



Manuela Santos Pereira

# Preparação e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Triterpenóides Semi-sintéticos

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Março de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Manuela Santos Pereira

# Preparação e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Triterpenóides Semi-sintéticos

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela  
Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e pelo Professor  
Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra

Março de 2015

## DOCUMENTO PROVISÓRIO



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Aos meus avôs já falecidos, à minha mãe,  
ao meu padrasto e ao meu irmão, pela  
educação, pelo apoio e amor  
incondicional e por serem assim, únicos  
na minha vida.

# Agradecimentos

A realização desta dissertação finaliza uma etapa importante da minha vida académica e pessoal e só se tornou possível com a preciosa colaboração e a amizade incondicional de várias pessoas a quem quero agradecer.

Uma das minhas primeiras palavras de enorme reconhecimento e agradecimento são dirigidas à minha orientadora, Professora Doutora Gabriela Silva, por me ter recebido no seu laboratório e me ter dado a oportunidade de trabalhar numa área com a qual ainda não tinha tido contato. Um obrigada pela oportunidade concedida, pela disponibilidade, pelo incentivo e orientação, pelos conhecimentos transmitidos e pela revisão crítica e cuidada da presente dissertação.

Ao Professor Doutor Jorge Salvador, orientador deste trabalho, agradeço especialmente pela orientação científica, pela oportunidade, pelo acompanhamento e por todas as sugestões e críticas construtivas.

À Professora Doutora Maria do Céu e à Raquel por toda a partilha de sabedoria e colaboração. Um obrigada à Faculdade de Farmácia, em especial ao Laboratório de Microbiologia, e a todos os que nele trabalham. Ao Rui Figueiredo, à Sandra Rodrigues e à Dona Celeste pelo constante apoio e disponibilidade.

Ao Joel por estar sempre presente, pela alegria e amizade depositada em todos os momentos, pelas constantes palavras de incentivo, e carinho.

À Rita, minha grande amiga, pelas trocas de conhecimento, palavras de ânimo e companheirismo, por todos os momentos vividos, pela companhia e palavras de força durante este percurso.

Ao meu irmão pela amizade e por contribuir para o meu crescimento.

E a ti, obrigada pela compreensão, pelo carinho e por todo o amor.

Por último, mas não menos importante, à minha mãe e ao meu padrasto uma palavra de reconhecimento muito especial, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, souberam ajudar-me. Por sempre me incentivarem perante os desafios, a fazer mais e melhor e nunca desistir dos sonhos, quero partilhar convosco a alegria de os conseguir concretizar! À restante família que sempre me encorajou a prosseguir, bem como a todos aqueles que direta ou indiretamente incentivaram e facilitaram a sua concretização, bem-haja.

# Índice

<b>Resumo</b>	<b>i</b>
<b>Palavras Chave</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Keywords</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>I. Introdução</b>	<b>I</b>
<b>I.1. Agentes Antibacterianos</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Problemática da Resistência Bacteriana aos Antibacterianos</b>	<b>5</b>
I.2.1. Origem da Resistência	5
I.2.2. Propagação da Resistência Bacteriana	7
I.2.3. Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antibacterianos	8
I.2.4. Consumo versus Resistência aos Antibacterianos	8
I.2.5. Estratégia para Combater o Aumento da Resistência aos Antibacterianos	10
<b>I.3. Produtos Naturais na Indústria Farmacêutica</b>	<b>10</b>
I.3.1. Produtos Naturais e Antibacterianos	12
<b>I.4. Triterpenóides Pentacíclicos</b>	<b>14</b>
I.4.1. Considerações Gerais	14
I.4.2. Ácido Ursólico	17
<b>2. Objetivos</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21

<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Compostos Químicos em Estudo</b>	<b>25</b>
3.1.1. Ácido Ursólico e Derivados Semi-sintéticos	25
3.1.2. Síntese Química do Composto 14 (Ácido 3 $\beta$ -Acetoxi-urs-12-en-28-óico)	29
3.1.3. Preparação das Soluções de Trabalho dos Compostos	30
<b>3.2. Avaliação Biológica</b>	<b>31</b>
3.2.1. Estirpes Bacterianas	31
3.2.2. Reagentes	31
3.2.2.1. Meios de Cultura e Preparação	31
3.2.2.2. Outros reagentes e Equipamentos	32
3.2.3. Avaliação da Atividade Antibacteriana	34
3.2.3.1. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Técnica de Kirby-Bauer	34
3.2.3.2. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Estudo de Sinergismo	36
3.2.3.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória	36
3.2.3.3.1. Método de Microdiluição em Placa	37
3.2.3.4. Determinação da Concentração Mínima Bactericida	38
3.2.3.5. Curva de Crescimento Bacteriano	39
3.2.4. Avaliação da Citotoxicidade	45
3.2.4.1. Teste de Redução do 4,5-dimetil-3-tiazolil-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	46
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Caracterização do Perfil de Suscetibilidade Bacteriana aos Antibióticos e Compostos em Estudo</b>	<b>53</b>
4.1.1. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Técnica de Kirby-Bauer	53
4.1.2. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Estudo de Sinergismo	56
4.1.3. Método de Microdiluição em Placa	58
4.1.3.1. Análise Geral dos Resultados de Concentração Mínima Inibitória	61

4.1.3.2. Análise e Discussão Detalhada dos Resultados de Concentração Mínima Inibitória e de Concentração Mínima Bactericida	62
4.1.3.2.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	63
4.1.3.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	64
4.1.3.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, HUC 1 e HUC 2	64
4.1.3.2.4. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, HUC 3 e HUC 4	66
<b>4.2. Relação Estrutura - Atividade dos Triterpenóides Pentacíclicos</b>	<b>67</b>
<b>4.3. Possível Mecanismo de Ação dos Triterpenóides Pentacíclicos</b>	<b>70</b>
<b>4.4. Curvas de Crescimento Bacteriano</b>	<b>71</b>
4.4.1. Efeito do Ácido Ursólico e seu Derivado Semi-sintético na Taxa de Crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	71
4.4.1.1. Efeito do Ácido Ursólico na Taxa de Crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	73
4.4.1.1.1. Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 na presença do ácido ursólico a várias concentrações	73
4.4.1.1.2. Curva de crescimento de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações	74
4.4.1.2. Efeito do Derivado Semi-sintético do Ácido Ursólico na Taxa de Crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	75
4.4.1.2.1. Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 na presença do composto 14 a várias concentrações	75
4.4.1.2.2. Curva de crescimento de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença do composto 14 a várias concentrações	76
4.4.2. Parâmetros cinéticos	77
4.4.2.1. Retas de Semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da	

fase exponencial das curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações	78
4.4.2.2. Análise dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações	82
4.4.2.3. Retas de Semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações	83
4.4.2.4. Análise dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 na presença do composto 14 a várias concentrações	87
4.4.3. Análise Geral do Efeito do Ácido Ursólico e seu Derivado Semi-sintético na Taxa de Crescimento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	88
<b>4.5. Avaliação da Citotoxicidade</b>	<b>88</b>
<b>5. Conclusão</b>	<b>93</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>97</b>

# Resumo

A resistência bacteriana aos antibióticos é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, não se tratando de um problema recente, mas que se tem tornado crítico, acentuando-se cada vez mais e dificultando assim o seu combate.

As plantas com propriedades terapêuticas constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos, sendo também utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Os triterpenóides constituem uma classe de compostos que se encontra amplamente distribuída na natureza. Recentemente, tem vindo a aumentar o seu interesse terapêutico, particularmente como agentes antibacterianos, sendo considerados como protótipos para a química farmacêutica. Dos triterpenóides existentes, aqueles que estão descritos como apresentando uma melhor de atividade biológica, são os ácidos oleanólico e ursólico. Estudos de relação estrutura-atividade têm demonstrado que modificações em determinados carbonos destes compostos podem conduzir a novos derivados significativamente mais ativos. Daí a importância de se proceder à síntese triterpenóides semi-sintéticos, de forma a maximizar o seu potencial biológico.

Assim, o objetivo geral deste estudo foi a avaliação da atividade antibacteriana do ácido ursólico e derivados semi-sintéticos, assim como do ácido oleanólico, em modelos procariotas, nomeadamente, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e ainda estirpes de origem clínica, *S. aureus* HUC 1 e HUC 2 e *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4, metilicina (MRSA) e vancomicina (VRE) resistentes, repetivamente.

Numa primeira fase, foram selecionados vários compostos derivados do ácido ursólico que apresentaram atividade biológica, foi ainda sintetizado um outro derivado do ácido ursólico, o composto 14.

Numa segunda etapa, foi feito um *screening* da atividade antibacteriana dos vários compostos pelo método de difusão em disco, e foram ainda determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI), através do método de microdiluição em placa e por fim, determinada a concentração mínima bactericida (CMB).

Foram ainda feitas curvas de crescimento bacteriano na presença e na ausência de compostos químicos, ácido ursólico e o composto 14, selecionados de acordo com a sua melhor atividade antibacteriana. Por fim, foi avaliada a citotoxicidade destes compostos pelo teste de MTT.

Na generalidade, os compostos apresentaram melhor atividade antibacteriana face a cocos Gram-positivo, particularmente na estirpe *E. faecalis* ATCC 29212. Observou-se redução do crescimento bacteriano em presença do ácido ursólico e composto 14, especialmente nesta estirpe. O composto 14 não induziu toxicidade celular em macrófagos, o que associado à sua atividade antibacteriana observada neste estudo o coloca como potencial molécula de estudo para possíveis compostos antibacterianos.

**Palavras Chave:** Resistência bacteriana, triterpenóides, ácido ursólico.

# Abstract

Antimicrobial resistance is a major worldwide public health problem, though not a recent one, but that has becoming critical, increasing and difficult to fight.

Plants with therapeutic properties, constitute an important source of new biological active compounds, also used in the treatment of infectious diseases. The triterpenoids are a class of compounds which is widely distributed in nature. Recently, there has been increasing interest in particular as antibacterial agents, being considered as a prototype for the pharmaceutical chemistry. The triterpenoids reported has showing a good biological activity are oleanolic and ursolic acids. Studies of structure-activity relationship have demonstrated that alterations in certain carbons of these compounds may lead to new significantly more active derivatives, thus the importance of carrying the synthesis of semisynthetic triterpenoids, to maximize its biological potential.

Thus, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of ursolic acid and semisynthetic derivatives as well as oleanolic acid in prokaryotes types, namely *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and even strains of clinical origin, *S. aureus* HUC 1 e HUC 2 e *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4, methicillin (MRSA) and vancomycin (VRE) resistant, respectively.

In a first stage, we selected several ursolic acid derivative compounds that showed biological activity, and another derivative of ursolic acid, was synthesized, the compound 14.

In a second step, a screening of antibacterial activity was performed for various compounds using the disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentrations (MIC) was determined by the microdilution plate method, and finally, the minimum bactericidal concentration (MBC).

Bacterial growth curves were performed in the presence and absence of the chemical compounds, ursolic acid and compound 14, selected according to their better antibacterial activity. Finally, the cytotoxicity of these compounds was evaluated by MTT assay.

Overall, the compounds showed better antimicrobial activity against the Gram-positive bacteria, in particular in *E. faecalis* ATCC 29212. A reduction of the bacterial growth was observed in presence of ursolic acid and compound 14, more significant in this strain.

Compound 14 did not induce cell toxicity in macrophages cell line, which associated to its antibacterial activity observed in this study, indicates this compound as a potential molecule to investigate for possible new antibacterial compounds.

**Keywords:** Bacterial resistance, triterpenoids, ursolic acid.

# Lista de Abreviaturas

µL	Micro litro
°C	Graus Celsius
AMC	Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg)
AO	Ácido oleanólico
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Ácido ursólico
Caldo MH	Caldo Mueller- Hinton
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CIP	Ciprofloxacina (CIP 5 µg)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CN	Gentamicina (CN 30 µg)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	Meio Earle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
g	Tempo de geração
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HUC	Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
Log	Logaritmo
mg	Miligrama
MH	Meio de Agar Mueller-Hinton
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mmol	Milimole
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
MS	Espectrometria de massa
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
k	Taxa específica de crescimento
RAW 264.7	Linha celular de macrófagos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBF	Soro bovino fetal
THF	Tetraidrofurano
TS	Meio tripticase-soja ou <i>Soyabean Casein Digest Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VRE	<i>Enterococcus faecalis</i> vancomicina resistente
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Efeito da pressão seletiva nas bactérias. População bacteriana suscetível na presença de bactérias com resistência a determinado antibiótico (à esquerda); Na presença do antibiótico, as bactérias suscetíveis são destruídas e as resistentes sobrevivem (ao centro); As bactérias resistentes proliferam podendo causar nova infecção. (Adaptado da literatura <sup>12</sup> ).	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Correlação entre a percentagem de pneumococos resistentes à penicilina e o uso ambulatorio de antibióticos em vários países (Bandas com intervalos de confiança de 95%). (Adaptado da literatura <sup>20</sup> ).	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Origem de pequenas moléculas em uso clínico de 1981 a 2006. S) Molécula totalmente sintética; ND) Molécula derivada de um produto natural; N) Produto natural; S *) Síntese total, mas o farmacóforo é a partir de um produto natural. (Adaptado da literatura <sup>38</sup> ).	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular do esqualeno, um precursor do grupo de triterpenos.	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Sistemas de ciclização do esqualeno em organismos eucariotas.	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> Estruturas moleculares do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos).	<b>15</b>
<b>Figura 7.</b> Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.	<b>16</b>
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do ácido ursólico (à esquerda) e do ácido oleanólico (à direita).	<b>17</b>
<b>Figura 9.</b> Principais locais que conferem bioatividade aos derivados triterpenóides pentacíclicos do tipo oleanano e ursano (Adaptado da literatura <sup>81</sup> ).	<b>18</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema da reação química de síntese do composto 14 a partir do ácido ursólico.	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Método de microdiluição em placa para avaliação da suscetibilidade antibacteriana. Ensaio feito em triplicado (Amarelo ABC e CDE), com diluições	<b>38</b>

de 1:2 da esquerda para a direita e três controlos (Verde – controlo de esterilidade, Amarelo – controlo positivo e Azul – controlo de crescimento).

**Figura 12.** Multiplicação bacteriana por fissão binária. (Adaptado da literatura<sup>104</sup>). **39**

**Figura 13.** Determinação espectrofotométrica da densidade celular. **41**

**Figura 14.** Representação gráfica de uma curva de crescimento bacteriano. (Adaptado de<sup>91</sup>). **42**

**Figura 15.** Procedimento experimental para elaboração de uma curva de crescimento bacteriano. **45**

**Figura 16.** Estrutura base do ácido ursólico (AU) e oleanólico (AO) com os carbonos funcionalizados. **69**

**Figura 17.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C. **73**

**Figura 18.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. aureus* em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C. **74**

**Figura 19.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *E. faecalis* em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C. **75**

**Figura 20.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. aureus* em contato com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C. **77**

**Figura 21.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *E. faecalis* em contato com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C. **78**

**Figura 22.** Placa de MTT em linhas celulares de macrófagos para avaliação da viabilidade celular dos compostos AU e I4 após incubação com as respectivas concentrações CMI, 2×CMI e 3×CMI. Quatro controlos: C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, e C<sub>3</sub>. Ensaio feito em triplicado. **91**

**Figura 23.** Viabilidade celular dos macrófagos na presença de DMSO, tendo em conta os diferentes controlos para CMI, 2×CMI e 3×CMI do composto AU. **92**

**Figura 24.** Viabilidade celular dos macrófagos na presença do composto I4 a CMI e 2×CMI. **92**

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Nome dos diferentes compostos testados e respetiva estrutura química. (AU, ácido ursólico; AO, ácido oleanólico).	26
<b>Tabela 2.</b> Modelos bacterianos selecionados para avaliar a atividade antibacteriana dos compostos.	31
<b>Tabela 3.</b> Diâmetro do halo de inibição do crescimento da <i>E.coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 e <i>S. aureus</i> ATCC 29213 após aplicação dos discos de Ciprofloxacina (CIP 5 µg), Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) e restantes compostos.	54
<b>Tabela 4.</b> Classificação das estirpes em resistente ou suscetível, de acordo com os valores dos diâmetros dos halos documentados pelo EUCAST.	55
<b>Tabela 5.</b> Diâmetro do halo de inibição do crescimento da <i>E.coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 e <i>S. aureus</i> ATCC 29213 após aplicação dos discos de Ciprofloxacina (CIP 5 µg), Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) em conjunto com os compostos ácido ursólico e ácido oleanólico.	57
<b>Tabela 6.</b> Diâmetro do halo de inibição do crescimento da <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 e <i>S. aureus</i> ATCC 29213 após aplicação dos discos de Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) em associação com os restantes compostos.	58
<b>Tabela 7.</b> Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida dos diferentes compostos na <i>E. coli</i> ATCC 25922 e na <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	60
<b>Tabela 8.</b> Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida dos diferentes compostos na <i>S. aureus</i> ATCC 29213 e ainda <i>S. aureus</i> HUC 1 e HUC 2.	61
<b>Tabela 9.</b> Concentração Mínima Inibitória e Concentração mínima bactericida dos diferentes compostos na <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 e <i>E. faecalis</i> HUC 3 e HUC 4.	62
<b>Tabela 10.</b> Nome e estrutura dos compostos que apresentaram uma melhor atividade bacteriana nas estirpes testadas.	70

<b>Tabela 11.</b> Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>S. aureus</i> em contacto com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>80</b>
<b>Tabela 12.</b> Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 em contacto com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>82</b>
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em contacto com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>84</b>
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 em contacto com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>84</b>
<b>Tabela 15.</b> Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>S. aureus</i> em contacto com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>85</b>
<b>Tabela 16.</b> Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 em contacto com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>87</b>
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em contacto com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>89</b>
<b>Tabela 18.</b> Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 em contacto com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.	<b>89</b>

# I. Introdução

**I. Introdução**

**I.1. Agentes Antibacterianos**

**I.2. Problemática da Resistência Bacteriana aos Antibacterianos**

I.2.1. Origem da Resistência

I.2.2. Propagação da Resistência Bacteriana

I.2.3. Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antibacterianos

I.2.4. Consumo versus Resistência aos Antibacterianos

I.2.5. Estratégia para Combater o Aumento da Resistência aos Antibacterianos

**I.3. Produtos Naturais na Indústria Farmacêutica**

I.3.1. Produtos Naturais e Antibacterianos

**I.4. Triterpenóides Pentacíclicos**

I.4.1. Considerações Gerais

I.4.2. Ácido Ursólico

## I. Introdução

Desde os primórdios dos tempos que o homem tenta controlar as doenças a fim de manter a sua sobrevivência. Há muito tempo que os investigadores se centram no estudo de diversas patologias, nomeadamente de infeções bacterianas, com o intuito de prevenir, diagnosticar precocemente e desenvolver novas terapêuticas mais eficazes. Neste âmbito é particularmente urgente o desenvolvimento de estudos que se centrem na procura de novas terapias uma vez que as infeções têm sido uma das principais causas de doença ao longo da história da humanidade.

