrofotometria.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.3.1 Microrganismos teste

As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina foram fornecidas por dois laboratórios de Florianópolis: Laboratório Médico Santa Luzia e Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Como controle foi utilizado a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*American Type Culture Collection*). As bactérias foram mantidas em caldo BHI com 15% de glicerina a -20°C no Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.3.2 Ativação e teste de pureza das bactérias

As culturas bacterianas congeladas a -20°C em caldo BHI glicerinado foram ativadas a partir da transferência de 300 μL de cada cultura estoque para 3 mL de caldo BHI. Estas culturas foram mantidas por 24 horas a 36°C , sendo que após as primeiras seis horas de incubação, foi realizado o teste de pureza das mesmas, através da semeadura por esgotamento em ágar sangue. A cultura em placa foi incubada durante a noite a 36°C e, posteriormente, foi verificado se as colônias crescidas em placa estavam puras.

4.3.3 Preparo do inóculo bacteriano

As culturas incubadas por 24 horas foram diluídas seriadamente em solução fisiológica estéril (0,9% de cloreto de sódio em água destilada), com base na DO observada em leitora de microplacas, a fim de ajustar as turvações de modo a conter aproximadamente 10^8 UFC/mL e 10^7 UFC/mL, para uso nos testes de difusão e microdiluição.

4.3.4 Teste de disco difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi usado para confirmar a resistência dos isolados de *S. aureus* à meticilina. O teste e a interpretação dos resultados seguiram as normas da CLSI (CLSI, 2010). O meio de cultura utilizado foi o ágar Müeller-Hinton, adicionado de 4% de cloreto de sódio, na quantidade de 18 mL por placa de 10 cm de diâmetro, para a obtenção de uma espessura de meio uniforme nas placas, de aproximadamente, 5 mm (MIMICA & MENDES, 2007). Com o auxílio

de um *swab*, foi espalhado uniformemente o inóculo bacteriano na superfície do ágar (HIRAMATSU *et al.*, 1997), já previamente ajustada em salina para a turvação equivalente a 10^8 UFC/mL. Posteriormente, foram colocados os discos impregnados com antimicrobiano, com o auxílio de uma pinça esterilizada. Foram aplicados discos com oxacilina (6µg), cefoxitina (30µg) e vancomicina (30µg). As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas e os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos (em milímetros) e comparados aos descritos na tabela do documento M100-S20 do CLSI, 2010 (tabela 1).

Tabela 1 - Padrões interpretativos de diâmetros do halo de inibição para *S. aureus*

Zona de inibição em mm				
Antibacteriano	Símbolo	Concentração	Resistente	Sensível
Cefoxitina	CT	30 mcg	21 ou menos	22 ou mais
Oxacilina	OX	6 mcg	19 ou menos	23 ou mais

FONTE: CLSI, 2010.

4.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os compostos foram dissolvidos em DMSO 10%, previamente esterilizado em autoclave. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas em concentrações variando entre 1000 µg/mL e 1,96 µg/mL, que foram distribuídas em volumes de 100 µL em placa de microdiluição de 96 poços. Como controle positivo (viabilidade do microrganismo) foi utilizada apenas a mistura de caldo de cultura e inóculo bacteriano, e como controle negativo (esterilidade dos compostos), foi utilizada a mistura de caldo de cultura e composto dissolvido. Em cada orifício (teste e controle positivo) foram adicionados 5 µL de inóculo bacteriano. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas durante 24

horas a 36°C. A leitura dos experimentos foi realizada através da DO com uso de leitora de microplacas tipo ELISA. Nos casos em que a turvação e/ou a coloração do composto interferiu na leitura da DO, foi utilizado 20 µL do revelador de crescimento bacteriano o INT (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltrazolio-cloro). Após a adição do INT, a cor amarela indicou ausência de crescimento microbiano, enquanto que a cor púrpura indicou crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. O resultado foi expresso em µg/mL (VALGAS *et al.*, 2007).

4.3.6 Determinação da concentração bactericida mínima

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), uma alíquota de 10 µL, dos materiais de todos os poços da placa em que não houve crescimento bacteriano aparente, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de ágar sangue, através da técnica de semeadura por esgotamento. A CBM foi considerada a menor concentração da substância em que ocorreu redução total dos organismos vivos, verificados após 24 horas de incubação a 36°C (ÁVILA, 2008).

4.4 TESTES MOLECULARES

4.4.1 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a detecção de cepas de *S. aureus* resistentes à metilicina, conforme a metodologia utilizada por Oberdorfer e colaboradores (2006). A mesma foi desenvolvida a partir de 30 nanogramas de DNA de cada cepa bacteriana estudada, extraído com o uso de fenol clorofórmio. Para a amplificação foram usados 10 pmol de cada iniciador, os quais foram adicionados a 10 % da solução de tampão para PCR, 3,5 mM de MgCl₂, 10 mM dNTPs, 0,02 U de Taq polimerase e quantidade suficiente para 20 µl de água ultra pura. Para a detecção do gene *mecA* foram utilizados os iniciadores *mecA1*, 5'-GTTGTAGTTGTCGGGTTTGG-3' e *mecA2*, 5'-CGGACGTTTCAGTCATTTCTAC-3', o que propiciou a amplificação de um fragmento de 161pb do gene *mecA*. Para detecção do gene *nuc* foram utilizados os iniciadores 5'-AATCTTTGTTCTACACGATATTC-3' para Sa442-1 e 5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA-3' para Sa442-2. As

reações foram colocadas em termociclador Techne (Flexigene[®]) sob as seguintes condições: desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red (BioAmérica[®]), corrido a 70 V e visualizados sob luz UV.

4.4.2 Amplificação randômica do DNA de *S. aureus* resistentes à meticilina

O RAPD foi realizado conforme o protocolo utilizado por Leeuwen e colaboradores (1996). Foram utilizadas 10 ng do DNA bacteriano. Na amplificação foram utilizadas 10 pmol de cada iniciador, os quais foram adicionados a 10 % da solução tampão para PCR, 3,5 mM de MgCl₂, 10 mM dNTPs, 0,02 U de Taq polimerase e quantidade suficiente para 20 µl de água ultra pura. Os códigos e sequências dos iniciadores foram os seguintes: ERIC-1R, 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'; ERIC-2, 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'; AP-1, 5'-GGT TGG GTG AGA ATT GCA CG-3'; AP-7, 5'-GTG GAT GCG A-3'; e AP-1026, 5'-TAC ATT CGA GGA CCC CTA AGT G-3'.

As reações foram desenvolvidas em termociclador Techne (Flexigene[®]) sob as seguintes condições: desnaturação por 4 minutos a 94°C, seguido por 2 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 25°C e 2 minutos a 74°C, e mais 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 40°C e 2 minutos a 74°C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado com Gel Red (BioAmérica[®]), corrido a 80 V e visualizados sob luz UV.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT).

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pela exposição das células VERO aos mesmos, através do ensaio colorimétrico descrito por Mosman (1983) e com algumas modificações sugeridas por Andrighetti-Fröhner e colaboradores (2003).

A linhagem celular VERO é uma cultura contínua de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Essas células foram cultivadas em meio MEM distribuído em placas de 96 poços (2,5 x 10⁵ células/mL). A incubação foi mantida em estufa a 37°C

com 5% de CO₂, por 24 horas, período necessário para que as mesmas atingissem a confluência. Após, o meio de cultura foi retirado por aspiração e foram adicionados em substituição outros 200 µL dos compostos-testes previamente diluídos seriadamente (495 µL MEM adicionados de 5 µL dos compostos diluídos em DMSO, na razão 1:2) em cada poço. Os controles celulares continham 200 µL do meio MEM e o branco continha 200 µL de DMSO a 1%. Em seguida, as placas foram incubadas por 72 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Depois deste período, o meio de cultura de cada poço foi substituído por 50 µL de uma solução de MTT a 1 mg/mL, diluído em meio MEM, e as placas foram incubadas por mais 4 horas, nas condições já descritas. Logo após, foi retirado o meio de cultura e o MTT de cada orifício da placa e foi adicionado 100 µL de DMSO puro para solubilizar a formazana. As placas foram agitadas levemente, a temperatura ambiente, por 10 min, para que toda a formazana fosse solubilizada. As absorbâncias foram medidas em leitora de microplacas a 550 nm e os valores foram transformados em porcentagem, em relação aos controles celulares (100% de viabilidade). Estes percentuais comparados com as concentrações dos compostos foram analisados através da elaboração de um gráfico e pela análise de regressão foram calculados os valores de CC₅₀, que é definido como a concentração que reduz a viabilidade das células em 50%, quando comparada com os controles celulares.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana das 10 hidrazonas (Tabela 2) e 34 chalconas (Tabela 3) foi inicialmente avaliada pelo método de microdiluição em meio líquido contra as cepas referências de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (S.A) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) (E.C). Dos 44 compostos testados, 2 hidrazonas e 7 chalconas apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) inferior a 1000 µg/mL e foram selecionadas para os testes com 14 cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). A inclusão de uma cepa Gram-negativa (*E. coli*) nos testes preliminares, justifica-se pelo fato do trabalho estar sendo desenvolvido no Laboratório de Antibióticos da UFSC, onde são desenvolvidos projetos visando a seleção de novos antimicrobianos ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima de 10 hidrazonas

	Compostos	S.A ^a	E.C ^b
1	G6	62,5	≥1000
2	F29	15,62	≥1000
3	G4	≥1000	≥1000
4	G5	≥1000	≥1000
5	G8	≥1000	≥1000
6	G10	≥1000	≥1000
7	G3	≥1000	500
8	G1	≥1000	≥1000
9	G23	≥1000	≥1000
10	G24	≥1000	≥1000

*Valores expressos em µg/mL.

^a *Staphylococcus aureus*.

^b *Escherichia coli*.

Tabela 3- Concentração Inibitória Mínima de 34 chalconas

	Compostos	S.A	E.C
1	Ch14	31,25	≥1000
2	Ch18	7,8	≥1000
3	Ch32	31,25	≥1000
4	Ch21	31,2	≥1000
5	Ch22	31,2	≥1000
6	Ch28	500	≥1000

7	Ch31	250	250
8	L50	≥1000	250
9	C7	≥1000	≥1000
10	C9	≥1000	≥1000
11	C12	≥1000	≥1000
12	R56	≥1000	≥1000
13	R57	≥1000	≥1000
14	R58	≥1000	≥1000
15	R61	≥1000	≥1000
16	J61	≥1000	≥1000
17	J62	≥1000	≥1000
18	J68	≥1000	≥1000
19	Lou3	≥1000	≥1000
20	Lou4	≥1000	≥1000
21	Lou5	≥1000	≥1000
22	L46	≥1000	≥1000
23	L47	≥1000	≥1000
24	L48	≥1000	≥1000
25	N4	≥1000	≥1000
26	Z5	≥1000	≥1000
27	Z8	≥1000	≥1000
28	Z43	≥1000	≥1000
29	Z47	≥1000	≥1000
30	Y1	≥1000	≥1000
31	Y7	≥1000	≥1000
32	Y13	≥1000	≥1000
33	Y17	≥1000	≥1000
34	Y18	≥1000	≥1000

*Valores expressos em µg/mL.

^a *Staphylococcus aureus*.

^b *Escherichia coli*.

Os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3 mostram poucos compostos ativos contra a cepa Gram-negativa *E. coli*, sendo que a

maioria apresentou concentração superior ou igual a 1000 µg/mL. A inexistência ou baixa atividade dos compostos testados contra *E. coli* está relacionada, entre outros fatores, à composição da parede celular das bactérias Gram-negativas, que é mais complexa que a parede celular das bactérias Gram-positivas, embora estas últimas apresentem uma camada mais espessa de peptidoglicano. A parede celular das bactérias Gram-negativas apresenta uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos e fosfolipídios, adquirindo assim, maior resistência à penetração de substâncias tanto hidrofílicas, quanto hidrofóbicas. Apenas a passagem de moléculas pequenas é facilitada, pois estas conseguem permear através das proteínas seletivas localizadas na membrana externa, denominadas porinas (TAVARES, 2009).

Com base nos resultados descritos acima, 9 compostos (7 chalconas e 2 hidrazonas) foram selecionados para os testes com as cepas de MRSA. Para isso, primeiramente os isolados de MRSA investigadas, tiveram a sua resistência à metilicina confirmada pelo ensaio de difusão radial em ágar (CLSI, 2010). Todas as cepas foram testadas frente aos discos dos antimicrobianos oxacilina (6µg), cefoxitina (30µg) e vancomicina (30µg). Segundo Mimica e Mendes (2007), a oxacilina é a mais adequada para testes *in vitro* utilizando disco-difusão, como teste-padrão para confirmação de resistência de *S. aureus* à metilicina. Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos no experimento de disco-difusão das cepas de MRSA frente aos antimicrobianos cefoxitina, oxacilina e vancomicina, sendo que os dois primeiros antimicrobianos são usados como critério para distinguir as cepas MRSA das demais. Os resultados referentes à oxacilina enquadraram todas as cepas como MRSA, segundo os valores descritos no documento M100-S20 do CLSI (2010) (tabela 1). A cepa controle utilizada no teste de disco difusão foi a *S. aureus* ATCC 25.923, a qual apresentou inibição de crescimento dentro do limite esperado padronizado pelo mesmo comitê, para cepas resistentes à metilicina.

Tabela 4 – Teste de Disco Difusão para a confirmação de cepas
MRSA

Antibióticos	Cefoxitina	Inter.	Oxacilina	Inter.	Vancomicina	Inter.
Bactérias						
1	14	R	0	R	10	S
2	12	R	0	R	9	S
3	12	R	0	R	10	S
4	22	S	0	S	10	S
5	33	S	0	S	11	S
6	12	R	6	R	12	S
7	14	R	0	R	10	S
8	4	R	0	R	14	S
9	6	R	0	R	10	S
10	16	R	0	R	10	S
11	0	R	0	R	10	S
12	2	R	0	R	19	S
13	15	R	0	R	10	S
14	14	R	0	R	10	S

*Valores expressos em mm.

A figura 12 é uma ilustração do teste de disco difusão, na qual é possível observar a resistência de *S. aureus* ao antibiótico oxacilina, onde não se observa a formação de halo de inibição do crescimento.