### I.1. Agentes Antibacterianos

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, foi um dos acontecimentos mais marcantes da história da ciência, da medicina e da farmácia do século XX. Se conjugarmos a inovação científica com os benefícios ao nível da saúde pública e, conseqüentemente, os ganhos no plano da economia civilizacional, podemos afirmar que a descoberta da penicilina foi a conquista mais relevante da história da ciência.<sup>1</sup> Este composto natural, produzido por fungos do género *Penicillium*, salvou centenas de milhares de vidas durante a 2ª Guerra Mundial, uma vez que é tóxico para estirpes do género *Staphylococcus*, mas seguro para ser utilizado em humanos. O facto de ser tóxico para este género permitiu tratar uma grande variedade de infeções que até então não possuíam tratamento. A penicilina não foi apenas um novo fármaco nem um acontecimento científico isolado, a sua descoberta abriu o caminho a novos investimentos científicos no âmbito da antibioterapia e conseqüentemente à descoberta de novos antibióticos.<sup>1</sup>

A penicilina G ou benzilpenicilina foi o primeiro antibiótico a tornar-se disponível para uso clínico em 1942. Tal acontecimento marcou o início de uma nova era que produziu um grande número de compostos. As primeiras penicilinas naturais e biossintéticas encontram-se ainda hoje em uso clínico, outras, semi-sintéticas, com um amplo espectro e melhores propriedades farmacocinéticas foram gradualmente sendo utilizadas.<sup>2</sup>

A quimioterapia antibacteriana permitiu diminuir drasticamente a incidência de doenças infecciosas, sendo por esta razão considerada um dos fatores que mais contribuiu para o

grande aumento da esperança média de vida, registado nas últimas décadas, nos países desenvolvidos.<sup>3</sup> Assim, a descoberta e caracterização de substâncias com propriedades antibacterianas e a sua aplicação no tratamento de doenças infecciosas constitui uma conquista muito relevante para a medicina neste século.<sup>3</sup> Os primeiros antibióticos eram substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos ambientais que impediam o desenvolvimento de outros microrganismos. Assim o Homem começou a associar os antibióticos a uma forma de tratamento das doenças infecciosas.

No entanto, os microrganismos têm vindo a desenvolver crescentes mecanismos de resistência e multirresistência que têm contrariado os avanços alcançados no tratamento de infeções.<sup>4</sup>

A designação “agente antimicrobiano” geralmente aplica-se para definir diversas substâncias orgânicas, de origem natural, sintética ou semi-sintética, que apresentem potencialidades terapêuticas antimicrobianas, sendo que, tais potencialidades advêm do facto de possuírem uma toxicidade seletiva antibacteriana podendo ser administradas, no tratamento de doenças infecciosas, sem causar danos nas células do hospedeiro.<sup>4</sup>

O antibiótico ideal deve apresentar características como toxicidade seletiva para o microrganismo, atividade bactericida, rápida absorção, eficácia no alvo, facilidade de administração, não conduzir ao desenvolvimento de resistência antibacteriana, entre outras, de forma a eliminar o microrganismo causador da doença com o mínimo de danos para o hospedeiro. Para inibir o crescimento visível de um determinado microorganismo é necessário a presença de uma concentração mínima de antibiótico no local da infeção, concentração conhecida como Concentração Mínima Inibitória (CMI).<sup>5</sup>

Os antibióticos podem apresentar três ações distintas: ação bacteriostática, promovendo a inibição do crescimento bacteriano, impedindo a proliferação dos microrganismos, mantendo-os em fase estacionária (não ocorre morte celular),<sup>6</sup> ação bactericida, promovendo a destruição de uma população bacteriana atuando em processos vitais na célula levando à sua morte celular mas não há lise celular, e ação bacterolítica onde ocorre indução da morte celular por lise, levando à diminuição da turvação da cultura e do número de células viáveis.<sup>4,6</sup>

Hoje em dia várias são as classes de antibióticos, algumas específicas para determinados grupos bacterianos, que estão disponíveis e são utilizadas como agentes terapêuticos,

apresentam um espectro de ação mais alargado, diferentes mecanismos de ação e diferentes propriedades farmacocinéticas.<sup>7</sup>

Atualmente, existem mais tecnologias disponíveis e um maior conhecimento científico que permite a descoberta e desenvolvimento de novos compostos eficazes no tratamento de infecções. Contudo, a diminuição na síntese de novos compostos e o aumento das resistências conduziu a uma enorme diminuição das opções terapêuticas.<sup>8</sup>

## **1.2. Problemática da Resistência Bacteriana aos Antibacterianos**

Perante a euforia desencadeada pela descoberta e utilização dos primeiros antibióticos acreditou-se, mesmo entre a comunidade científica, no total desaparecimento das doenças infecciosas.<sup>9,10</sup> Contudo, atualmente, assiste-se, pelo contrário, ao ressurgimento de muitas delas.<sup>9</sup>

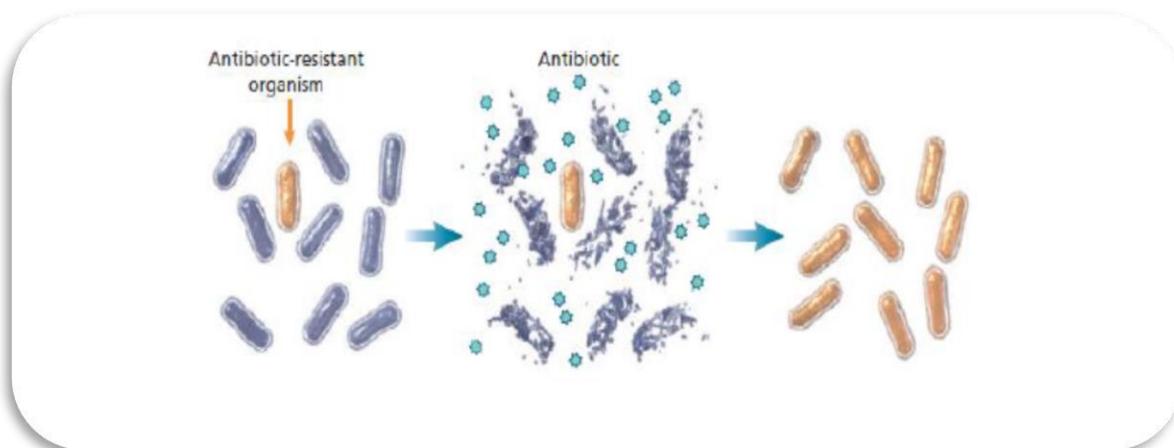
A resistência antibacteriana é atualmente um problema de saúde pública mundial, uma vez que muitas bactérias anteriormente suscetíveis aos antibióticos habitualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes. Embora considerada um fenómeno biológico natural, a resistência aos antibióticos têm-se tornado um grave problema devido ao ritmo crescente da sua evolução e disseminação entre as populações microbianas. Paralelamente a esta preocupação verifica-se um decréscimo de investimentos na pesquisa, desenvolvimento e introdução de novos agentes anti-infecciosos no mercado.

A resistência aos antibacterianos é também um problema multifatorial e que requer uma abordagem multidisciplinar. Não se trata de um problema recente, mas que se tem tornado cada vez mais crítico, sendo necessário tomar medidas urgentes para minimizar as suas consequências. A implementação dessas medidas deve ser efetuada a nível geral, ou seja, hospitalar, ao nível dos profissionais de saúde, da comunidade, e da indústria de produção animal, agricultura e veterinária.<sup>11</sup>

### **1.2.1. Origem da Resistência**

Quanto à origem da resistência, é referido que o facto de alguns microrganismos produzirem naturalmente substâncias químicas para proteção de outros microrganismos fez com que estes desenvolvessem mecanismos de resistência aos efeitos dos antibióticos atualmente utilizados. Desde então essa resistência tem sido transmitida através de linhagens microbianas, permitindo que estirpes suscetíveis se tornem resistentes.<sup>8</sup> O aparecimento da resistência antibacteriana é uma consequência da sua utilização. Embora os antibióticos sejam

essenciais na cura de algumas infecções, o seu uso indevido ocorre, de forma significativa, em todo o mundo, geralmente sob a forma do uso abusivo e desnecessário, o que aumenta a pressão seletiva sobre as bactérias para que desenvolvam resistências.<sup>8</sup> Assim, o aparecimento da resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural que surge como resultado da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos. A pressão seletiva diz respeito às condições ambientais que permitem que os organismos com certas características possam sobreviver e proliferar, (figura 1).



**Figura 1.** Efeito da pressão seletiva nas bactérias. População bacteriana suscetível na presença de bactérias com resistência a determinado antibiótico (à esquerda); Na presença do antibiótico, as bactérias suscetíveis são destruídas e as resistentes sobrevivem (ao centro); As bactérias resistentes proliferam podendo causar nova infecção. (Adaptado da literatura<sup>12</sup>).

A exposição a um antibiótico, por exemplo, pode inibir ou matar a maioria da população de bactérias suscetíveis, no entanto, um subconjunto de organismos resistentes pode não ser inibido ou morto pelo antibiótico.<sup>12</sup> A intensa pressão seletiva existente, não apenas em ambiente clínico, mas também em aquicultura e agricultura, pode favorecer a persistência de populações bacterianas resistentes, bem como a transmissão dos seus elementos de resistência.<sup>13</sup>

Na atualidade, diferentes expressões (ou termos) estão a ser utilizados na literatura biomédica para descrever os vários perfis de resistência aos antibacterianos apresentados pelas bactérias. As expressões normalmente utilizadas são: multirresistência aos antibacterianos, resistência extensiva aos antibacterianos e pan-resistência aos antibacterianos. Alguns estudos tentam esclarecer a utilização destas expressões e sugerem a seguinte padronização: multirresistência aos antibacterianos refere-se a bactérias

resistentes a três ou mais classes de antibacterianos com atividade significativa para uma espécie bacteriana. Resistência extensiva aplica-se às bactérias resistentes a estas 3 classes significativas que caracterizam a multirresistência aos antibacterianos e a mais uma ou duas outras classes de antibacterianos. O termo pan-resistência é geralmente utilizado quando a bactéria é resistente a todos os antibacterianos disponíveis para o tratamento das infecções por uma espécie bacteriana, ou seja, resistente a todos os antibióticos potencialmente eficazes. Em suma, a alta pressão seletiva exercida continuamente pelo uso abundante de antibacterianos ocasionou o aparecimento de isolados clínicos multirresistentes, com resistência extensiva e com pan-resistência aos antibacterianos.<sup>14</sup>

### 1.2.2. Propagação da Resistência Bacteriana

O aparecimento, a transmissão e disseminação dos microrganismos resistentes pode ocorrer através do contato direto entre profissionais de saúde e utentes, ou indiretamente pelo contato com o equipamento médico e cirúrgico contaminado, assim como através do ambiente, da água e da alimentação.<sup>12,15</sup>

Os antibióticos são usados em maior quantidade em animais saudáveis, utilizados na alimentação, do que propriamente no tratamento de doenças em pacientes humanos. Na pecuária, os antibióticos são usados extensivamente para prevenir doenças, agentes profiláticos, e para promover o crescimento dos animais, prática que envolve a administração simultânea e em massa deste tipo de medicamento.<sup>16</sup> Esta prática constitui a principal diferença entre o uso de antibióticos em animais e em seres humanos.<sup>8</sup> Alguns dos mesmos antibióticos são utilizados em animais destinados à alimentação e na medicina humana, levando ao risco real de surgimento e disseminação de bactérias resistentes, incluindo aquelas capazes de causar infecções em animais e pessoas. Assim, os animais destinados ao consumo humano são fontes de bactérias que podem causar infecções humanas. Essas bactérias podem carregar determinantes de resistência que são transmitidos aos humanos através da alimentação ou pelo contato direto com os animais.<sup>11,17</sup> Por exemplo, a resistência da *Escherichia coli* à ciprofloxacina está associada ao uso de fluoroquinolonas na avicultura.<sup>15</sup>

Desta forma, a disseminação de genes resistentes, a partir de bactérias de origem animal para bactérias humanas, é um perigo enorme. Os problemas associados ao uso de antibióticos na criação de animais, incluindo a pecuária, avicultura e a pesca têm crescido em todo o mundo sem que existam evidências concretas da sua necessidade ou benefícios.<sup>8</sup> De

acordo com Onwubiko e Sadiq,<sup>18</sup> a incorreta utilização dos antibacterianos na prática clínica, e na indústria de produção animal constitui a principal causa de transmissão de resistência. Esta utilização excessiva conduziu a uma contaminação de ecossistemas naturais, cuja clara consequência é a seleção de bactérias resistentes o que conseqüentemente, provoca a um grande impacto em termos de saúde pública.<sup>17</sup> O aumento massivo do comércio (importações e exportações alimentares, por exemplo) e da mobilização humana como consequência da globalização, tem permitido a propagação de agentes infecciosos, e a conseqüente emergência e disseminação da resistência aos antibacterianos.<sup>12</sup>

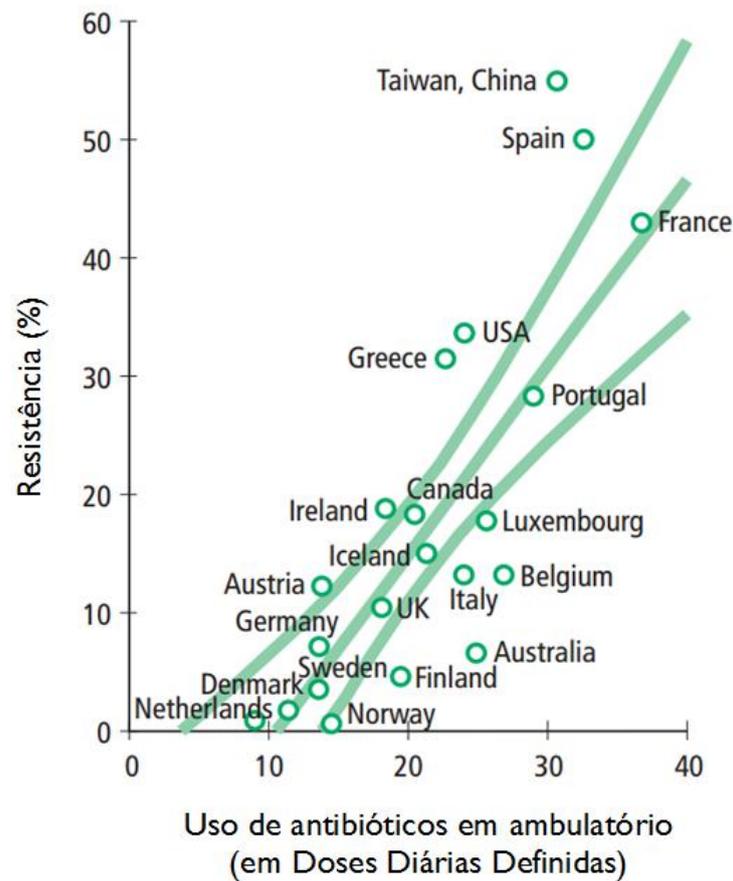
### **1.2.3. Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antibacterianos**

O uso de vários antibacterianos, ao longo dos anos, tem conduzido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos. Atualmente existem diversas espécies multirresistentes, nomeadamente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), *S. aureus* vancomicina resistente (VRSA), *Mycobacterium tuberculosis*, entre outras.<sup>15</sup>

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser conseguida de várias formas: pela alteração do alvo celular do antibiótico, pela diminuição da permeabilidade celular, pelo aumento do seu efluxo a partir da célula, e pela destruição ou modificação do antibiótico.<sup>19</sup>

### **1.2.4. Consumo versus Resistência aos Antibacterianos**

O fenómeno da resistência bacteriana tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada de antibióticos, sendo que existe uma correlação clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência bacteriana.<sup>20</sup> (Figura 2). Estimativas fornecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que possivelmente metade do consumo total de antibióticos não seja necessário, sendo que em muitos países vendem-se diretamente antibióticos sem necessidade de prescrição por parte de um profissional de saúde, o que agrava o problema.<sup>20,21</sup>



**Figura 2.** Correlação entre a percentagem de *pneumococos* resistentes à penicilina e o uso ambulatorial de antibióticos em vários países (Bandas com intervalos de confiança de 95%). (Adaptado da literatura<sup>20</sup>).