Figura 12: Teste de Disco Difusão

A cefoxitina foi incluída nesta triagem, porque estudos mais recentes demonstraram que este antimicrobiano é um importante marcador substituto na detecção da resistência à meticilina pelo gene *mecA* (SWENSON *et al.*, 2007; ANAND *et al.*, 2009). Como pode ser observado na Tabela 4, a maioria dos diâmetros das zonas de inibição

foi ≤ 21 mm, e nesses casos, as cepas foram consideradas resistentes. As cepas 4 e 5 apresentaram halos de inibição de 22 e 33 mm, respectivamente, e as mesmas foram consideradas sensíveis. Os resultados do teste de difusão para a cefoxitina estão em consonância com o teste de PCR para a discriminação do MRSA, cuja resistência é causada pelo gene *mecA* (ou PBP2a-positivos). Para a maioria das cepas foi detectado o gene *mecA*, entretanto, para as cepas 4 e 5, o referido gene não foi visualizado no gel (Apêndice 1). Consequentemente, se pode concluir que a cefoxitina é um marcador mais discriminatório que a oxacilina, no que se refere a presença do gene *mecA*, e que deveria ser sempre adotado nos estudos epidemiológicos. Entretanto, embora seja raro a resistência de MRSA não ser causada pelo gene *mecA*, esta resistência pode estar associada a PBPs modificadas, ou ainda, a uma super-produção de β -lactamases (OBERDORFER *et al.*, 2006).

Em adição ao uso da oxacilina e cefoxitina, os isolados de MRSA foram ainda testados contra o antibiótico vancomicina, uma vez que este fármaco é considerado tratamento ótimo para infecções causadas por este grupo de organismos (BERTOLUCI, 2007). Pelo teste de difusão, todas as estirpes de MRSA foram consideradas sensíveis a vancomicina. Além disso, para atender às orientações contidas no documento da CLSI (2010), o diagnóstico da sensibilidade das cepas de MRSA à vancomicina foi determinado, também, através do método de diluição. Neste caso, os valores da CIM inferiores a 2 $\mu\text{g/mL}$ significam que as cepas são sensíveis, valores variando de 4 a 6 $\mu\text{g/mL}$ representam sensibilidade intermediária (VISA) e para valores maiores que 16 $\mu\text{g/mL}$, as cepas são consideradas resistentes à vancomicina (VRSA). As cepas em estudo não foram resistentes a este antibiótico, sendo inibidas em concentrações que variaram de 0,4 a 0,8 $\mu\text{g/mL}$.

Com os resultados mostrados na tabela 4 e na PCR (Anexo 1), foi possível chegar as seguintes conclusões: a resistência a oxacilina classificou as cepas estudadas no grupo das resistentes à meticilina, e os resultados do teste com a cefoxitina e PCR confirmaram que dos 14 isolados, 12 apresentam o gene *mecA*.

Na sequência foi realizada a amplificação randômica do DNA dessas mesmas cepas em questão (Apêndices 2 e 3). A partir dos resultados obtidos nesta investigação, se verificou que diferentes padrões de bandas dos produtos de amplificação foram gerados pelos diferentes iniciadores, permitindo a genotipagem dos isolados de *S. aureus*. Pode-se observar que alguns iniciadores (AP-1, AP-1026 e Eric 1) foram pouco eficazes na distinção das cepas. Por isso, foi elaborado apenas os dendogramas dos iniciadores AP-7 e Eric 2 (Apêndices 4 e 5).

Tabela 7 – Concentração Inibitória Mínima das chalconas contra 7 cepas MRSA

	MRSA	1	2	3	4	5	6	7
1	14	62,5	62,5	62,5	15,62	62,5	62,5	125
2	18	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
3	32	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
4	21	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
5	22	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
6	28	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
7	31	250	250	250	250	500	250	500

*Valores expressos em µg/mL.

Tabela 8 – Concentração Inibitória Mínima das chalconas contra 7 cepas MRSA

	MRSA	8	9	10	11	12	13	14
1	14	125	62,5	125	62,5	62,5	125	62,5
2	18	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
3	32	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
4	21	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
5	22	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
6	28	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
7	31	250	250	250	250	250	250	250

*Valores expressos em µg/mL.

Os resultados das CIMs das hidrazonas 1 e 2 (compostos G6 e F29, respectivamente) contra as cepas de MRSA estão mostrados na Tabela 6 e foram equivalentes aqueles obtidos anteriormente com a cepa sensível ATCC 25923 (Tabela 2). Rollas & Küçükgül (2007) também relataram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25.923 ao testarem as hidrazonas *4-hydroxybenzoic acid*[(5-nitro-2-furyl)methylene]-hidrazide (Nifuroxazide) e *4-fluorobenzoic acid*[(5-nitro-2-furyl)methylene] hidrazide, sendo que essas e as hidrazonas do presente estudo diferem entre si, apenas, pela variação do substituinte na posição para do anel benzênico e do heteroátomo do anel heterocíclico. A figura 13 é uma foto ilustrativa do teste de concentração inibitória mínima do composto (*E*)-*N'*-2-[(5-nitrofurano-2-il)metileno]-benzohidrazide (hidrazona 1) frente à cepa sensível de *S. aureus* ATCC 25923 e duas cepas MRSA. As linhas 3 e 4 referem-se a CIM para a cepa sensível (7,8 µg/mL) e as linhas de 5 a 8 a CIM para as duas cepas MRSA, sendo que ambas foram inibidas na concentração de 15,62 µg/mL. A 1ª linha correspondeu ao branco, a 2ª a diluição do composto

e as duas últimas colunas são referentes ao controle de esterilidade do composto e de crescimento da bactéria, respectivamente.

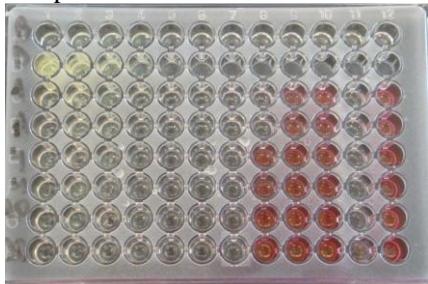


Figura 13: Placa experimental da concentração inibitória mínima da hidrazona 1 (G6).

Diferentemente dos dados apresentados acima para as hidrazonas, os resultados encontrados para as chalconas foram surpreendentes, já que apenas 3 das 7 chalconas ativas contra a cepa ATCC, inibiram o crescimento das cepas MRSA, sendo essas as chalconas 1 (Ch 14: 4-hidroxi-isocordoína), 3 (Ch 32: 2,2',4'-trihidroxi chalcona) e 7 (Ch 31: 2',4,4',6'-tetrahidroxi-dihidro chalcona). Estas três chalconas bioativas (14, 31 e 32), apresentam em comum hidroxilas nas posições C-2' e C-4', sendo que atividades antimicrobianas de chalconas com estruturas químicas semelhantes aquelas descritas acima foram previamente descritas por Sato e colaboradores (2003). Os autores encontraram valores de CIM para eripostirene de 50 µg/mL frente à *C. albicans* e 6,25 µg/mL para *S. aureus*, e CIM para angolensina, de 50 µg/mL frente à *S. aureus*. A chalcona bioativa 1 também apresenta em sua estrutura, além das hidroxilas e substituintes nas posições indicadas acima, um substituinte prenil na posição C-3'. De acordo com Rao e Tzeng (2004), é importante a presença da hidroxila na posição C-2', para que haja a interação com a carbonila. Nas chalconas em que há uma interação intramolecular entre a hidroxila na posição C-2' e o oxigênio da carbonila, há efeitos em várias propriedades físico-químicas das mesmas, tais como absorvidade, formação de quelantes metálicos, propriedades espectroscópicas, comportamento ácido-base de Lewis, entres outras. Também, de acordo com Alvarez e colaboradores (2004), as hidroxilas na posição C-4' ativam a região que inclui o grupo hidroxila vizinho em C-2' e o grupo carbonila α,β insaturados. Talvez por isso, a chalcona 6 tenha apresentado baixa atividade contra a cepa ATCC e nenhuma contra as cepas MRSA, já que não possui as hidroxilas em tais posições. Das 3 chalconas ativas contra as cepas

MRSA, a de número 7 (denominada Ch 31) foi a que inibiu o crescimento bacteriano na maior concentração. Possivelmente, esta diminuição da atividade esteja relacionada à perda da rigidez da molécula, com conseqüente maior requisito de energia para manter a conformação adequada para as interações do grupo farmacofórico com o alvo biológico. A chalcona 2 (denominada Ch 18) frente às cepas sensíveis apresentou ótima atividade antimicrobiana, porém contra as cepas MRSA foi inativa, provavelmente, devido à presença do grupo metila ao invés da hidroxila na posição C-2'. Já as chalconas 4 (Ch 21) e 5 (Ch 22) possuem juntamente ao substituinte prenil, um substituinte geranyl na posição C-3', que deve ter interferido na ação das mesma sob as cepas MRSA. Todos os compostos com atividade antibacteriana sob as cepas MRSA foram avaliados quanto à concentração bactericida mínima (CBM), sendo que todos os que se apresentaram bioativos, tanto hidrazonas quanto chalconas, foram bactericidas nas mesmas concentrações apresentadas nos testes da CIM. Os 5 compostos que inibiram o crescimento bacteriano em concentração igual ou inferior 250 µg/mL foram avaliados quanto a citotoxicidade, já que estes possuem potencial promissor como futuros protótipos de antimicrobianos ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os testes de citotoxicidade foram realizados com células em crescimento e não em monocamadas com células em fase estacionária, devido a três razões: os efeitos tóxicos no ciclo celular podem desaparecer; o metabolismo de células estacionárias é geralmente menor; e a alta densidade celular da monocamada pode influenciar a disponibilidade dos alvos (COS *et al.*, 2001).

A avaliação da citotoxicidade das hidrazonas e chalconas, frente às linhagens celulares VERO, foi realizada através da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados obtidos neste teste estão reunidos na Tabela 8. Os compostos foram testados a partir da concentração de 1.000 µg/mL até a concentração de 0,97 µg/mL.

Tabela 9 - Citotoxicidade de hidrazonas e chalconas em células VERO

Compostos	CC ₅₀ µg/mL (média ± DP) ^a	IC ₅₀ µg/mL	IS ^b
Chalcona 7 (Ch31)	735,47 ± 68,83*	125	5,9
Chalcona 3 (Ch32)	463,65 ± 53*	31,25	14,8
Chalcona 1 (Ch 14)	726,82 ± 14,63*	31,25	23,25
Hidrazona 1 (G6)	488,71 ± 67,13*	7,81	62,6
Hidrazona 2 (F29)	856,71 ± 15,13*	7,81	109,7

^a Média ± DP= Média de três experimentos independentes ± desvio padrão

^b IS é a razão entre CC50 e IC50.

* Foi realizado teste estatístico para verificar a significância dos resultados, em que p = 0,05, todos os resultados apresentaram-se significativos.

Para calcular os valores de CC₅₀ (concentração que causa citotoxicidade a 50 % das células de uma cavidade) foi realizada uma análise de regressão linear. O tratamento estatístico consistiu no cálculo do desvio padrão, já que este fornece a variação obtida em relação à média das três repetições (SOKAL & ROHLF, 1995). Foram realizados três experimentos independentes, em dias subseqüentes, ou seja, em triplicata.

Também foi calculado o índice de seletividade (IS), para que pudesse ser inferido se os compostos eram tóxicos nas concentrações mínimas de inibição. Quanto maior o valor numérico do I.S., mais seletivo é o composto em estudo, ou seja, pouco tóxico para a célula e ativo contra o microrganismo (REIMÃO, 2009).

De forma crescente, têm se acumulado evidências de que as intervenções humanas, com sua capacidade de gerar modificações complexas no ambiente circundante, associadas ao potencial de mudanças na estrutura genética, têm atuado de forma sinérgica no sentido de gerar variantes bacterianas de maior patogenicidade ou dotadas de resistência aos recursos tecnológicos disponíveis para combatê-las (TRABULSI *et al.*, 2005).

6 CONCLUSÕES

Com isso, podemos fazer as seguintes afirmações:

- Os compostos testados podem ser classificados em três categorias referentes ao espectro de atividade: compostos inativos contra *S. aureus*, compostos ativos contra *S. aureus* sensíveis à meticilina e compostos ativos contra cepas resistentes à meticilina;

- As chalconas 1, 3 e 7 (Ch14, Ch31 e Ch32, respectivamente) e as hidrazonas 1 e 2 (G6 e F29, respectivamente) apresentaram melhor atividade antibacteriana frente às cepas MRSA;

- As hidrazonas 1 e 2 apresentaram os menores valores referentes à CIM e foram, dentre os compostos testados, os que apresentaram os melhores índices de seletividade;

- As hidrazonas apresentaram melhor IS do que as chalconas, o que indica que são compostos com maior perspectiva de virem a se tornar futuros fármacos antimicrobianos. O resultado obtido para as chalconas está de acordo com os resultados descritos por Dimmock *et al.* (1998), em que a presença de grupos hidroxila na estrutura das chalconas aumenta o seu efeito citotóxico. A chalcona 7 (Ch 31) contém uma hidroxila a mais do que as chalconas 1 (Ch 14) e 3 (Ch 32), e foi também a mais tóxica dentre as testadas.

- A caracterização genotípica das cepas revelou que o gene *mecA* foi encontrado na maioria das cepas de MRSA, estando de acordo com a literatura;

- A amplificação randômica do DNA permitiu distinguir as cepas de origem hospitalar das comunitárias;

- Nos testes de citotoxicidade, dos 44 compostos testados, 5 apresentam-se substâncias promissoras como novos antimicrobianos, sendo assim, os estudos químicos e microbiológicos com as mesmas devem ser continuados.

Com base na literatura citada verifica-se que novos fármacos para o tratamento das infecções bacterianas causadas por MRSA são de extrema necessidade e os resultados do presente estudo demonstraram o potencial farmacológico de algumas chalconas e, especialmente hidrazonas, que poderão contribuir diretamente para o desenvolvimento de protótipos farmacêuticos para controlar tais doenças.

REFERÊNCIAS

- ADEWUNMI; C. O.; OGUNGBAMILA; F. O.; OLUWADIYA; J. O. Molluscicidal activities of some synthetic chalcones. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 53, n. 1, p. 110-112, 1987.
- ALCARAZ, M. J.; VICENTE, A. M.; ARAICO, A.; DOMINGUÉZ, J. N.; TERCENIO, M. C.; FERRÁNDIZ, M. L. Role of nuclear factor- κ B and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264,7 cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 1191-1199, 2004.
- ALVAREZ M.; ZARELLI, E.P.; PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. **Biocellular**, v. 28, p. 31-34, 2004.
- AL HARONI, M. Bacterial resistance and the dental professionals' role to halt the problem. **Journal of Dentistry**, v. 36, p. 95-103, 2008.
- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JOGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica**, 2ª Ed., Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 1976. 962 p,
- AMARANTE, J. Prevalência de ESBL pode chegar até 100% das bactérias isoladas em hospitais. **Revista Fato Hospitalar**, v. 7, p. 24-26, 2002.
- AMATO NETO, V.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S. de & BALDY, J.L. da S. **Antibióticos na prática médica**. 4. ed. São Paulo: Editora Roca, 1994. 283 p.
- AMATO NETO, V.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S. de & BALDY, J.L. da S. **Antibióticos na prática médica**. 5. ed. São Paulo: Editora Roca, 2000. 304 p.
- ANAND KB, AGRAWAL P, KUMAR S, KAPILA K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 27, p. 27-29, 2009.