A substituição dos antibióticos habitualmente prescritos aos pacientes por outros mais modernos, tem sido a resposta à resistência bacteriana neste momento. No entanto, esta estratégia não é viável a longo prazo pelo facto de a indústria farmacêutica investir cada vez menos no desenvolvimento de novos antibióticos em detrimento de outros fármacos com maior potencial de mercado (ex: fármacos para doenças crónicas), e pelo facto de, com maior ou menor rapidez, se desenvolverem resistências aos novos antibióticos introduzidos no mercado.<sup>20,22,23</sup>

A resistência aos antibióticos é responsável por consequências clínicas e económicas graves, uma vez que origina o aumento da morbilidade (taxa de portadores de infeção) e mortalidade humana e animal. A hospitalização prolongada e o uso de fármacos diferentes dos de primeira linha contribuem para um maior risco de complicações médicas, aumentando, de forma acentuada, os custos dos cuidados de saúde.<sup>20,22</sup>

### **I.2.5. Estratégia para Combater o Aumento da Resistência aos Antibacterianos**

Tendo em conta a relevância do problema da resistência bacteriana e a sua crescente ameaça para a saúde pública a nível mundial, tem sido reconhecida a importância do estudo da emergência da resistência bacteriana e a necessidade de serem desenvolvidas estratégias de vigilância e controlo.<sup>24</sup> Em Portugal, a Direção Geral de Saúde criou um Programa Nacional de Prevenção das Resistências aos Antimicrobianos com a finalidade de diminuir a taxa elevadas de incidência de resistência aos antibióticos, através da implementação de um sistema de vigilância do consumo de antibióticos mais apertado e da criação de uma rede nacional de vigilância das resistências aos antibacterianos que envolva a rede laboratorial e permita detetar precocemente situações de alerta.<sup>25</sup>

Em suma, uma vigilância eficaz é fundamental para os esforços de controle nacionais e internacionais da resistência antibacteriana, dado que este não é um fenómeno recente, mas um problema crítico de saúde, hoje em dia. Durante várias décadas e em diferentes níveis, as bactérias responsáveis pelas infeções comuns desenvolveram resistência a cada antibiótico novo criado e a resistência antibacteriana evoluiu, tornando-se uma ameaça à saúde mundial, tal leva-nos ao reconhecimento da necessidade de uma ação urgente. Sem dúvida, que mais informações e novas ferramentas são necessárias, mas as estratégias e intervenções disponíveis minimizam a escala e o impacto da resistência antimicrobiana e maximizam a vida útil e efetiva dos antibióticos existentes.

Importante realçar que muitos pacientes em todo o mundo sofrem as consequências da resistência antibacteriana, pois as infeções já não são suscetíveis aos medicamentos comuns utilizados no seu tratamento. A evolução da resistência antibacteriana está assim associada à escassez de antibióticos, desta forma é necessário descobrir e desenvolver novos antibióticos urgentemente.

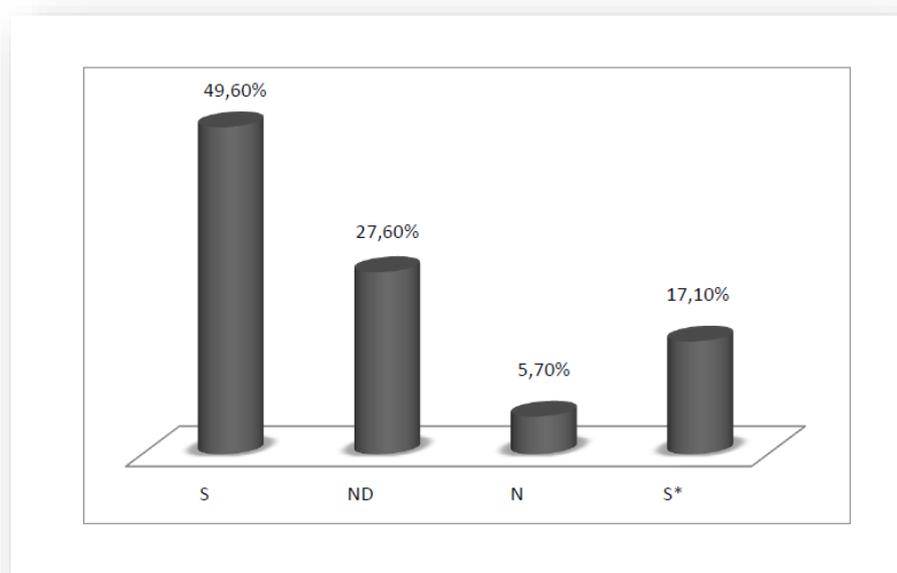
### **I.3. Produtos Naturais na Indústria Farmacêutica**

Os produtos naturais têm vindo a ser uma fonte de fármacos para a humanidade há milhares de anos. Os primeiros registos do uso de plantas como fonte de tratamento médico datam de 2600 AC, na Mesopotâmia. A Quinina foi o primeiro composto natural a ser isolado e comercializado por Caventou.<sup>26</sup> De acordo com a OMS, os cuidados de saúde primários de 80% da população do mundo são baseados em tratamentos medicinais tradicionais derivados de produtos naturais.<sup>27,28,29</sup>

Na investigação farmacêutica moderna as fontes naturais (tais como plantas e microrganismos) têm sido exploradas para identificar novos compostos.

Os produtos naturais têm sido a principal fonte de novas moléculas permitindo a descoberta de novos fármacos, por exemplo no tratamento de várias doenças infecciosas, distúrbios lipídicos, doenças neurológicas, cardiovasculares e metabólicas, doenças imunológicas e inflamatórias assim como doenças oncológicas.<sup>30,31,32,33,34</sup>

Dos compostos com atividade terapêutica aprovados em todo o mundo entre 1981 e 2006, apenas 5,7% eram produtos naturais e 27,6% eram moléculas derivadas de produtos naturais, enquanto que de 2005 a 2010, sete produtos naturais e doze derivados de produtos naturais foram aprovados para uso na prática clínica (Figura 3).<sup>35,36,37,38</sup>



**Figura 3.** Origem de pequenas moléculas em uso clínico de 1981 a 2006. S) Molécula totalmente sintética; ND) Molécula derivada de um produto natural; N) Produto natural; S\*) Síntese total, mas o farmacóforo é a partir de um produto natural. (Adaptado da literatura<sup>38</sup>).

Apesar dos dados promissores, as empresas farmacêuticas têm investido cada vez menos na investigação de produtos naturais ao longo da última década, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento da química combinatória.<sup>29,39,40</sup> Por outro lado, os produtos naturais também podem apresentar dificuldades em relação ao acesso e fornecimento, desencorajando assim a investigação deste tipo de compostos por parte das empresas farmacêuticas.<sup>41</sup> Outro fator que pode ter contribuído para a falta de interesse das companhias farmacêuticas em produtos naturais foi a introdução do *screening* de alto

rendimento na pesquisa para vários alvos moleculares definidos. Existem algumas bibliotecas de produtos naturais, mas as já existentes compilam as misturas de compostos com diferentes atividades e concentrações. Estes obstáculos à triagem e pesquisa de produtos naturais estão a ser resolvidos com a introdução de melhores técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) acoplada a espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) mais potente entre outras técnicas aprimoradas.<sup>33,39,41,42,43,44,45,46</sup>

Os produtos naturais derivam da biodiversidade. As múltiplas interações entre os organismos e o seu ambiente conduziram à formulação de diversos compostos químicos complexos,<sup>29</sup> estes costumam ter mais centros estereogénicos e uma maior complexidade estrutural (anéis aromáticos, sistemas de anel complexos, e maior grau de saturação da molécula) do que as moléculas sintéticas.<sup>35,47</sup>

Os produtos naturais contêm relativamente mais carbono, hidrogénio e oxigénio, e menos nitrogénio e outros elementos do que os compostos sintéticos.<sup>43</sup> Os produtos naturais têm, frequentemente, uma massa molecular superior a 500 Dalton e uma polaridade elevada (maior solubilidade em água).<sup>34</sup>

Apesar de todo este conhecimento apenas 10% da biodiversidade do mundo tem sido explorada para descobrir novos compostos naturais biologicamente ativos. Contudo, novas fontes de produtos naturais já estão a ser estudadas, tais como microorganismos marinhos e pequenos organismos.<sup>35,42,44,45,46,48</sup>

### **1.3.1. Produtos Naturais e Antibacterianos**

As plantas são importantes na manutenção da qualidade de vida e saúde, por conterem substâncias bioativas com propriedades terapêuticas e constituírem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos.

Recentemente, tem vindo a aumentar o interesse pelo uso de plantas medicinais, particularmente como agentes bacterianos, devido ao crescente desenvolvimento da resistência aos antibióticos.

Novos compostos naturais com diversas estruturas foram isolados a partir de fontes vegetais (extratos brutos) e são considerados como protótipos para a química farmacêutica.

Várias são as preparações à base de plantas e extratos obtidos das mesmas, utilizados para avaliar a atividade antibacteriana, nomeadamente de: *Rosmarinus officinalis*,<sup>49</sup> *Salicaria lythrum*,<sup>50</sup> *Syzygium guineense*,<sup>51</sup> *Irvingia gabonensis*,<sup>52a</sup> *Newbouldia laevis*,<sup>53b</sup> entre outros.

As plantas produzem uma grande variedade de produtos naturais, com variadíssimas funções biológicas. Estas desempenham um papel muito importante devido à produção de compostos com origem no seu metabolismo secundário.<sup>54</sup> Entre esses compostos podemos encontrar os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são compostos voláteis, aromáticos, lipossolúveis em solventes orgânicos de baixa densidade, normalmente mais baixa que a da água. Na natureza, estes desempenham funções importantes na proteção da planta contra bactérias, vírus, fungos e insetos. Os óleos essenciais têm sido frequentemente estudados devido ao seu potencial no tratamento de muitas infeções.<sup>55</sup> Devido às suas propriedades bactericidas, fungicidas, farmacológicas e ao seu uso alimentar crescente, são cada vez mais utilizados.

Os óleos essenciais são misturas naturais que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em diversas concentrações e de um modo geral, apresentam dois a três componentes maioritários em elevadas concentrações (20-70%).<sup>56,57</sup> De entre todas as famílias de compostos existentes nos óleos essenciais, os terpenos constituem a família mais representativa e com a maior diversidade de compostos, com 50 000 já identificados.<sup>54</sup>

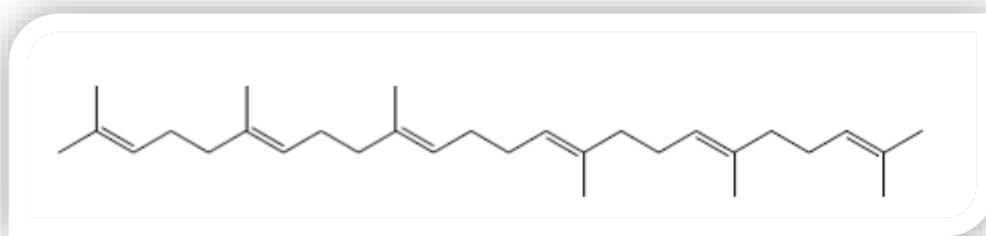
Os terpenos são hidrocarbonetos derivados de substâncias de origem vegetal e animal, e podem ser classificados de acordo com a sua estrutura básica e função.<sup>58</sup> Apresentam fórmula química geral  $(C_5H_8)_n$ , podendo ainda ser formados por combinações de várias unidades base de cinco carbonos (C5), denominados por isoprenos. Classificam-se segundo o número de unidades de isopreno de que se compõem, ou seja, são categorizados de acordo com o tamanho da família destes compostos e a nomenclatura evolui desde os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (>C40).<sup>54,57,59</sup> Embora sejam conhecidos alguns terpenos acíclicos, a maioria são cíclicos, possuindo estruturas carbonadas diversificadas. Um terpeno que contenha oxigénio na sua estrutura é denominado por terpenóide.<sup>57</sup>

## I.4. Triterpenóides Pentacíclicos

### I.4.1. Considerações Gerais

Os triterpenos, de fórmula molecular  $C_{30}H_{48}$ , cujas principais fontes naturais são os bálsamos e as resinas,<sup>60</sup> pertencem ao grupo dos terpenos, podendo apresentar um esqueleto de carbono acíclico ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra-, e penta- cíclicas.<sup>60,61</sup>

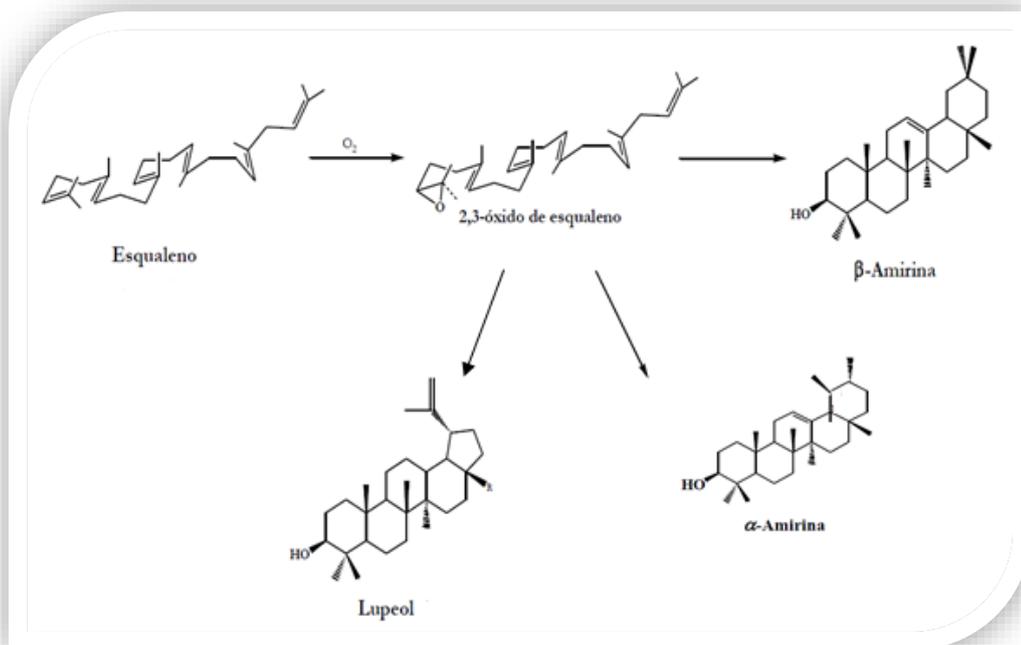
O esqualeno (figura 4) é o triterpeno mais simples dada a complexidade do seu esqueleto de carbono. Isolado pela primeira vez, a partir de óleo de fígado de peixe, pode ser encontrado em óleos vegetais e gorduras de mamíferos.<sup>62,63</sup> O esqualeno, um hidrocarboneto com 30 átomos de carbono, é um precursor do grupo de triterpenos.