ANDRICOPULO, A.D.; YUNES, R. A.; NUNE S, R.J.; SAVI, A. O.S.; CORRÊA, R.; ARTHUR, M.; REYNOLDS, P. E.; DEPARDIEU, F.; EVERS, S.; DUTKA-MALEN, S.; QUINTILIANI, R.; COURVALIN, P. Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Infectology**, v. 32, p. 11-16, 1996.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKIPASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.

ANTO, R. J., SUKUMARAN, K., KUTTAN, G.; RAO, M. N.; SUBBARAJU, V.; KUTTAN, R. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Letters**, v. 97, n. 1; p. 33-7, 1995.

ÁVILA, H.P. **Atividade antibacteriana de chalconas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

BARBOSA, T.M. AND LEVY, S.B. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3467-3474, 2000.

BATT, D. G., GOODMAN, R. JONES, D.; KERR, J. S.; MANTEGNA, L. R.; MCALLISTER, C.; NEWTON, R. C.; NURNBERG, S.; WELCH, P. K.; COVINGTON, M. B. 2'-substituted chalcone derivatives as inhibitors of interleukin-1 biosynthesis. **Journal of Medical Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 1434-42, 1993.

BERDY, J. The discovery of new bioactive microbial metabolites. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 27, p. 3-25, 1989.

BERTOLUCI, D. F. F. **Uso da vancomicina nas infecções por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em pacientes queimados: monitoramento das concentrações plasmáticas após**

infusão intermitente. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BIEBER, L.M. Química orgânica experimental: integração da teoria, experimento e análise. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 605-610, 1999.

BLACKMORE, C.G.; MCNAUGHTON, P.A.; VAN VEEN, H.W. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. **Molecular Membrane Biology**, v. 18, p. 97-103, 2001.

BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; LOPEZ, S.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; FURLAN, R. L. E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338 n. 2-3, p. 87-95, 2005.

BOECK, P. **Obtenção de moléculas bioativas a partir de substâncias naturais e sintéticas.** 2005. 233f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 281-286, 2004.

BOWDEN, K.; POZZO, A. D.; DUAH, C. K. Structure-activity relations: Part 5. Antibacterial activity of a series of substituted (*E*)-3-(4-phenylbenzoyl)acrylic acids -chalcones, -2-hydroxychalcones and - α -bromochalcones; addition of cysteine to substituted 3-benzoylacrylic acids and related compounds. **Journal of Chemical Research**, v. 12, p. 2801-2830, 1990.

BOYLE, P.; DIEHM, C.; ROBERTSON, C. Meta-analysis of clinical trials of cyclo 3 fort in the treatment of chronic venous insufficiency. **International Journal of Angiology**, v. 22, n. 3, p. 250-262, 2003.

BURTON, G.R.W. & ENGELKIRK, P.G. **Microbiologia para as ciências da saúde.** 7^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 1035

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).

Brazilian Journal of Medical Biological Research, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA Jr., J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CAREY, F. A.; SUNDENBERG, R. J. **Advanced organic chemistry: structure and mechanisms** (Part A) 5ed., New York: Hardcover, 2007.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C.M.O. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4ª Ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002. p. 499-526.

CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; Romeiro, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. 263p.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Investigation and Control of vancomycin-Intermediate and –Resistant Staphylococcus aureus: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel**. Atlanta: GA, 2004.

CESARIN, D.S.; FERREIRA, J.N.; BRAZ, R.F. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 604-611, 2001.

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**. v. 7, n. 2, p. 178-182, 2001.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **NATURE reviews**, V.7, n. 9, p. 629-641, 2009.

CHIN, Y.-W., BALUNAS, M.J., CHAI, H.B., KINGHORN, D. Drug discovery from natural sources. **AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. 239-253, 2006.

CLARK A. In: Natural products. WILLIAMS D.A., LEMKE T.L. **Foye's principles of medicinal chemistry**, 5^a Ed. Baltimor: Lippincott Williams & Willians, 2002. p. 24-35

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, approved standard M100-S20**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2010.

COLLINS, D.M. RADFORD, A. J.; DE LISLE, G. W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, n.1-2, p.83-94, 1994.

COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J. S.; DE BRUYNE, T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica**, v. 67, n. 6, p. 515-519, 2001.

COS, P., VLIETINCK, A.J., BERGHE, D.V., MAESA, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290-302, 2006.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CYRUS, W. G; DANIEL, G. W.; NANYINGI, M. O.; NJONGE, F. K.; MBARIA, J. M. Antibacterial and cytotoxic activity of Kenyan medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 650-652, 2008.

DAMIANI, G.; TELECCO, S.; COMINCINI, S.; SIRONI, M.; CARRETTO, E.; MARONE, P. Comparison of an improved RAPD fingerprinting with different typing methods for discriminating clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **European Journal of Epidemiology**, v. 12, p. 163-169, 1996.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DERESINSKI, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: an Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. **Clinical Infectious Diseases**; v. 40, p. 562 – 573, 2005.

DEVIA, A.C.; FERRETTI, F.A.; PONCE, C.A.; TOMÁ, F. Conformational equilibrium and intramolecular hydrogen bond of 4'X and 4X substituted 2'(OH) chalcones. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 493, p. 187-197, 1999.

DIMMOCK, J.R.; KANDEPU, N. M.; HETHERINGTON, M.; QUAIL, J. W.; PUGAZHENTHI, U.; SUDOM, A. M.; CHAMANKHAH, M.; ROSE, P.; PASS, E.; ALLEN, T. M; HALLERAN, S.; SZYDŁOWSKI, J.; MUTUS, B.; TANNOUS, M.; MANAVATHU, E. K.; MYERS, T. G.; DE CLERCQ, E.; BALZARINI, J. Cytotoxic activities of mannich bases of chalcones and related compounds. **J. Med. Chem.**, 26; 41(7):1014-26, 1998.

DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. **Curr. Journal of Medical Chemistry**, v. 6, p. 1125- 1149, 1999.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DOMINGUEZ, J. N., LEON, C. RODRIGUES, J.; GAMBOA, DE DOMÍNGUEZ, N.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Farmaco**, v. 60, n. 4, p. 307-11, 2005.

DONÁDIO, S.; CARRANO, L.; BRANDI, L.; SERINA, S.; SOFFIENTINI, A.; RAIMONDI, E.; MONTANINI, N.; SOSIO, M.; GUALERZI C. O. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 175-185, 2002.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.-C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

EL-RAYES, N. R.; HOVAKEEMIAN, G. H.; HMOUND, H. S. Heterocycles. 3. Synthesis and spectral data of some 2-pyrazolines. **Chemical Engineering Journal**, v. 29, p. 225-229, 1984.

FLOREY, H. W. ; CHAIN, N. G.; HEATLEY, M. A.; JENNINGS, A. G.; SANDERS, E. P.; ABRAHAM, FLOREY, M. E. **Antibiotics**. London: Oxford University Press, 1949. 120 p.

FOWLER, V.G.JR.; MIRO, J.M.; HOEN, B.; CABELL, C.H.; ABRUTYN, E.; RUBINSTEIN, E.; COREY, G.R.; SPELMAN, D.; BRADLEY, S.F.; BARSIC, B.; PAPPAS, P.A.; ANSTROM, K.J.; WRAY, D.; FORTES, C.Q.; ANGUERA, I.; ATHAN, E.; JONES, P.; VAN DER MEER, J.T.; ELLIOTT, T.S.; LEVINE, D.P.; BAYER, A.S. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. **JAMA**, v. 293, p. 3012-3021, 2005.

FRAGA, B.M. Natural sesquiterpenoids (Review). **Natural Products Reports**, v. 20, p. 392-413, 2003.

GOODMAN, G.A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª Ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 2148 p.

GRAHAME-SMITH, D.G; ARONSON, J.K. **tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GRINHOLC, M.; KAWIAK, A.; KURLEND, J.; GRACZYK, A.; BIELAWSKI, K.P. Photodynamic effect of protoporphyrin diarginate (PPArg2) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and human dermal fibroblasts. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, p. 85-90, 2008.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A Assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 118-23, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol. Aspen Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

HALL, R.M.; STOKES, H.W. Integrons: novel DNA elements which capture genes by sitespecific recombination. **Genética**, v. 90, p. 115-132, 1993.

HALL, B.G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 2, p. 430-435, 2004.

HAMILTON-MILLER, J.M.T. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 209-212, 2004.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HEISIG, P. Inhibitors of bacterial topoisomerases: mechanisms of action and resistance and clinical aspects. **Planta Medica**, v. 67, p. 3-12, 2001.

HERMES-LIMA, M., PONKA, P., SCHULMAN, H.M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone ŽPIH. and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1523, p. 154–160, 2000.

HERSHKO, C. IRON CHELATORS. IN: BROCK, J.H., HALLIDAY, J.W., PIPPARD, M.J., POWELL, L.W. ŽEDS. Iron metabolism in health and disease. W.B. **Saunders, London**, p. 391–426, 1994.

HIJOVA, E. Bioavailability of chalcones. **Bratisl Lek Listy Journal**, v. 107, n. 3, p. 80- 84, 2006.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *S. aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet Infectious Diseases**, v. 350, n. 9092, p. 1670-3, 1997.

HOSKINS, J.; ALBORN, JR.; ARNOLD, J.; BLASZCZAK, L. C.; BURGETT, S.; DEHOFF, B. S.; ESTREM, S. T.; FRITZ, L.; FULLER, W.; GERINGER, C.; GILMOUR, R.; GLASS, J. S.; KHOJA, H. J.;

KRAFT, A. R.; LAGACE, R. E.; LEBLANC, D. J.; LEE, L. N.; LEFKOWITZ, E. J.; LU, J.; MATSUSHIMA, P.; MCAHREN, S. M.; MCHENNEY, M.; MCLEASTER, K.; MUNDY, C. Q.; NICAS, T. I.; NORRIS, F. H. J.; PEERY, R. B.; ROBERTSON, G. T.; ROCKEY, P.; SUN, P.-M.; WINKLER, J. E.; YANG, Y.; YOUNG-BELLIDO, M.; ZHAO, G.; ZOOK, C. A.; BALTZ, R. H.; JASKUNAS, S. R.; ROSTECK, P. R. J.; SKATRUD, P. L.; GLASS, J. I. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5709-5717, 2001.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, n 5-6, p. 217-232, 1989.

ISHITSUKA, H., NINOMIYA, Y. T.; OHSAWA, C.; FUJII, M.; SUHARA, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 22 n. 4, p. 617-21, 1982.

JESSEN, O., ROSENDAL, K.; BULOW, P.; FABER, V.; ERIKSEN, K.R. Changing staphylococci and staphylococcal infections: a ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. **New England Journal Medicine**, v. 281, p. 627-35, 1969.

JURCSAK, N.W.; ZANINI, H. Employing NMR spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4-substituted chalcones. **Journal of Chemical Education**, v. 76, n. 5, p. 653-654, 1999.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 376-380, 1995.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p. 1549-1555, 2000.

KIMURA, Y.; AOKI, T.; AYAE, S. Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy and 6'-deoxychalcones

in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids. **Plant Cell Physiology**, v. 42, p. 1169-1173, 2001.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSi, p. 1456, 2001.

LEE, J. C., M. J. LIU, J. PARSONNET, AND R. D. ARBEIT. Expression of type-8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin-1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 2612-2615, 1990.

LEEUWEN, W. V.; SIJMONS, M.; SLUIJS, J.; VERBRUGH, H.; BELKUM, A. V. On the nature and use of randomly amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, p. 2770-2777, 1996.

LENCASTRE, H. DE JONGE, B. L.; MATTHEWS, P. R.; TOMASZ, A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 7-24, 1994.

LEÓN, C. J.; GÓMEZ, S.M.; MORANTES, S.J.; CORDERO, C.P.; ANCÍZAR, F. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. **Biomédica**, v. 26, p. 161-168, 2006.

LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, (suppl 1), p. 65S-71S, 2002.

LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F.E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J.N.; DAVISON, E.; KURSBAN, G.; MILLER, R.E.; NUZMAN, E.O. In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. **Journal of Medical Chemistry**, v. 38 n. 26, p. 5031-7, 1995.

LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical Infection Disease**, v. 36, n. 1, p. 811-823, 2003.

LIMA, L.M.; Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, p. 1456-1468, 2007.

LODISE, T.P. & MCKINNON, P.S. Prediction model to identify patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia at risk for methicillin resistance. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 24, n. 9, p. 655-661, 2003.

LÓPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMÍNGUEZ, J. N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTÉZ, C. G.; RIBAS, J. C.; DEVIA, C.; RODRÍGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcones derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 9, p. 1999-2013, 2001.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1265-73, 2003.

MACIAS, F.A., MARIN, D.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; VARELA, R.M.; SIMONET, A.M.; CARRERA, C.; MOLINILLO, J.M. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biological Science Space**, v. 17, n.1, p. 18-23, 2003.

MALLORQUÍ-FERNÁNDEZ, G.; MARRERO, A.; GARCÍA-PIQUÈ, S.; GARCÍA-CASTELLNOS; GOMIS-RUTH, F.X. Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 1-8, 2004.

MARANAN, M.C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA S; DAUM, R.S. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, p. 813-49, 1997.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet Infectious Diseases**, v. 351, p. 797-799, 1998.

MASSARANI, E.; NARDI, D.; TAJANA, A.; DEGEN, L. Antibacterial nitrofuran derivatives 2. 5-Nitro-2-furaldehyde aminoacetylhydrazones. **Journal of Medical Chemistry**, v. 14, p. 633 – 635, 1971.

MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **Internal Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135-143, 2003.

MCDEVITT, D.; ROSENBERG, M. Exploiting genomics to discover new antibiotics. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 611-617, 2001.

MCDEVITT, D.; HOLMES, D.J. ;ROSENBERG, M. Novel targets for the future development of antibacterial agents. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 28S–34S, 2002.

MEISSNER, O; HABERLEIN, H. HPLC analysis of flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* Forst. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical Life Science**. v. 826, p. 46-49, 2005.

MEYER, R.; LUTHY, J.; CANDRIAN, U. Direct detection by polymerase chain reaction (PCR) of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.13, n.6, p.268-271, 1991.