**Figura 4.** Estrutura molecular do esqualeno, um precursor do grupo de triterpenos.

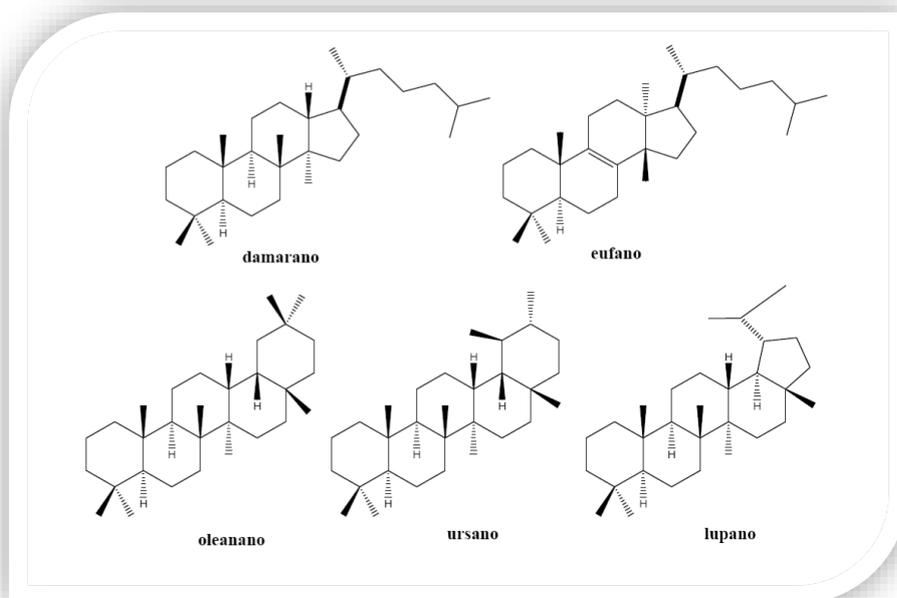
O diversificado universo de compostos leva a que os triterpenos possam ser classificados de variados modos. Usualmente são divididos em dois grupos principais: tetracíclicos e pentacíclicos.

A partir da conformação *cadeira-cadeira-cadeira-barco* do esqualeno e por ação de esqualeno ciclases, formam-se os triterpenos pentacíclicos do tipo oleanano ( $\beta$ -amirina), ursano ( $\alpha$ -amirina) e lupano (lupeol), (figura 5), entre outros,<sup>61,64,65,66</sup>



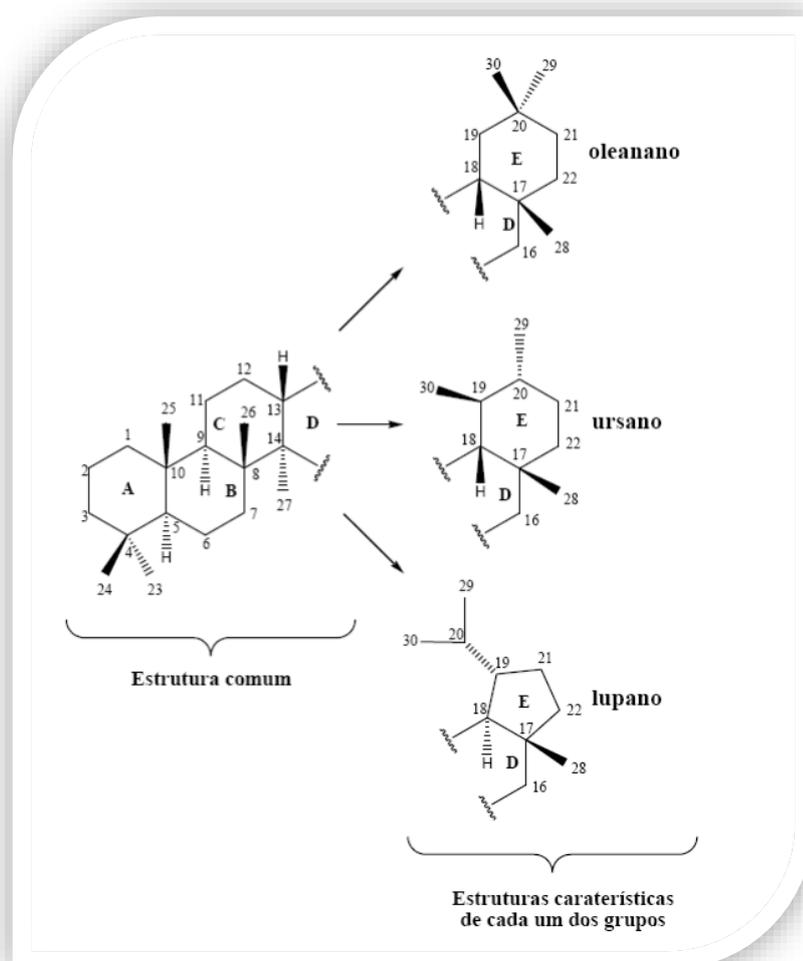
**Figura 5.** Sistemas de ciclicação do esqualeno em organismos eucariotas.

Na perspectiva da sua atividade biológica, presume-se que as estruturas triterpênicas mais importantes são aquelas que possuem os esqueletos de carbono do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos) (figura 6).<sup>67</sup>



**Figura 6.** Estruturas moleculares do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos).

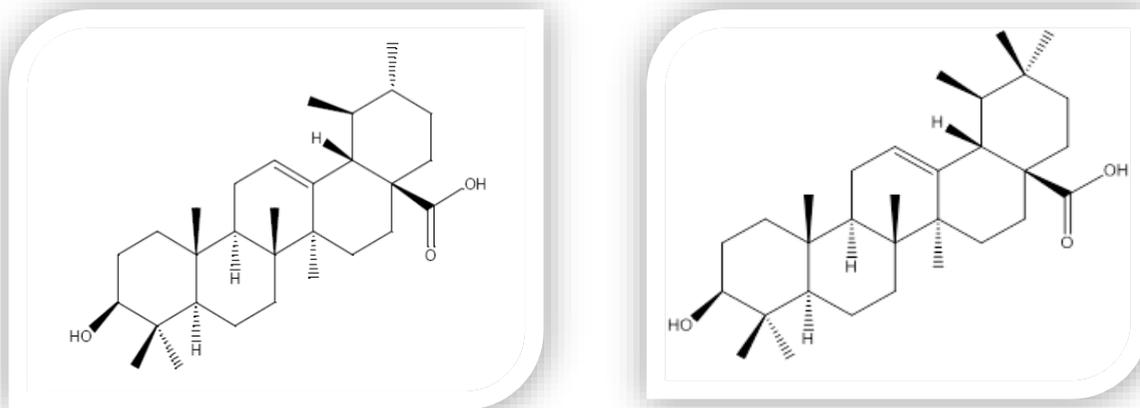
Os triterpenos pentacíclicos constituem uma classe de compostos que se encontra amplamente distribuída nas plantas, com diversas ações biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, como confirmado em estudos *in vitro* e *in vivo*.<sup>67</sup> Apresentam estruturas com trinta átomos de carbono e cinco anéis, (figura 7) e podem ser divididos em três grandes grupos: oleananos, ursanos e lupanos. Os dois primeiros (oleananos e ursanos) apresentam cinco anéis hexagonais, com uma estereoquímica dos anéis D/E *cis*, diferenciando-se, entre si, apenas, na posição dos seus grupos metilo: nos oleananos situam-se os dois em C20, enquanto nos ursanos um metilo encontra-se, também, em C20 mas o outro está em C19. Os lupanos, por outro lado, possuem uma estereoquímica *trans* dos anéis D/E, além de que o quinto anel é pentagonal.



**Figura 7.** Estruturas básicas dos três grandes grupos de triterpenos pentacíclicos.

### 1.4.2. Ácido Ursólico

O ácido ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-óico) isômero do ácido oleanólico, (Figura 8), está presente na natureza em vegetais e frutas.<sup>49,68,69</sup> Este triterpenóide pentacíclico possui atividades farmacológicas distintas e algumas delas semelhantes às apresentadas pelo seu isômero, o ácido oleanólico.



**Figura 8.** Estrutura química do ácido ursólico (à esquerda) e do ácido oleanólico (à direita).

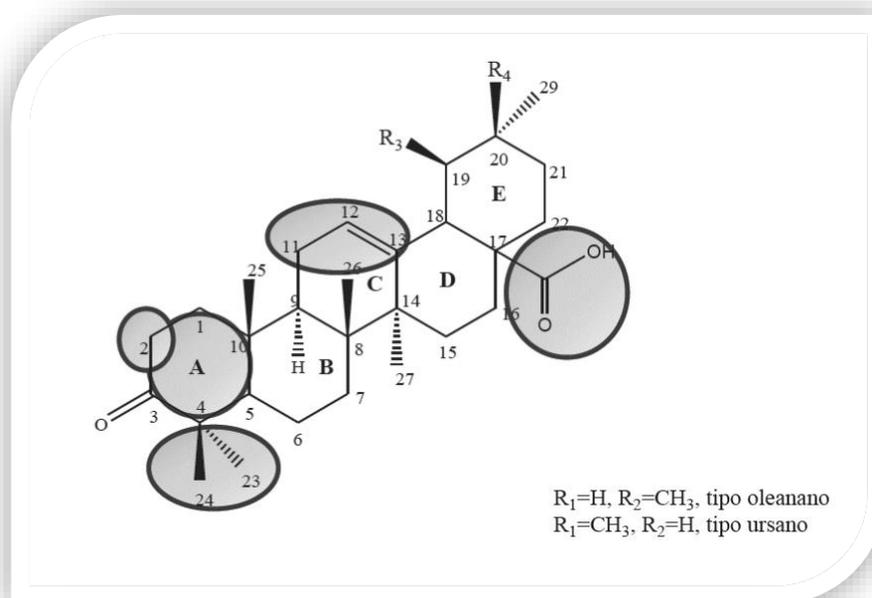
Durante a última década muitos estudos foram publicados, refletindo o grande interesse e progresso no entendimento da atividade biológica destes triterpenóides, incluindo o seu isolamento e purificação a partir de várias plantas, modificações químicas na sua estrutura, pesquisas farmacológicas e estudos toxicológicos.<sup>69</sup>

Dentre as inúmeras atividades biológicas atribuídas a estes triterpenóides, diferentes estudos relatam o seu potencial antioxidante,<sup>70</sup> ação anti-inflamatória,<sup>49,71,72,73</sup> o potencial antidepressivo,<sup>74</sup> atividade antitumoral,<sup>75,76</sup> e ainda o seu potencial antibacteriano,<sup>50,77a,78b,79,80</sup>

Por exemplo, a atividade antibacteriana destes triterpenóides foi reportada contra *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *estreptococos* resistentes à vancomicina.<sup>78b</sup> Também foi observado que a atividade biológica do ácido ursólico e oleanólico, comparativamente com outros triterpenóides, apresenta maior inibição do crescimento de microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus salivarius*.<sup>79</sup>

As propriedades farmacológicas dos triterpenóides são muito diversas todavia, a toxicidade devido às suas propriedades hemolíticas e citostáticas conduziu a que, paralelamente à extração e isolamento a partir de produtos naturais exista, atualmente, um número significativo de trabalhos na semi-síntese de novos derivados que apresentem menor toxicidade e uma maior atividade biológica.<sup>67</sup>

Estudos de relação estrutura-atividade têm demonstrado que modificações em determinados carbonos destes compostos podem conduzir a novos derivados significativamente mais ativos (Figura 9).<sup>81</sup>



**Figura 9.** Principais locais que conferem bioatividade aos derivados triterpenóides pentacíclicos do tipo oleanano e ursano (Adaptado da literatura<sup>81</sup>).

Os resultados apresentados em alguns trabalhos recentes têm vindo a refletir a importância de se proceder à síntese de derivados semi-sintéticos do ácido ursólico, de forma a maximizar o seu potencial biológico.<sup>82a,83b,84,85</sup>

## **2. Objetivos**

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

### **2.2. Objetivos específicos**

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Considerando que a emergência e propagação da resistência aos antibióticos constituem um grave problema de saúde pública a nível mundial e que novos compostos com atividade antibacteriana são necessários, o objetivo geral deste estudo foi a avaliação da atividade antibacteriana do ácido ursólico e derivados semissintéticos, assim como do ácido oleanólico, em modelos procariotas (bactérias Gram-positivos e Gram-negativos);

### 2.2. Objetivos específicos:

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- A síntese química de um derivado do ácido ursólico;
- A avaliação da atividade antibacteriana do ácido ursólico, dos seus derivados semissintéticos e do ácido oleanólico, por determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), com as estirpes de coleção *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (bacilos Gram-negativo) e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (cocos Gram-positivo), e ainda estirpes de origem clínica estudadas *S. aureus* M9907012 e M 98972 e *E. faecalis* M10207 e M99862BD, resistentes à metilina (MRSA, methicillin resistant *S. aureus*) e à vancomicina (VRE, vancomycin resistant *Enterococcus* sp.), respetivamente;
- Avaliar o efeito de compostos selecionados na taxa de crescimento bacteriano;
- Avaliar a citotoxicidade de compostos selecionados em células de mamífero, linha celular de macrófagos (RAW 264.7).



# **3. Materiais e Métodos**

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Compostos Químicos em Estudo**

##### 3.1.1. Ácido Ursólico e Derivados Semi-sintéticos

##### 3.1.2. Síntese Química do Composto 178 (Ácido 3 $\beta$ -Acetoxi-urs-12-en-28-óico)

##### 3.1.3. Preparação das Soluções de Trabalho dos Compostos

#### **3.2. Avaliação Biológica**

##### 3.2.1. Estirpes Bacterianas

##### 3.2.2. Reagentes

##### 3.2.2.1. Meios de Cultura e Preparação

##### 3.2.2.2. Outros reagentes e Equipamentos

##### 3.2.3. Avaliação da Atividade Antibacteriana

##### 3.2.3.1. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Técnica de Kirby-Bauer

##### 3.2.3.2. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Estudo de Sinergismo

##### 3.2.3.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória

##### 3.2.3.3.1. Método de Microdiluição em Placa

##### 3.2.3.4. Determinação da Concentração Mínima Bactericida

##### 3.2.3.5. Curva de Crescimento Bacteriano

##### 3.2.4. Avaliação da Citotoxicidade

##### 3.2.4.1. Teste de Redução do 4,5-dimetil-3-tiazolil-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

### 3. Materiais e Métodos

O trabalho experimental foi dividido em quatro etapas:

- I. Numa primeira etapa foram selecionados vários compostos derivados do ácido ursólico que apresentaram atividade biológica. Foi ainda sintetizado um outro derivado do ácido ursólico;
- II. Numa segunda etapa foi feito um *screening* da atividade antibacteriana dos vários compostos selecionados pelo método de difusão em disco (avaliação qualitativa), e foram ainda determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI), através do método de microdiluição em placa e por fim, determinada a concentração mínima bactericida (CMB) (avaliação quantitativa);
- III. Numa terceira etapa foram feitas curvas de crescimento bacteriano na presença e na ausência de compostos químicos selecionados de acordo com a sua melhor atividade antibacteriana;
- IV. Por fim foi avaliada a citotoxicidade dos compostos, pelo teste de MTT, em células de mamífero, linha celular de macrófagos (RAW 264.7).

#### 3.1. Compostos Químicos em Estudo

##### 3.1.1. Ácido Ursólico e Derivados Semi-sintéticos

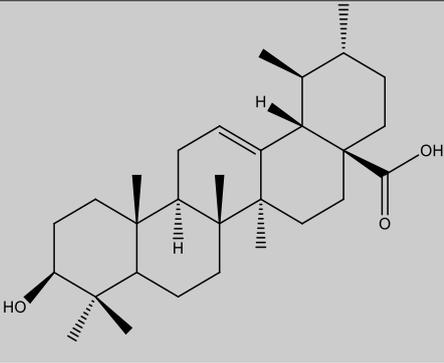
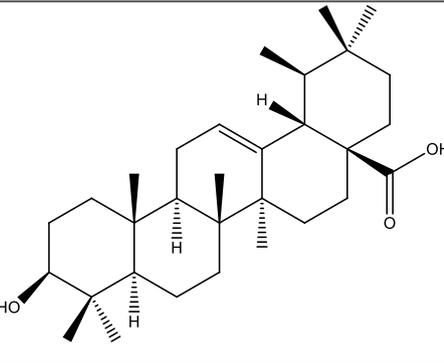
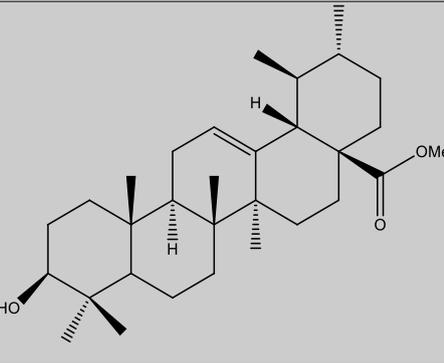
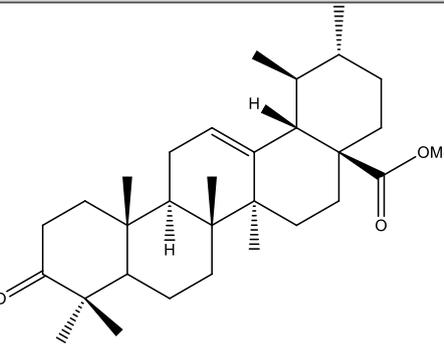
Os triterpenos pentacíclicos apresentam uma base esqueleto que fornece uma grande quantidade de estruturas de derivados porque diferentes posições sobre o esqueleto podem ser substituídas. Como resultado, existiam até ao ano de 2006 pelo menos 4000 triterpenos pentacíclicos conhecidos,<sup>67</sup> que exibem um largo espectro de atividades biológicas.<sup>86</sup>

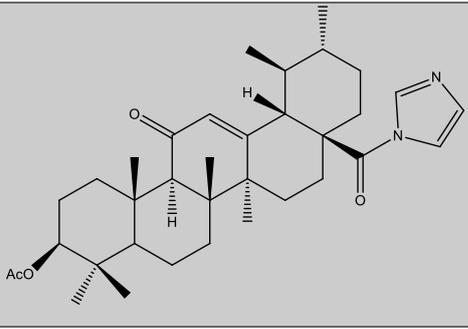
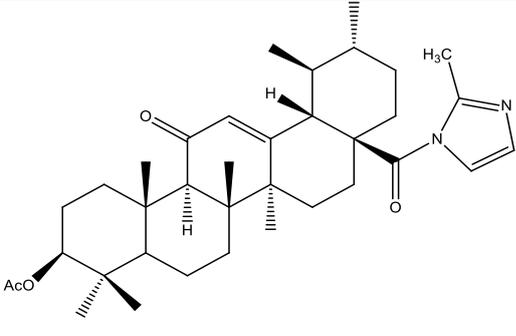
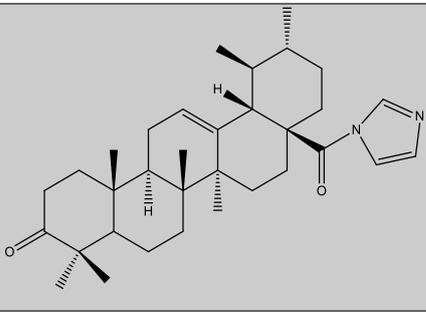
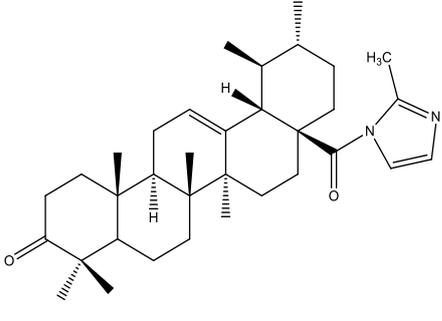
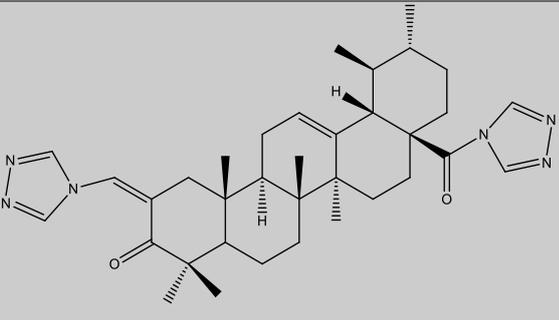
Como descrito anteriormente, o ácido ursólico possui atividades farmacológicas distintas. Segundo Ana Leal [et.al],<sup>82</sup> vários compostos derivados do ácido ursólico apresentam atividade antitumoral. Desta forma, foram testados esses compostos também em bactérias de modo a verificar se também apresentavam atividade antibacteriana.

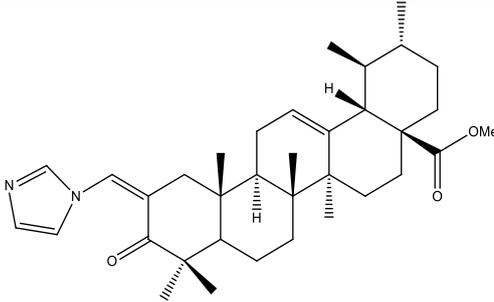
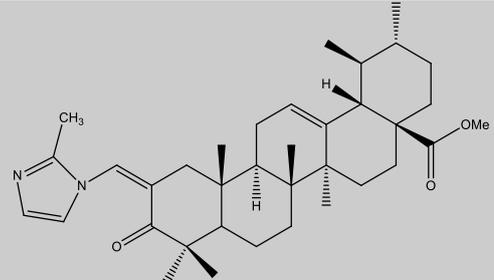
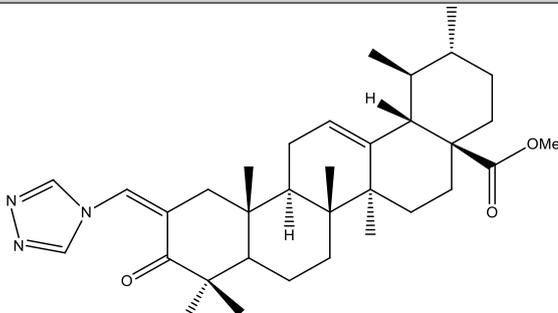
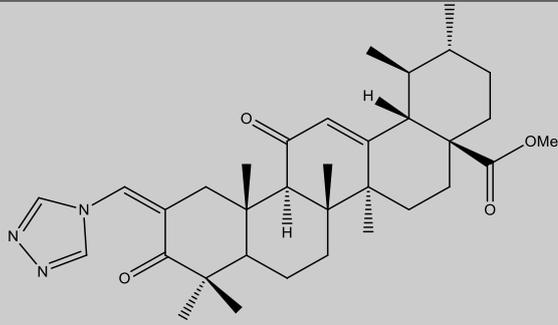
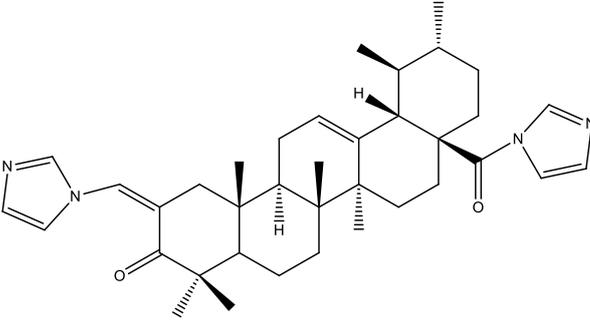
Foram testados no total 16 compostos químicos, sendo 15 destes fornecidos pelo Prof. Doutor Jorge Salvador do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, nomeadamente o ácido ursólico (AU) e o ácido oleanólico

(AO), dois derivados semi-sintéticos do ácido ursólico (1 e 2), quatro N-acilimidazóis (3, 4, 5 e 6) e sete N-alquilimidazóis (7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13). O nome e a respetiva estrutura química dos compostos encontram-se na Tabela 1.

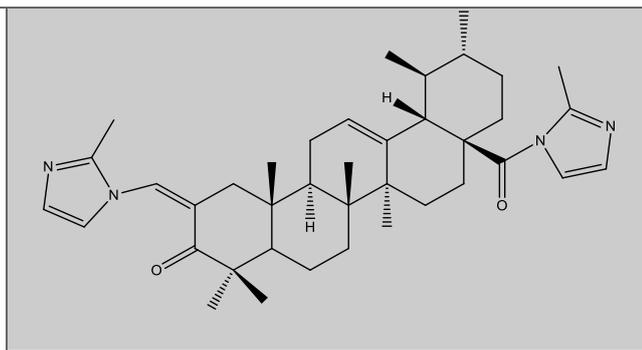
**Tabela 1.** Nome dos diferentes compostos testados e respetiva estrutura química. (AU, ácido ursólico; AO, ácido oleanólico).

Compostos	Estruturas
<p>Ácido 3<math>\beta</math>-hidroxi-urs-12-en-28-óico (AU)</p>	
<p>Ácido 3<math>\beta</math>-hidroxi-olea-12-en-28-óico (AO)</p>	
<p>Acetato de metil 3<math>\beta</math>-hidroxi-urs-12-en-28 (1)</p>	
<p>Acetato de metil 3-óxido-12-en-28 (2)</p>	

<p>3<math>\beta</math>-Acetoxi-11-<math>\acute{o}</math>xido-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato (3)</p>	
<p>3<math>\beta</math>-Acetoxi-11-<math>\acute{o}</math>xido-12-en-28-il-20-metil-1H-imidazol-1-carboxilato (4)</p>	
<p>3-<math>\acute{O}</math>xido-12-en-28-il-1H-imidazol-1-carboxilato (5)</p>	
<p>3-<math>\acute{O}</math>xido-12-en-28-il-20-metil-1H-imidazol-1-carboxilato (6)</p>	
<p>28-(4H-Triazol-4-il)-3,28-di<math>\acute{o}</math>xido-12-en-2-(4H-triazol-4-il)-metileno (7)</p>	

<p>Acetato de metil 2-(1H-imidazol-1-il)-metileno-3-óxido-12-en-28 (8)</p>	
<p>Acetato de metil 2-(2'-metil-1H-imidazol-1-il)-metileno-3-óxido-12-en-28 (9)</p>	
<p>Acetato de metil 2-(4H-triazol-4-il)-metileno-3-óxido-12-en-28 (10)</p>	
<p>Acetato de metil 2-(4H-triazol-4-il)-metileno-3,11-dióxido-12-en-28 (11)</p>	
<p>28-(1H-Imidazol-1-il)-3,28-dióxido-12-en-2-(1H-imidazol-1-il)-metileno (12)</p>	

28-(2'-Metil-1H-imidazol-1-il)-  
 il)-3,28-dióxido-12-en-2-  
 (2'-metil-1H-imidazol-1-il)-  
 metileno  
 (13)



Foi ainda sintetizado um composto derivado do ácido ursólico, o composto 14.

Estes compostos derivados do ácido ursólico diferem deste, por apresentarem grupos substituintes (grupo acetato, metil, carbonilo, imidazol) em uma ou mais posições da molécula.

### 3.1.2. Síntese Química do Composto 14 (Ácido 3 $\beta$ -Acetoxi-urs-12-en-28-óico)

A preparação do composto 14 foi feita tendo por base o protocolo descrito em<sup>87,88</sup>.

Ao **composto AU** (150 mg; 0,328 mmol) em 15 ml de Tetraidrofurano (THF) à temperatura ambiente, foi adicionado anidrido acético (0,07 mL; 0,656 mmol) e 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) (10% da massa inicial de **AU**). Após 24 horas foi adicionado mais anidrido acético (0,018 mL; 0,164mmol). Depois de 3 horas, foi removido o solvente sob pressão reduzida, a mistura da reação foi dispersa em 20 mL água. A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3x75 mL) e de seguida, a fase orgânica foi acidificada com ácido clorídrico (HCl) 10% (2x50mL). Foi adicionado 20 mL de água à fase orgânica até que o pH fosse 7 e depois foi lavada com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (4x50 mL) e seca em sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O resultante foi filtrado e evaporado até secar, obtendo-se um sólido. O sólido foi então purificado por coluna cromatográfica [éter de petróleo/acetato de etilo (10:1)] obtendo-se um sólido branco (188 mg, 0,377 mmol, 87%).

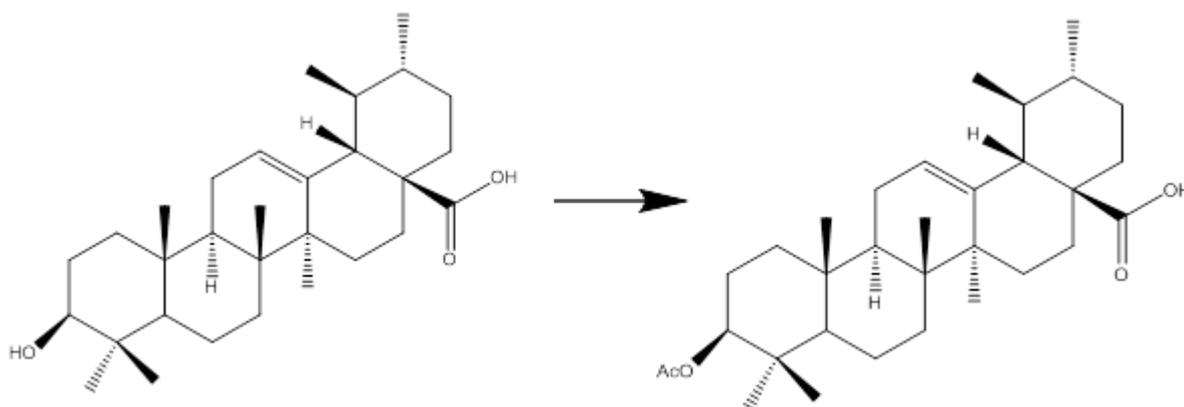
**Espectro  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta$  5.23 (1H t  $J=6.00$ ),  $\delta$  4.50 (1H dd  $J=12.50$ ),  $\delta$  2,16 (1H d  $J=11.60$ ),  $\delta$  2.04 (3H s),  $\delta$  1.07 (3H s),  $\delta$  0.96 (3H s),  $\delta$  0.86 (6H s),  $\delta$  0.85 (3H s),  $\delta$  0.77 (3H s).

**Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):**

$\delta$  183.29 (C28), 170.87 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 137.78 (C13), 125.56 (C12), 80.77 (C3).

A reação descrita anteriormente está representada na figura 10.



**Figura 10.** Esquema da reação química de síntese do composto 14 a partir do ácido ursólico.

### 3.1.2. Preparação das Soluções de Trabalho dos Compostos

Todos os compostos foram dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final da solução de trabalho foi de 1mg/mL. Os compostos 12 e 13 não se dissolveram completamente em DMSO e por isso, inicialmente, foram dispensados da primeira fase de *screening*.

## 3.2. Avaliação Biológica

### 3.2.1. Estirpes Bacterianas

Neste estudo foram usadas quatro estirpes bacterianas, duas Gram-positivo e duas Gram-negativo, tendo em conta a elevada prevalência de infeções causadas por essas bactérias e/ou a elevada prevalência de resistências aos antibióticos nessas bactérias a nível local e global.

Assim, na avaliação da atividade antibacteriana usaram-se estirpes da American Type Culture Collection (ATCC), nomeadamente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Estas encontravam-se preservadas a -80°C no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. As estirpes de origem clínica estudadas foram *S. aureus* HUC 1 e HUC 2 e *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4, metilina (MRSA) e vancomicina (VRE) resistentes, respetivamente, e foram disponibilizadas pelo Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC). Foram preservadas em meio Tripticase-soja (TS) com 15% de glicerol a -80°C (tabela 2).

**Tabela 2.** Modelos bacterianos selecionados para avaliar a atividade antibacteriana dos compostos.

#### Modelos bacterianos

Gram-negativos	<i>E. coli</i> ATCC 25922
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Gram-positivos	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
	<i>S. aureus</i> HUC 1
	<i>S. aureus</i> HUC 2
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
	<i>E. faecalis</i> HUC 3
	<i>E. faecalis</i> HUC 4

Para a realização dos ensaios, as estirpes foram descongeladas e cultivadas em meio sólido Trypticase-soja (TS) e incubadas a 37°C durante 18-24 h, e foram mantidas no laboratório em tubos de meio TS para posterior utilização. Nos ensaios foram usadas culturas de 18-24h de incubação.