MICHELIM, L.; LAHUDE M.; ARAÚJO P.R.; GIOVANAZ D.S.H.; MÜLLER, G.; DELAMARE A. P.L.; COSTA S.O.P. Echeverrigaray S. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive Care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MIMICA, M. J.; MENDES, C.M. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **I Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MIN, L.I.; YUPING LAI.; AMER E. V.; DAVID J. C.; DANIEL E. S.; MICHAEL O. Gram Positive three-component antimicrobial peptidesensing system. **PNAS**, v. 104, p. 9469-74, 2007.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MORAN, G.J.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R.J.; FOSHEIM, G.E.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; TALAN, D.A.; EMERGENCY ID NET STUDY GROUP. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 666-674, 2006.

MOREILLON, P. New and emerging treatment of *Staphylococcus aureus* infections in the hospital setting. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 32-41, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN; R.H. *Staphylococcus*; *Micrococcus*; and other catalase-positive cocci that grow aerobically. **In: Manual of Clinical Microbiology**; 8th edition; Washington; D.C.; USA. V. 1, p. 384-404, 2003.

NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p. 471-495.

NEWMAN, J.D.; CRAGG, J.M.; SNADER, K.H. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal Natural Products**, v. 62, p. 1022-1037, 2003.

NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opin Ther Patents**, v. 14 n. 12, p. 1669-1691, 2004.

NICOLINI P.; NASCIMENTO J.W.L.; GRECO K.V.; DE MENEZES F.G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13(Sup), p. 689-696, 2008.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHØNNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones--bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n.11, p. 3047-54, 2004.

NIKAIDO H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 328-88, 1994.

NOWAKOWSKA, Z.A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

OBERDORFER, K.; POHL, S.; FREY, M.; HEEG, K.; WENDT, C. Evaluation of a single-locus real-time polymerase chain reaction as a screening test for specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 25, p. 657–663, 2006.

OJALA, T. **Biological screening of plant coumarins**. Academic Dissertation, University of Helsinki. v. 62, 2001.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 180-9, 2002.

OPLETALOVA, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceska Slov Farm**, v. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.

O'RIORDAN, K.; C. LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, p. 218–234, 2004.

PACANSKY, J.; MCLEAN, A. D.; MILLER, M. D. Theoretical calculations and experimental studies on the electronic structures of hydrazones and hydrazone radical cations: formaldehyde hydrazone and benzaldehyde diphenylhydrazones. **Journal of Physical Chemistry**, v. 94, p. 90-98, 1990.

PAPPANO, N. B.; PUIG DE CENTORBI, O.; DEBATTISTA, N. B.; CALLERI DE MILAN, C.; BORKOWSKI, E.J.; FERRETTI, F.H. Kinetics of the bacteriostatic activity of natural and synthetic chalcones on a strain of *Staphylococcus aureus*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 17, n.1, p. 27-32, 1985.

PETRONE, R.R.C.B.; BALDASSI, L.; BIDOIA, E. Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos extratos da *Aristolochia gigantea* mart. e zucc. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, supl., p.576-578, 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Ensaio e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p. 2233-2241, 2002.

RAO, Y.K., TZENG, Y. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.

REIMÃO, J. Q. Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RIBEIRO, A.A.; CORONADO, A.Z.; SILVACARVALHO, M.C.; TEIXEIRACARVALHO, B.F.; DIAS, C.; FIGUEIREDO, A. M.S. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 339-345, 2007.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiocologia**. São Paulo: Premier, 372 p., 1997.

ROBINSON, B. Reviews of Fischer indole synthesis. **Chemical Reviews**, n. 63, p. 373, 1963.

ROLLAS, S; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological Activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v.12, p. 1910-1939, 2007.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana – interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

SADER H.S.; STREIT J.M.; FRITSCHÉ T.R.; JONES R.N. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the daptomycin surveillance programme (2002-2004). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 844-852, 2006.

SAMUS, N. M.; TOLEVA, A. D.; PETETS, D.; TSAPKOV, V. I.; BURACHEVA, A.; BURDENKO, A. Synthesis and antimicrobial activity of copper(2+), nickel(2+), and cobalt(2+) coordination compounds with 2-N1-isatin-N3-phenylpicolinamidrazone. **Khimico Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 28; n. 10; p. 50-52, 1994.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia**, v. 13, p. 28-32, 2000.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In.: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 4ª Ed, Porto Alegre/Florianópolis: Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002. p. 341 a 352.

SATO, M., TANAKA, H., YAMAGUCHI, R., OH-UCHI, T., ETOH, H. *Erythrina poeppigiana*-derived phytochemical exhibiting antimicrobial activity against *Cândida albicans* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 81-85, 2003.

SAULNIER, P.; CHACHATY, E.; HILALI, F.; ANDREMONT, A. Single-step polymerase chain reaction for combined gene detection and epidemiological typing in three bacterial models. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, p. 311-316, 1997.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4ª Ed., Porto Alegre/Florianópolis: Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002. p. 499-526.

SCHMIDLIN, M.; ALT, M.; VOGEL, G.; VOEGELI, U.; BRODMANN, P.; BAGUTTI, C. Contaminations of laboratory surfaces with *Staphylococcus aureus* are affected by the carrier status of laboratory staff. **Journal of Applied Microbiology**, v. 10, p. 1365-2672, 2010.

SHIMOKORIYAMA, M. In: **Flavanones chalcones and aurones**. Geissman, T. A. New York: MacMillan Company, 1962. p. 286-313.

SMEE, D. F.; MORRISON, A. C.; BARNARD, D. L.; SIDWELL, R. W. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 106, p. 71-79, 2002.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3ed. New York: W. H. Freeman, 850 p., 1995.

SOMPOLINSKY, D.; SAMRA, Z.; KARAKAWA, W. W.; VANN, W. F.; SCHNEERSON, R.; MALIK, Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 828-834, 1985.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, 27-36, 2005. a

SOUZA, L.B.G.; FIGUEIREDO, B.B. Prevalência de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá. **RBAC**, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

STADLER, M.; KELLER, N.P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological Research**, v. 112, p. 127-130, 2008.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.;

LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drugs discovery. **Methods in Plant Biochemistry**, Biological Techniques, Academic Press London, v. 6, p. 71-131, 1991.

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

SWENSON JM, LONSWAY D, MCALLISTER S, THOMPSON A, JEVITT L, PATEL JB. Detection of *mecA*-mediated resistance using cefoxitin disk diffusion (DD) in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 33-9, 2007.

TABATA, K.; MOTANI, K.; TAKAUANAGI, N.; NISHIMURA, R.; ASAMI, S.; KIMURA, Y.; UKIYA, M.; HASEGAWA, D.; AKIHISA, T.; SUZUKI, T. Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei* induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1404-1407, 2005.

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, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2ª Ed, São Paulo: Atheneu, 2009.

TELLAROLLI, D.N.; FERREIRA, N.C.; RADDI, M.S.G. & SOARES, C.P. Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 3, p. 151-153, 2003.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; A HÉBERT, G.; HILL, B.; HOLLIS, R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 407, 1994.

THOMAS, G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 413, 2003.

THOMSON, C. J.; POWER, E.; WAIGMANN, H.R.; LABISCHINSKI, H. Antibacterial research and development in the 21st century – and industry perspective of the challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 445-450, 2004.