### **3.2.2. Reagentes**

#### **3.2.2.1. Meios de Cultura e Preparação**

A sobrevivência e a conservação dos microrganismos dependem do fornecimento adequado de nutrientes e convenientes condições para o seu crescimento. Quanto aos nutrientes, grande parte dos microrganismos apenas necessita de um conjunto de substâncias formuladas de maneira adequada, capazes de promover o seu crescimento. Os meios de cultura são utilizados com esse propósito, o de fornecer condições ideais mínimas para o seu cultivo do posto de vista nutricional.<sup>89</sup>

Os meios de cultura são líquidos, semi-sólidos ou sólidos. Um meio líquido sem agente solidificante é designado por caldo nutritivo. Quando se deseja o crescimento das bactérias em meio semi-sólido ou sólido, um agente solidificante, usualmente o agar, é adicionado ao meio.<sup>90</sup> O agar é um extrato de algas marinhas que contém maioritariamente galactose e possui muito pouco valor nutritivo. É muito utilizado como agente solidificante porque se liquefaz a cerca de 100 graus Celcius (°C), (o ponto de liquefação é aos 96°C) mantendo-se nesse estado fundido até cerca dos 42°C quando passa a gel sólido.<sup>89,90</sup> Devido a estas propriedades, os microrganismos podem ser cultivados a temperaturas na ordem dos 37°C sem receios de liquefação do meio. Os meios de cultura sólidos são preparados da mesma forma que os meios líquidos, exceto pela adição de agar, normalmente, a uma concentração de cerca de 1,5% antes da esterilização. Os meios de cultura sólidos imobilizam as bactérias, permitindo que elas cresçam e originem colónias isoladas e visíveis, ou seja, culturas puras.<sup>91</sup>

Para além das necessidades nutritivas, vários outros fatores ambientais precisam ser controlados para o sucesso da cultura dos microrganismos como por exemplo o pH, a temperatura, a atmosfera e a pressão osmótica.

Para a realização dos testes de suscetibilidade aos antibacterianos, os meios em pó foram reconstituídos e autoclavados de acordo com as indicações do fabricante. Os meios de cultura sólidos foram distribuídos em placas de Petri e armazenados a 4°C após solidificação. Quanto aos meios de cultura líquidos, após reconstituição, foram distribuídos em tubos de ensaio e matrizes, e seguidamente foram autoclavados (121°C/15 min) de acordo com as indicações do fabricante. Posteriormente, foram armazenados a 4°C.

Os meios de cultura usados foram:

***Soyabean Casein Digest Agar*** ou meio Trypticase-soja, HiMedia Laboratories, referência M290 - O meio de cultura TS é um meio de cultura sólido rico em nutrientes, bastante utilizado para o crescimento e isolamento de diversos tipos de microrganismos. O seu conteúdo em peptona constitui uma importante fonte de azoto, o que permite o crescimento abundante de um grande número de microrganismos. A glicose é a fonte de energia e o cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico.<sup>92,93</sup>

Composição: Peptona de caseína (15 g/L), Peptona de soja (5g/L), Cloreto de sódio (5 g/L) e Agar (15 g/L); pH 7.3±0.2 a 25°C.

Preparação: Suspender 40 gramas num litro de água destilada. Aquecer até à ebulição para dissolver completamente o meio. Esterilizar na autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Depois de arrefecer misturar bem e distribuir em placas de Petri ou tubos de ensaio.

**Meio de Agar Mueller-Hinton (MH)**, HiMedia Laboratories, referência M173 – É um meio de cultura sólido utilizado em procedimentos normalizados e recomendado para ensaios de suscetibilidade aos antibacterianos (método de difusão em disco).<sup>94,95</sup> Neste meio, crescem bem a maioria das bactérias patogénicas e a sua composição não interfere com a atividade e difusão dos antibióticos.

Composição: Infusão desidratada de carne (300 g/L), caseína hidrolisada (17.5 g/L) e amido (1,5 g/L) e agar (17 g/L); pH 7.3 ± 0,1 a 25°C.

Preparação: Suspender 38 gramas num litro de água destilada. Aquecer até à ebulição para dissolver completamente o meio. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Misturar bem antes de verter pelas placas de Petri.

**Meio de Caldo Mueller- Hinton (Caldo MH)** (Marca Oxoid microbiology products, Código: CM0405) – É um meio de cultura líquido utilizado em procedimentos normalizados reconhecidos internacionalmente e recomendado para testes de suscetibilidade antibacteriana.<sup>94</sup>

Composição: Infusão desidratada de carne (300 g/L), caseína hidrolisada (17.5 g/L) e amido (1,5 g/L); pH 7.3 ± 0,1 a 25 °C.

Preparação: Colocar 21g num litro de água destilada e agitar até se dissolver completamente, posteriormente esterilizar por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos.

### 3.2.2.2. Outros reagentes e Equipamentos

Neste estudo foi também utilizada água destilada autoclavada, micropipetas *Orange Scientific* e Transferpette® (10, 100, 200 e 1000 µL), discos em branco (Liofilchem®, Itália), discos de antibióticos (Oxoid, UK), nomeadamente Ciprofloxacina 5 µg, Gentamicina 30 µg e Amoxicilina/Ácido clavulânico 30 µg, placas de Petri, pinças, ansas estéreis, *Eppendorfs* estéreis e microplacas *Orange Scientific*. Foram ainda utilizadas cuvettes estéreis e matrizes.

Quanto aos equipamentos, foram utilizados: a autoclave *SANYO electric MLS – 3020 V* (Japão), o espectrofotómetro *Thermo Fisher Scientific Genesys 10 UV*, a incubadora Shaker *Burgwedel* Tipo 1083 (Alemanha), o Densitómetro McFarland *Biosan SAI* tipo Den-1B, a câmara de fluxo laminar *Faster BH-EN2005* e a balança eletrónica *Ohaus Corp. Pioneer™*.

### 3.2.3. Avaliação da Atividade Antibacteriana

#### 3.2.3.1. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido - Técnica de Kirby-Bauer

Inicialmente, os ensaios de suscetibilidade aos diferentes antibióticos e compostos foram realizados pelo método de difusão em disco, em meio MH, com base no método de Kirby-Bauer,<sup>96</sup> e de acordo com os procedimentos adaptados do Clinical and Laboratory Standards Institute.<sup>97</sup>

Trata-se de um método prático, amplamente utilizado nos laboratórios de microbiologia para bactérias de crescimento rápido, apresentando uma grande flexibilidade na escolha do

número e do tipo de composto a utilizar. O método adaptado consiste na difusão em MH do composto depositado no disco estéril de papel-de-filtro. A ocorrência de um efeito antibacteriano observa-se pela formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano.<sup>95</sup>

O método de difusão agar, realizado pela técnica de Kirby-Bauer, é um método qualitativo e foi utilizado de forma a avaliar se os isolados eram classificados de susceptível, de intermédio ou resistente aos diferentes antibióticos utilizados.<sup>95</sup>

A suscetibilidade aos agentes antibacterianos foi determinada com os seguintes discos de antibióticos padrão: Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) e Ciprofloxacina (CIP 5 µg), um β-lactâmico, um aminoglicosídeo e uma quinolona, respetivamente.

A técnica de difusão em agar com discos de antibióticos iniciou-se com a preparação do meio de cultura, seguida de preparação de uma suspensão bacteriana, inóculo, e por fim inoculação da placa e posterior incubação.

Preparação do meio MH: descrito anteriormente.

Preparação do inóculo: semeou-se uma colónia, proveniente de uma placa com cultura pura, em TS e incubou-se a 35°C, durante 18 a 24 horas. Desta placa, recolheram-se 2 a 3 colónias para 5 mL de soro fisiológico estéril a fim de se obter uma turvação equivalente a 0.5 da escala de McFarland.

Inoculação da placa: mergulhou-se uma zaragatoa esterilizada na suspensão bacteriana e posteriormente inoculou-se a superfície de uma placa de MH pela técnica em toalha. Após a secagem do inóculo, aplicaram-se os discos de antibióticos padrão ou discos estéreis com 15 µL de composto (máximo volume que o disco absorve), a uma concentração de 1 mg/mL, com o auxílio de uma pinça, sobre a superfície do meio de cultura (até ao máximo de 5 discos por placa). Foi utilizado como controlo negativo um disco estéril com 15 µL de DMSO. Consecutivamente incubaram-se as placas a 35°C durante aproximadamente 18 a 24 horas, e por fim, com o auxílio de uma craveira, mediram-se os diâmetros dos halos de inibição, em milímetros, para cada composto, e foram seguidamente interpretados segundo as normas do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.<sup>98</sup>

### 3.2.3.2. Método de difusão em disco em meio sólido - Estudo de sinergismo

O efeito sinérgico da associação de antibióticos com extratos de plantas contra agentes patogênicos leva a novas opções para o tratamento de doenças infecciosas. Desta forma a terapia de antibiótico combinado com compostos derivados de plantas pode produzir efeitos promissores no tratamento da infecção bacteriana.<sup>99,100</sup>

O estudo do efeito sinérgico foi executado pelo método de difusão agar realizado pela técnica de Kirby-Bauer, descrito anteriormente. Os discos de antibióticos padrão utilizados foram Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg) e Gentamicina (CN 30 µg).

Toda a metodologia deste estudo foi semelhante à anterior, excetuando que após a secagem do inóculo, aplicaram-se os discos de antibióticos padrão com 15 µL de cada composto, a uma concentração de 1 mg/mL. Foi utilizado como controlo negativo disco com uma quantidade de 15 µL de DMSO.

### 3.2.3.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) é definida como a concentração mínima de antibiótico necessária para inibir o crescimento visível de um determinado microorganismo após uma incubação durante a noite.<sup>5</sup>

Os testes de suscetibilidade são frequentemente indicados quando se pensa que o organismo em causa pertence a uma espécie capaz de exibir resistência aos antimicrobianos usualmente utilizados.<sup>101</sup>

Desta forma a determinação das CMIs permite-nos um estudo quantitativo dado que quanto menor a CMI, maior a potência do antibiótico e, quanto maior a potência, maior a dificuldade da bactéria desenvolver resistência. A determinação da CMI pode ser feita pelo método de microdiluição em placa, em que são efetuadas sucessivas diluições do antibiótico em estudo (1:2) a fim de se determinar a CMI.<sup>102</sup>

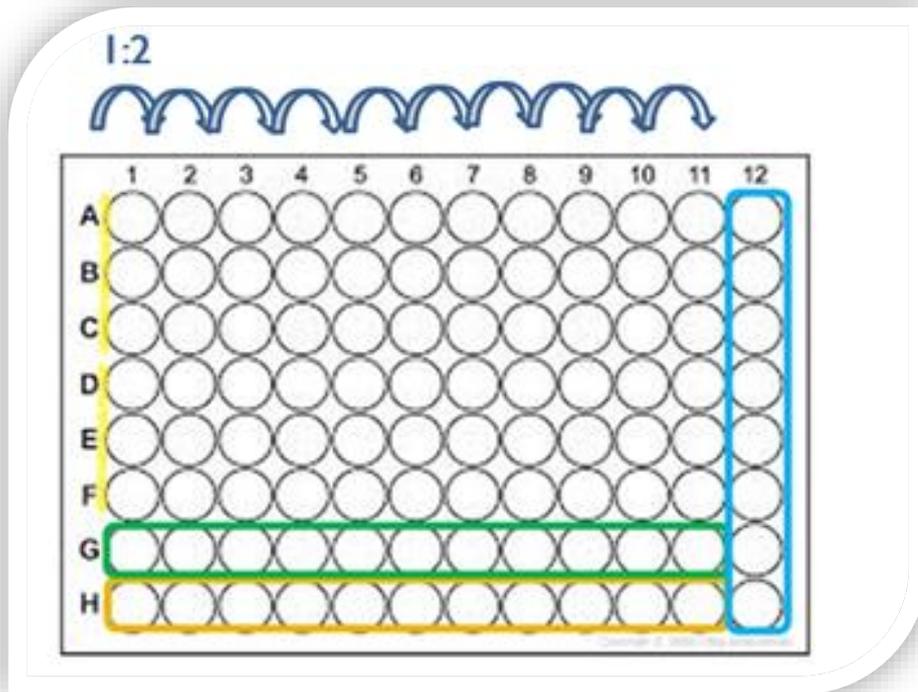
### 3.2.3.3.1. Método de Microdiluição em Placa

A suscetibilidade aos antibióticos foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo MH com uma placa estéril de 96 poços, segundo as normas de CLSI.<sup>101</sup>

Primeiramente, preparou-se uma suspensão de cada estirpe em estudo a partir de 2 a 3 colônias puras para 5 mL de soro fisiológico esterilizado, de forma a alcançar um padrão de turvação equivalente ao padrão de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

As diluições foram feitas em caldo MH, sendo pipetados inicialmente, 100  $\mu$ L de caldo MH em toda a placa e posteriormente 100  $\mu$ L dos diferentes compostos em estudo apenas no primeiro poço. Seguidamente, efetuou-se uma diluição de 1:2, retirando 100  $\mu$ L do primeiro poço para o segundo, e assim sucessivamente, e depois foram adicionados 10  $\mu$ L do inóculo anteriormente preparado. Foram utilizados três controlos: o controlo de esterilidade com 100  $\mu$ L de caldo MH; o controlo de crescimento positivo, 100  $\mu$ L de caldo MH e 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana e, por fim, o controlo positivo com DMSO, com 100  $\mu$ L de caldo MH, 100  $\mu$ L de DMSO e 10  $\mu$ L suspensão bacteriana (figura 11). Por último, as placas foram fechadas e incubadas na estufa a 35°C durante 18 a 24 horas. Após este período, efetuou-se a leitura dos resultados, observando a presença ou ausência de turvação, que indica a presença ou ausência de crescimento, respetivamente. A menor concentração de composto com o qual se observou ausência de turvação corresponde à CMI.

Para cada composto o ensaio foi feito em triplicado e reproduzido, pelo menos, em dois ensaios independentes.



**Figura 11.** Método de microdiluição em placa para avaliação da suscetibilidade antibacteriana. Ensaio feito em triplicado (Amarelo ABC e CDE), com diluições de 1:2 da esquerda para a direita e três controlos (Verde – controlo de esterilidade, Amarelo – controlo positivo e Azul – controlo de crescimento).

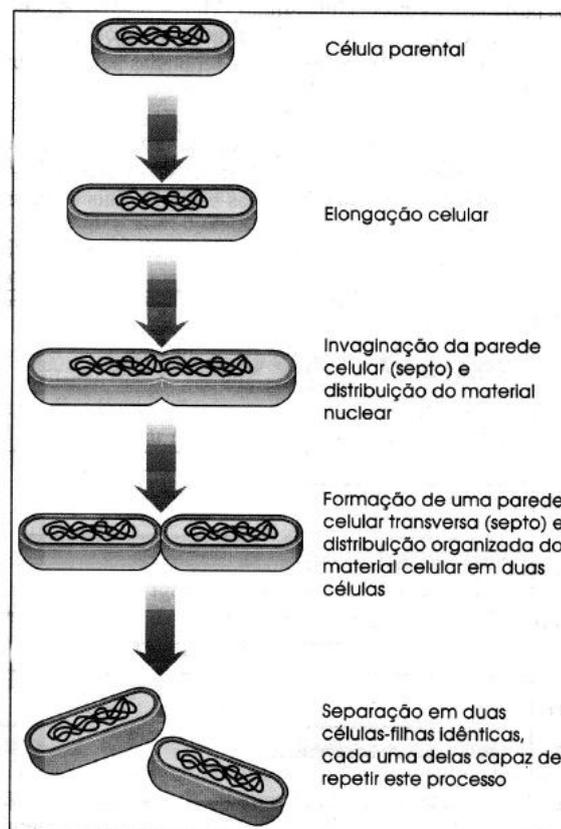
#### 3.2.3.4. Determinação da Concentração Mínima Bactericida

Para completar o estudo da CMI realizou-se ainda um ensaio “*in vitro*” complementar a este. O objetivo deste ensaio foi determinar se os compostos tinham um efeito bactericida ou bacteriostático. Conhecido como CMB, este ensaio determina a concentração mínima de agente antimicrobiano que impede o crescimento de qualquer microrganismo após o plaqueamento num meio sólido.<sup>5</sup>

Procedeu-se à sementeira, em meio MH, de uma alíquota de 20 µL do inóculo presente no poço da microplaca considerado como CMI e do poço logo a seguir a este (ou mais). Após o plaqueamento, as placas foram deixadas a incubar na estufa a 35°C durante 18 a 24 horas para confirmar se existe ou não crescimento bacteriano. Se no poço da CMI não ocorrer crescimento considera-se que o composto tem um efeito bactericida sendo a CMI igual à CMB enquanto que se houver crescimento considera-se que o composto apresenta um efeito bacteriostático.

### 3.2.3.5. Curva de Crescimento Bacteriano

Representar graficamente as populações resultantes do crescimento de culturas bacterianas é essencial em Microbiologia, portanto, uma das abordagens mais comuns no estudo do crescimento bacteriano é a obtenção de curvas de crescimento.<sup>90</sup> O termo crescimento, tal como é frequentemente aplicado às bactérias e a outros microrganismos, refere-se, usualmente, ao aumento do número de bactérias e não a um aumento no tamanho das células individuais.<sup>90,91,103</sup> Este crescimento da população celular é, por sua vez, consequência do aumento do número de células devido à multiplicação celular. As bactérias reproduzem-se normalmente por fissão binária (figura 12).<sup>90,91,103</sup> A reprodução por fissão binária consiste na divisão de uma célula em duas por mitose, cada uma com o mesmo genoma da “célula-mãe”. Após a replicação do cromossoma bacteriano a parede transversa forma como que uma invaginação da membrana plasmática e da parede celular, seguidamente, ocorre a separação gerando-se duas células idênticas, cada uma capaz de se dividir e repetir este processo, ao fim de um determinado tempo.<sup>90,91,103,104</sup>



**Figura 12.** Multiplicação bacteriana por fissão binária. (Adaptado da literatura<sup>104</sup>).

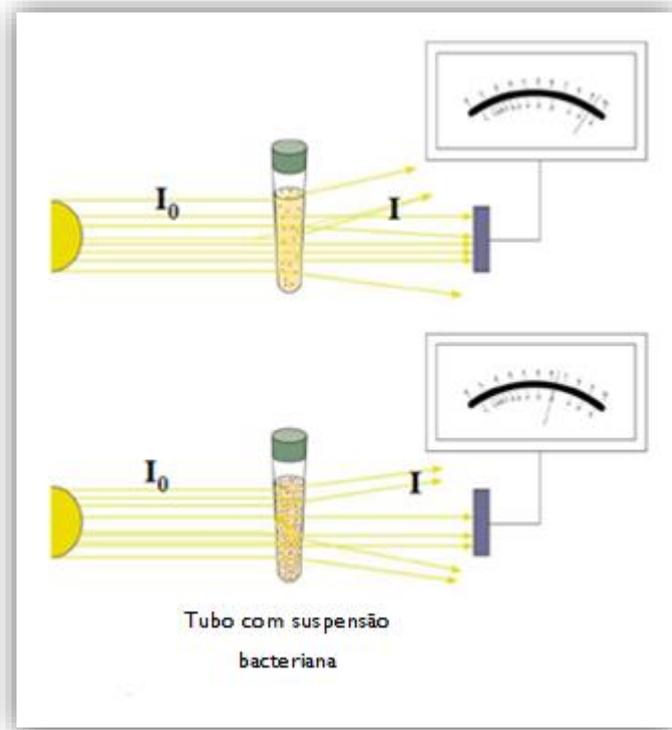
Nas bactérias a avaliação do crescimento bacteriano é, normalmente, feita através da determinação da concentração celular pelo método de determinação de biomassa em suspensão (em determinados intervalos de tempo), ou da determinação do número de células viáveis presentes na população (método de determinação do número de UFC).<sup>105</sup> Não há método perfeito, ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens. A escolha do método depende da situação particular que se apresente.

Neste estudo recorreu-se ao método de determinação da biomassa em suspensão, por ser um método simples e rápido.<sup>91</sup>

Neste método, para a construção de uma curva de crescimento bacteriano, mede-se o aumento da massa celular total de uma cultura bacteriana em crescimento, em meio líquido, através de medidas da densidade óptica (DO) da cultura, que determina a biomassa em suspensão.

Para determinar a biomassa em suspensão recorre-se à análise espectrofotométrica por leitura de DO da cultura (figura 13). Este método consiste na determinação da quantidade de luz que é transmitida através da cultura líquida. À medida que as bactérias se multiplicam o meio torna-se cada vez mais turvo reduzindo a quantidade de luz transmitida. A quantidade de luz que chega ao detetor é inversamente proporcional ao número de bactérias, sendo assim, pode-se concluir que quanto maior for o número de bactérias, maior será o valor de DO.<sup>90,91</sup>

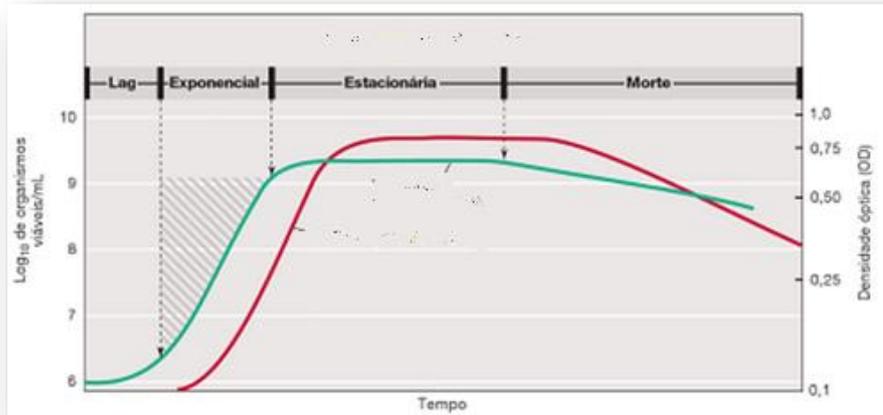
Cada medida obtida corresponde à DO da cultura num dado momento do crescimento. A evolução do crescimento bacteriano é seguida por leituras de DO a 600 nm realizadas num espectrofotómetro (alíquotas da cultura em crescimento são retiradas em determinados intervalos de tempo e mede-se a absorvância). O branco é o meio de cultura utilizado, sem inóculo. Desta forma pode-se construir um gráfico representativo do progresso do crescimento, relacionando-se a DO com o tempo.



**Figura 13.** Determinação espectrofotométrica da densidade celular.

Esta técnica apresenta diversas vantagens como a simplicidade da metodologia, as medidas são prontamente obtidas, o padrão de crescimento da população bacteriana em estudo é reconhecido (as diferentes fases do crescimento bacteriano podem ser visualizadas em gráfico); permite estabelecer comparações do padrão de crescimento de diferentes populações bacterianas, assim como comparar o padrão de crescimento sob diferentes condições ambientais; a quantidade de material utilizado é reduzida e a introdução de erros experimentais pelo operador é menor. No entanto, é de salientar que esta técnica não permite a determinação de células viáveis, ou seja, não é possível a estimativa do número de células/mL da população; Para além disso apresenta a desvantagem das células inviáveis, fragmentos de células mortas e material difundido no meio de cultura interferirem na obtenção dos resultados.<sup>90,91</sup>

A avaliação quantitativa do crescimento bacteriano é, experimentalmente, representada através de uma curva de crescimento da população bacteriana (Figura 14). Esta curva é constituída pelas várias fases de crescimento microbiano: fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio.



**Figura 14.** Representação gráfica de uma curva de crescimento bacteriano. (Adaptado de<sup>91</sup>).

A fase de latência corresponde ao período inicial, após a inoculação num meio de cultura, em que ocorre a adaptação do microrganismo ao meio. É um período onde o número de microrganismos permanece praticamente inalterado, este intervalo de tempo pode ser breve ou longo, dependendo do histórico do inóculo e das condições de crescimento. Esta fase ocorre porque as células encontram-se desprovidas de vários constituintes essenciais, requerendo tempo para a sua biossíntese.<sup>91</sup> Ocorre a absorção dos nutrientes presentes no meio, há, essencialmente, a produção de enzimas necessárias à síntese de compostos essenciais ao crescimento ou à hidrólise de compostos presentes.

A fase exponencial corresponde à fase de crescimento progressivo e exponencial do microrganismo, ou seja, é o período marcado pela divisão celular com duplicação do número de células, após um determinado intervalo de tempo, conhecido como tempo de geração ( $g$ ) (tempo necessário para que uma célula se divida ou para que a população duplique).<sup>90</sup> As células estão plenamente adaptadas ao meio, absorvendo os nutrientes, sintetizando os seus constituintes e possuindo uma rápida multiplicação. É durante esta fase que se verifica uma taxa específica de crescimento ( $k$ ) máxima. O valor de  $k$  varia amplamente sendo influenciado pelas condições ambientais, temperatura e a composição do meio, bem como pelas características genéticas do próprio organismo.<sup>90</sup>

O crescimento exponencial é limitado uma vez que há um esgotamento de nutrientes essenciais por parte do meio e uma acumulação de produtos de excreção da bactéria. Assim,

o crescimento cessa e a população atinge a fase estacionária.<sup>91</sup> É a etapa onde não há um crescimento da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morre. No entanto, as células podem manter-se viáveis, ao longo de um certo período de tempo, portanto esta é a fase em que a população se mantém constante. Devido à escassez de nutrientes e há presença de um nível elevado de produtos tóxicos, ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular, ocorrendo, assim, a morte celular. A morte celular, por sua vez, origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana, ao longo do tempo, iniciando, assim, a fase de declínio.

A partir desta curva é possível determinar os parâmetros cinéticos, nomeadamente a  $k$  e o  $g$  do microrganismo em questão.

#### Procedimento Experimental

A determinação da curva de crescimento em função do tempo de exposição, a um determinado composto, é uma das ferramentas de trabalho utilizada para determinar os efeitos antimicrobianos sobre as bactérias.<sup>106</sup>

Neste ensaio, foi testado o crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212, quando expostos aos compostos AU e I4.

Semeou-se uma colónia, proveniente de uma placa com estirpe pura, em caldo MH e incubou-se a 35°C, durante 18 a 24 horas. Desta cultura recolheu-se 1 mL para uma cuvete de espectrofotómetro e mediu-se a DO a 600 nm, foram feitas várias leituras e, quando necessário, diluições do inóculo, a fim de se obter uma turvação equivalente a 0.5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), ou seja, com um valor de absorvância compreendido entre 0.08 - 0.1. De referir que, 1 mL de caldo MH foi utilizado como branco.

Seguidamente, foi colocado a incubar a 37°C, com agitação, um tubo de caldo MH contendo 8 mL da suspensão bacteriana de *S. aureus* ou *E. faecalis* com turvação equivalente a 0.5 da escala de McFarland, durante uma hora. De seguida, foram adicionados a cada matraz com 100 mL de caldo MH (quatro no total para cada bactéria e composto) 2 mL da suspensão anterior. Desta suspensão recolheu-se 1 mL para uma cuvete de espectrofotómetro e mediu-se a DO a 600 nm, valor esse que correspondente ao tempo de leitura zero ( $T_0$ ).

Os quatro matrizes foram postos a incubar a 37°C com agitação. Uma hora depois da incubação foi retirado 1 ml de cada matriz e lida a respetiva absorvância ( $T_1$ ). Neste momento, foi adicionado a três dos matrizes o composto em estudo com valores de concentração conhecida, ou seja, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, respetivamente. Estes valores foram calculados tendo em conta a concentração final, num volume de 100 mL. A CMI foi determinada anteriormente pelo método da microdiluição em placa. De referir que um dos matrizes servia como controlo, sem nenhum composto.

Repetidas leituras de absorvância foram feitas de hora a hora, a fim de se obterem leituras suficientes para traçar o gráfico que relaciona a DO com o tempo de incubação.

Para finalizar, construíram-se as curvas de crescimento bacteriano que relacionam o tempo (horas) com os valores de absorvância (a 600 nm) de cada suspensão bacteriana. Cada gráfico mostra a evolução do crescimento bacteriano para a estirpe na ausência e na presença das várias concentrações dos compostos químicos. Depois de traçados os gráficos foram determinados os parâmetros cinéticos  $k$  e  $g$ . Tais cálculos são importantes na medida em que permitem otimizar as condições de cultivo dos microrganismos estudados e avaliar o efeito que os compostos provocam no crescimento bacteriano.<sup>91</sup>

As curvas de crescimento foram feitas em duplicado em ensaios independentes.

A síntese do procedimento experimental encontra-se na figura 15.



Figura 15. Procedimento experimental para elaboração de uma curva de crescimento bacteriano.

### 3.2.4. Avaliação da Citotoxicidade

Os efeitos citotóxicos quando provocam danos celulares intensos podem comprometer a viabilidade celular perturbando a integridade estrutural e/ou metabólica das células bem como a sua integridade reprodutiva provocando uma série de efeitos destrutivos. Sendo assim, com o uso das técnicas de cultura celular, os testes podem detetar a ocorrência de lise celular, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas.<sup>107</sup>

O parâmetro mais investigado pelos testes de citotoxicidade é a viabilidade celular. Existem diversos testes que são utilizados para a avaliação da citotoxicidade sendo o teste do MTT e o teste do vermelho neutro os mais usados.<sup>108</sup>

#### **3.2.4.1. Teste de Redução do 4,5-dimetil-3-tiazolil-2,5-difeniltetrazolio (MTT)**

Em 1983, Mosmann propôs um teste colorimétrico quantitativo para a avaliação da sobrevivência e da proliferação celular das células de mamíferos. O princípio do ensaio MTT é a redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (de cor amarela, solúvel em água) a cristais de formazano (de cor azul escuro/roxo, insolúvel em água), pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, existente no interior de células viáveis.<sup>109,110,111,112</sup> Esta redução só é verificada em células vivas, ou seja, metabolicamente ativas. O ensaio MTT depende do número de células presentes e da atividade mitocondrial celular sendo a quantidade de formazano produzida proporcional ao número de células viáveis.<sup>109,111, 113</sup>

A utilização deste teste para a avaliação do crescimento e sobrevivência celular oferece diversas vantagens pela sua rapidez, simplicidade e segurança que lhe estão associados.<sup>114</sup> Com as várias alterações feitas ao longo dos anos, o teste colorimétrico é atualmente considerado um teste quantitativo preciso, sensível, rápido e de baixo custo, sendo frequentemente usado para avaliar a viabilidade celular.<sup>109,113</sup>

#### **Procedimento Experimental**

O ensaio de MTT permite interpretar o efeito citotóxico induzido no metabolismo celular por um composto e, portanto, recorreu-se a este ensaio para o estudo do efeito dos compostos AU e I4 em células de mamífero, linha celular de macrófagos (RAW 264.7). As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio de Earle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) e incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Assim que as monocamadas celulares atingiram confluência, o meio foi removido e as células foram incubadas com meio fresco na ausência (controles) e na presença dos compostos nas concentrações CMI, 2×CMI e 3×CMI, durante 24 horas a 37°C e em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foi adicionado a cada

poço 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de MTT (5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e seguidamente as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, as células lavadas em Tampão fosfato-salino (PBS) e 250  $\mu\text{l}$  de DMSO foi adicionado de forma a dissolver a formazana. A absorvância a 530 nm foi determinada num leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK). A viabilidade celular foi calculada pela relação entre as células viáveis no controlo e no ensaio usando a seguinte fórmula:  $[100 - (L2/L1) \times 100]$ , onde L1 representa a absorvância das células controlo e L2 a absorvância das células tratadas. As experiências foram realizadas em triplicado e pelo menos em três ensaios independentes.



## **4. Resultados e Discussão**

**4. Resultados e Discussão**

**4.1. Caracterização do Perfil de Suscetibilidade Bacteriana aos Antibióticos e Compostos em Estudo**

4.1.1. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Técnica de Kirby-Bauer

4.1.2. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Estudo de Sinergismo

4.1.3. Método de Microdiluição em Placa

4.1.3.1. Análise Geral dos Resultados de Concentração Mínima Inibitória

4.1.3.2. Análise e Discussão Detalhada dos Resultados de Concentração Mínima Inibitória e de Concentração Mínima Bactericida

4.1.3.2.1. *Escherichia coli* ATCC 25922

4.1.3.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

4.1.3.2.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, HUC 1 e HUC 2

4.1.3.2.4. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, HUC 3 e HUC 4

**4.2. Relação Estrutura - Atividade dos Triterpenóides Pentacíclicos**

**4.3. Possível Mecanismo de Ação dos Triterpenóides Pentacíclicos**

**4.4. Curvas de Crescimento Bacteriano**

4.4.1. Efeito do Ácido Ursólico e seu Derivado Semi-sintético na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

4.4.1.1. Efeito do Ácido Ursólico na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

4.4.1.1.1. Curva de crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 na presença do ácido ursólico a várias concentrações

4.4.1.1.2. Curva de crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações

4.4.1.2. Efeito do Derivado Semi-sintético do Ácido Ursólico na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

4.4.1.2.1. Curva de crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 na presença do composto 14 a várias concentrações

4.4.1.2.2. Curva de crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 na presença do composto 14 a várias concentrações

**4.4.2. Parâmetros cinéticos**

4.4.2.1. Retas de Semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações

4.4.2.2. Análise dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e de *E. faecalis* ATCC 29212 na presença do ácido ursólico a várias concentrações

4.4.2.3. Retas de Semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212 na presença do composto 14 a várias concentrações

- 4.4.2.4. Análise dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e de *E. faecalis* ATCC 29212 na presença do composto 14 a várias concentrações
- 4.4.3. Análise Geral do Efeito do Ácido Ursólico e seu Derivado Semi-sintético na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

**4.5. Avaliação da citotoxicidade**



#### 4.1. Caracterização do Perfil de Suscetibilidade Bacteriana aos Antibióticos e Compostos em Estudo

A resistência crescente aos antibióticos por parte das bactérias tem vindo a limitar as opções terapêuticas,<sup>115,116</sup> verificando-se uma tendência clara na redução da suscetibilidade e, de um modo geral, a todos os grupos de antibióticos.<sup>116</sup> Daí a necessidade de encontrar novos antibióticos de forma a contrariar esta redução de suscetibilidade e diminuir a resistência bacteriana.