TIBBETTS, R.J.; LIN, T.L.; WU, C.C., Phenotypic evidence for inducible multiple antimicrobial resistance in *Salmonella choleraesuis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.218, p.333-338, 2003.

TRABULSIL, R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRABULSIL, R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAN, J.H.; JACOBY, G.A. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **Process Natural Academic Science**, v. 99, p. 5638-5642, 2002.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMANIA, E.F.A.; SMANIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 370-380, 2007.

VALLA, A.; VALLA, B.; CARTIER, D.; LE GUILLOU, R.; LABIA, R.; FLORENT, L.; CHARNEAU, S.; SCHREVEL, J.; POTIER, P. New síntesis and potencial antimalarial activities of new retinoid-like chalcones. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 41, p. 142-146, 2006.

Van BELKUM, A.; Van LEEWEN W, KLUYTMANS J, VERBRUGH H. Molecular nosocomial epidemiology: high speed typing of microbial pathogens by arbitrary primed polymerase chain reaction assays. **Hospital Epidemiology and Infection Control**, v. 16, p. 658-666, 1995.

Van BELKUM, A.; HERMANS, P. W.M.; LICCIARDELLO, L.; STEFANIA, S.; GRUBB, W.; VAN LEEUWEN, W.; GOESSENS, W. H. F. Polymerase chain reaction-mediated typing of microorganisms: tracking dissemination of genes and genomes. **Electrophoresis**, v. 19, p. 602-607, 1998.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E.; ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, p. 978-984, 2003.

VARALDO, P.E., MONTANARI, M.P., GIOVANETTI, E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in *Streptococci*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 343-35, 2009.

VELÁZQUEZ-MEZA, M E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud. Pública de México**, v. 47, p. 381-387, 2005.

VERONESI, R. & FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2ª Ed. v. 1, São Paulo: Atheneu, 2004.

VIGORITA, M. G. R. MACCARI, F. C.; PIZZIMENTI, C.; GABBRIELLI, G. Trifluoromethylcontaining sulfanilamides: synthesis

and in vitro antibacterial activity; **Il Farmaco**, v. 49, n. 3, p. 197 – 200, 1994.

VIVONE, A.M.; MOREIRA, B.M. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 693-698, 2005.

VUORELA, P., LEINONEN, M., SAIKKU, P., TAMMELA, P., RAUHA, J.P., WENNBERG, T., VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medical Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375-89, 2004.

WALSH, C. **Antibiotics: actions origins resistance**. Washington: SM Press, 2003. 345p.

WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 439-445, 2003.

WILLIAMS, J. G. K. KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WISE, R. Introduction: treatment of Gram-positive infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v 51, Suppl. S2, ii5, 2003.

WON, S.J., LIU, C.T. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 103-12, 2005.

YAMAMOTO, S., AIZU, E.; JIANG, H.; NAKADATE, T.; KIYOTO, I.; WANG, J. C.; KATO R. The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 2, p. 317-23, 1991.

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n.5, p. 1060-1075, 2006.

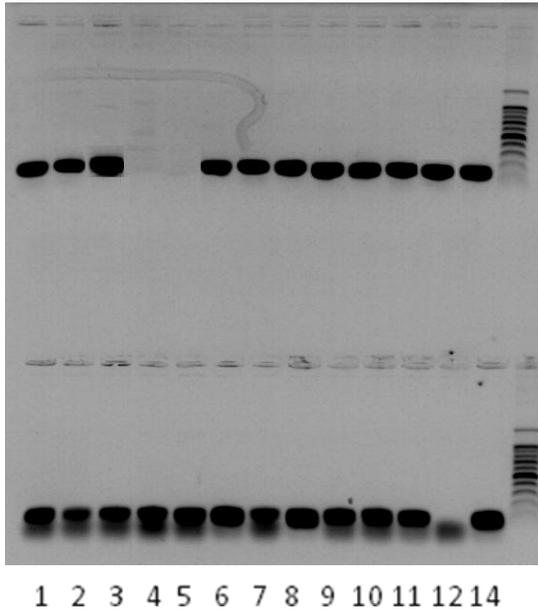
ZAMPINI, I.C.; VATTUONE, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* CAV. Ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 450-456, 2005.

ZEIGER, E. LINCOLN, T. **Fisiologia vegetal**. Tradução de Eliane Romanato Santarém. Porto Alegre: Artmed. 2004. p. 309-334. Título original: Plant physiology.

ZETOLA N.; FRANCIS J.S.; NUERMBERGER E.I.; BISHAI W.R. Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: na emerging threat. **Lancet Infection Diseases** V. 5, p. 275-286, 2005.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4^a Ed., Porto Alegre/Florianópolis: Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, 2002. p. 499-526.

ANEXO A – Análise dos genes de resistência através da PCR e identificação molecular das cepas bacterianas de MRSA



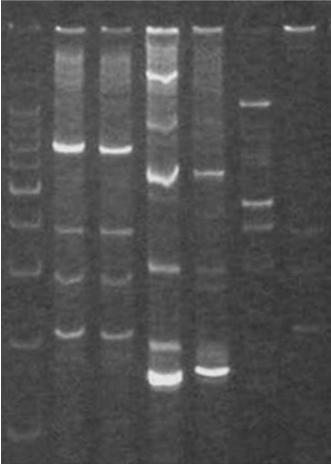
As bandas inferiores confirmam o gene *nuc*, o qual se faz presente apenas em *S. aureus*.

As bandas superiores indicam a presença do gene *mecA*.

Devido ao não crescimento da cepa 13, a mesma não foi incluída neste teste.

ANEXO B – Análise genotípica das cepas bacterianas de MRSA através da técnica de RAPD utilizando o iniciador Eric 2

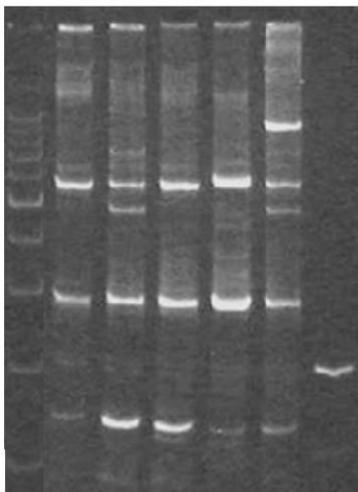
Iniciador Eric 2



14 10 3 6 7 9

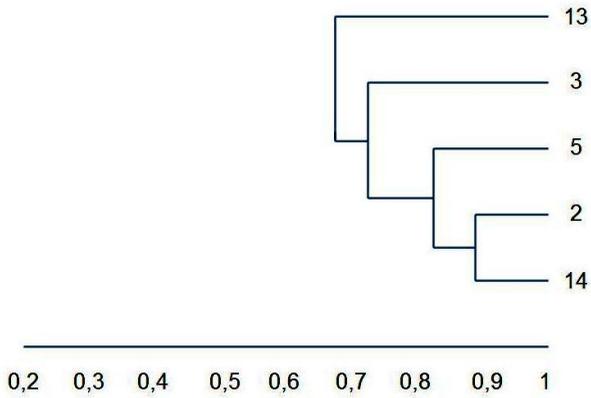
ANEXO C- Análise genotípica das cepas bacterianas de MRSA através da técnica de RAPD utilizando o iniciador AP-7

Iniciador AP7



14 3 2 5 13 7

ANEXO D – Dendograma elaborado a partir do RAPD utilizando iniciador AP-7



ANEXO E – Dendograma elaborado a partir do RAPD utilizando iniciador Eric 2