##### 4.1.1. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Técnica de Kirby-bauer

O primeiro método aplicado neste estudo, como método de *screening*, foi o método de difusão em disco, considerado um método padrão para avaliar a suscetibilidade de estirpes aos antibacterianos. Este método permitiu avaliar qualitativamente a atividade antibacteriana do AU e dos seus derivados semi-sintéticos nas estirpes selecionadas para este estudo.

A presença de halos de inibição em redor do disco indica ausência de crescimento. O diâmetro dos halos de inibição foi medido em milímetros (mm).

*Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como estirpe de controlo do método, uma vez que esta estirpe é uma das recomendadas para o controlo de qualidade e para a realização de antibiogramas. Os valores dos halos de inibição obtidos para *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213 encontram-se na tabela 3. Verificou-se que os diferentes halos de inibição se encontravam dentro dos limites aceitáveis referenciados nas normas do CLSI. *E.coli* (controlo do método) é também considerada suscetível aos antibióticos testados tendo em conta os valores documentados pela EUCAST tabela 4.

A atividade antibacteriana dos diferentes compostos foi testada com uma quantidade de 15 µL de composto, a uma concentração de 1 mg/mL. Inicialmente, apenas os compostos 3,4,5,6,7,8,9,10 e 11 foram utilizados uma vez que os compostos 12 e 13 mostraram difícil dissolução em DMSO e os compostos 1, 2 e 14 só posteriormente foram sintetizados. O disco com 15 µL de DMSO foi usado como controlo, verificando-se que não houve inibição do crescimento bacteriano pelo que os resultados puderam ser validados. Este ensaio foi efetuado

em duplicado para cada composto e os resultados apresentados correspondem à média desses valores.

Apenas os compostos 7 e 8 mostraram alguma atividade antimicrobiana em *E. faecalis* com halos de inibição de diâmetros de 8 e 10 mm, respectivamente. Para a *S. aureus* apenas no composto 8 ocorreu a formação de um halo de inibição de 10 mm. Apesar de se terem visualizado halos de inibição, estes são muito pequenos ou seja não têm uma interferência significativa a ponto das estirpes serem consideradas suscetíveis. Todos os outros compostos não apresentaram halo de inibição, ou sejam a estirpes não foram inibidas na presença desta quantidade de composto.

**Tabela 3.** Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213 após aplicação dos discos de Ciprofloxacina (CIP 5 µg), Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) e restantes compostos.

<i>Halo de inibição (mm)</i>				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Antibióticos</b>				
CIP	<b>44</b>			
AMC	<b>24</b>			
CN	<b>22</b>			
<b>Compostos</b>				
3	NS	NS	NS	NS
4	NS	NS	NS	NS
5	NS	NS	NS	NS
6	NS	NS	NS	NS
7	NS	NS	<b>8</b>	NS
8	NS	NS	<b>10</b>	<b>8</b>
9	NS	NS	NS	NS
10	NS	NS	NS	NS
11	NS	NS	NS	NS

- a) CIP - Ciprofloxacina (CIP 5 µg); AMC - Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg); CN - Gentamicina (CN 30 µg);
- b) NS - Não houve inibição.

**Tabela 4.** Classificação das estirpes em resistente ou suscetível, de acordo com os valores dos diâmetros dos halos documentados pelo EUCAST.

		Classificação de acordo com diâmetro do halo de inibição (mm)	
	Antibióticos	Resistente	Suscetível
<i>Escherichia coli</i>	CIP 5µg	<19	≥ 22
	CN 10µg	<14	≥ 17
	AMC 20-10µg	<19 <sup>A,B</sup>	≥19 <sup>B</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 5µg	<22	≥25
	CN 10µg	<15	≥15
	AMC 20-10µg	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 5µg	-	-
	CN 30µg	<8	≥8
	AMC	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 5µg	<20	≥20
	CN 10µg	<18	≥18
	AMC	-	-

a) CIP – Ciprofloxacina; AMC - Amoxicilina / Ácido clavulânico e CN – Gentamicina.;

Hao-Bin Hu [et.al]<sup>117</sup> avaliaram a atividade antibacteriana de ácidos triterpênicos, estruturalmente semelhantes ao ácido ursólico e seus derivados em estirpes de *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923 e não observaram halos de inibição, com exceção em *E. faecalis*. Em que o maior diâmetro da zona de inibição foi de 8 mm, para uma concentração de 10 µg/ 5 ml. Estes resultados são semelhantes aos por nós obtidos.

Já Wong, Ali e Boey<sup>118</sup> avaliaram a atividade antibacteriana de extratos metanólicos aquosos das folhas de *M. malabathricum* e isolaram os seus compostos, entre eles o ácido ursólico que se mostrou ativo contra alguns dos microorganismos testados, exibindo um halo de inibição para *S. aureus* ATCC 25923 de 9,5 mm, a uma concentração de 1mg / ml. O ácido ursólico,

tal como nos nossos resultados, não apresentou halo de inibição nas estirpes *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os componentes biologicamente ativos do extrato de benzeno das raízes de *Trichodesma amplexicaule* foram investigados fitoquimicamente por Singh e Singh<sup>119</sup>. A análise originou uma mistura de terpenóides, entre eles o  $\beta$ -sitosterol, o  $\alpha$ -amirina, o lupeol, o ácido hexacosanóico entre outros. A  $\alpha$ -amirina (1mg/disco) mostrou atividade em ambas as bactérias, *E. coli* ATCC 5922 e *S. aureus* ATCC 25923 com um diâmetro de inibição de 12,54 mm e 11,61 mm, respetivamente. Concluíram que os terpenóides isolados são agentes antibacterianos moderados, e portanto, poderão ter alguma atividade se usados em maior quantidade do que a permitida por este método.

#### 4.1.2. Método de Difusão em Disco em Meio Sólido – Estudo de Sinergismo

Os efeitos sinérgicos podem ser produzidos se os constituintes de um extrato afetarem diferentes alvos celulares ou interagirem um com o outro, a fim de melhorar a solubilidade e aumentar desta forma a biodisponibilidade. Um efeito sinérgico pode ocorrer quando os antibióticos são combinados com um agente que antagoniza os mecanismos de resistência bacteriana.<sup>120</sup>

Vários são os registos onde a atividade antibacteriana entre triterpenóides pentacíclicos e antibióticos tem um efeito sinérgico. Por exemplo, Chung, Navaratnam e Chung<sup>121</sup> reportaram um efeito sinérgico entre estes compostos e antibióticos contra estirpes de referência de *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 43300. As propriedades sinérgicas de dois terpenóides, nomeadamente o aromadendreno e o 1,8- cineol, extraídos a partir do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, contra MRSA e VRE foram também demonstradas.<sup>122</sup> Interações sinérgicas *in vitro* do ácido oleanólico em combinação com isoniazida, rifampicina ou etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* foram também identificadas.<sup>123</sup>

Desta forma foi colocada a hipótese de existir sinergismo entre os antibióticos padrão e os compostos AU, AO e derivados semi-sintéticos do ácido ursólico.

O método de difusão em disco, em meio sólido, permitiu avaliar qualitativamente o efeito sinérgico da atividade antibacteriana entre os diferentes compostos em contato com os antibióticos padrão, nas estirpes selecionadas para este estudo.

Na tabela 5 estão representados os resultados da avaliação do efeito sinérgico da atividade antibacteriana dos antibióticos padrão (CIP, AMC e CN) e os compostos AU e AO, numa concentração de 1 mg/mL. No entanto, não se verificou um efeito sinérgico significativo em nenhum dos casos.

**Tabela 5.** Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213 após aplicação dos discos de Ciprofloxacina (CIP 5 µg), Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) em conjunto com os compostos ácido ursólico e ácido oleanólico.

<i>Halo inibitório (mm)</i>				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Antibióticos</b>				
CIP	35	35	32	30
AMC	24	24	24	34
CN	25	25	30	22
<b>Compostos</b>				
<b>AU</b>				
CIP + AU	35	36	33	30
AMC + AU	24	24	24	34
CN + AU	25	26	31	25
<b>AO</b>				
CIP + AO	37	36	34	30
AMC + AO	24	24	24	36
CN + AO	25	25	34	22

- a) CIP - Ciprofloxacina (CIP 5 µg); AMC - Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg); CN - Gentamicina (CN 30 µg);
- b) AU – ácido ursólico e AO – ácido oleanólico.

Foi também testado o efeito sinérgico entre os antibióticos padrão (AMC e CN) e os diferentes compostos (concentração de 1 mg / mL) para as espécies Gram-positivo. Mas também não se verificou um efeito sinérgico significativo com nenhum dos compostos (tabela 6).

**Tabela 6.** Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213 após aplicação dos discos de Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg), Gentamicina (CN 30 µg) em associação com os restantes compostos.

*Halo de inibição (mm)*

<i>Antibióticos</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
AMC	45		34	
CN	30		25	
<i>Compostos</i>	AMC + Compostos	CN + Compostos	AMC + Compostos	CN + Compostos
3	45	30	34	26
4	46	30	34	26
5	46	31	34	27
6	45	30	34	26
7	46	32	35	26
8	46	31	34	27
9	45	30	34	26
10	45	30	34	25
11	45	30	34	25

a) AMC - Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20µg + 10 µg); CN - Gentamicina (CN 30 µg);

#### 4.1.3. Método de Microdiluição em Placa

O método de microdiluição em placa é um método quantitativo que determina a concentração mínima inibitória do composto em estudo.

Foram usadas as quatro estirpes padrão e ainda quatro estirpes de origem clínica nomeadamente *S. aureus* HUC 1 e HUC 2 (MRSA) e *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4 (VRE).

Nesta fase do estudo os compostos 12 e 13 foram incluídos, já que se conseguiu a sua completa dissolução em DMSO pelo aumento da temperatura deste até 37°C. Foram ainda incluídos os três compostos derivados do AU (1, 2 e 14).

Na tabela 7 apresentam-se os valores obtidos de CMI e CMB dos diferentes compostos, na *E. coli* ATCC 25922 e na *P. aeruginosa* ATCC 27853. Estes valores foram as médias dos três replicados em, pelo menos, dois ensaios independentes.

**Tabela 7.** Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida dos diferentes compostos na *E. coli* ATCC 25922 e na *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Compostos	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
AU	125	125	<b>62,5</b>	125
AO	125	125	125	Superior a 250
1	<b>62,5</b>	125	<b>62,5</b>	125
2	<b>62,5</b>	125	<b>62,5</b>	125
3	125	Superior a 250	125	Superior a 250
4	125	Superior a 250	125	Superior a 250
5	125	Superior a 250	125	Superior a 250
6	125	Superior a 250	125	Superior a 250
7	125	125	125	Superior a 250
8	125	125	125	Superior a 250
9	125	125	125	Superior a 250
10	125	125	125	Superior a 250
11	125	125	125	Superior a 250
12	125	125	125	Superior a 250
13	125	125	125	Superior a 250
<b>14</b>	<b>62,5</b>	125	<b>62,5</b>	125

a) CMI - Concentração Mínima Inibitória e CMB - Concentração Mínima Bactericida;

b) AU – ácido ursólico e AO – ácido oleanólico.

Na tabela 8 apresentam-se os valores para a *S. aureus* ATCC 29213 e ainda *S. aureus* HUC 1 e HUC 2. A partir deste ensaio, inclusive, os compostos 5, 6, 3 e 4 não foram testados uma vez que não havia produto suficiente disponível no Laboratório de Química Farmacêutica.

**Tabela 8.** Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida dos diferentes compostos na *S. aureus* ATCC 29213 e ainda *S. aureus* HUC 1 e HUC 2.

<i>Compostos</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		<i>Staphylococcus aureus</i> HUC 1		<i>Staphylococcus aureus</i> HUC 2	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
AU	31,3	62,5	31,3	31,3	62,5	62,5
AO	62,5	125	125	125	62,5	62,5
1	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125	31,3	Superior a 62,5
2	62,5	Superior a 125	125	Superior a 250	125	Superior a 125
7	125	250	125	125	125	125
8	125	125	125	125	125	125
9	125	Superior a 250	125	125	125	125
10	62,5	Superior a 250	125	125	62,5	Superior a 125
11	62,5	125	125	125	62,5	Superior a 125
12	125	Superior a 250	125	125	62,5	Superior a 125
13	125	125	125	125	62,5	Superior a 125
14	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125	31,3	Superior a 62,5

a) CMI - Concentração Mínima Inibitória e CMB - Concentração Mínima Bactericida;

b) AU – ácido ursólico e AO – ácido oleanólico.

Na tabela 9 apresentam-se os valores para *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4.

**Tabela 9.** Concentração Mínima Inibitória e Concentração mínima bactericida dos diferentes compostos na *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4.

<i>Compostos</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		<i>Enterococcus faecalis</i> HUC 3		<i>Enterococcus faecalis</i> HUC 4	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
AU	7,8	7,8	15,6	15,6	15,6	15,6
AO	31,3	Superior a 62,5	15,6	Superior a 31,3	15,6	15,6
1	31,3	Superior a 62,5	15,6	Superior a 31,3	15,6	Superior a 31,3
2	62,5	Superior a 125	31,3	Superior a 62,5	31,3	Superior a 62,5
7	62,5	62,5	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125
8	62,5	62,5	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125
9	31,3	Superior a 62,5	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125
10	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125
11	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	Superior a 125
12	125	125	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125
13	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125	62,5	Superior a 125
14	31,3	Superior a 62,5	15,6	Superior a 31,3	15,6	Superior a 31,3

a) CMI - Concentração Mínima Inibitória e CMB - Concentração Mínima Bactericida;

b) AU – ácido ursólico e AO – ácido oleanólico.

#### 4.1.3.1. Análise Geral dos Resultados de Concentração Mínima Inibitória

A análise dos resultados indica que o composto AU assim como alguns dos seus compostos semi-sintéticos tem melhor atividade em Gram-positivo do que em Gram-negativo, uma vez que os valores de CMI referentes às estirpes Gram-negativa rondam entre 125 µg/mL, maioritariamente, e 62,5 µg/mL, enquanto que, nas estirpes Gram-positivo, apesar de ter

valores dessa ordem apresentam também valores de 31,3 µg/mL, 15,6 µg/mL, e ainda, 7,8 µg/mL

Dentro dos Gram-positivo, *E. faecalis* parece ser mais suscetível ao AU e seus derivados, apresentando valores de CMI de 7,8 µg/mL e 15,6 µg/mL.

*E. coli* foi a bactéria mais resistente aos compostos, embora com pouca diferença de *P. aeruginosa*, enquanto *E. faecalis* parece ser o mais suscetível. Estes resultados também obtidos por Shai [et.al.].<sup>124</sup>

O ácido ursólico apresenta melhor atividade nos Gram-positivo relativamente aos outros compostos, com exceção da estirpe MRSA, *Staphylococcus aureus* HUC 2, onde os seus derivados semi-sintéticos 1 e 14 apresentam um valor de CMI menor. Em *P. aeruginosa* a atividade do AU e dos compostos 1, 2 e 14 é semelhante. Contudo, o inverso acontece com *E. coli* embora só por uma diluição (125 µg/mL para AU e 62,5 µg/mL para os compostos 1, 2 e 14).

Quanto às estirpes clínicas, não há uma significativa alteração das suscetibilidades relativamente às estirpes padrão suscetíveis à metilicina e vancomicina. As ligeiras alterações da CMI podem dever-se a características próprias das estirpes.

#### 4.1.3.2. Análise e Discussão Detalhada dos Resultados de Concentração Mínima Inibitória e de Concentração Mínima Bactericida

Os valores de CMI para as bactérias Gram-negativo, *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram similares, todos os compostos apresentaram um valor de 125 µg/mL à exceção dos compostos 1, 2 e 14 que exibiram um valor mais baixo de 62,5 µg/mL. De salientar que o AU em *E. coli* apresentou um valor de 125 µg/mL, enquanto que para *P. aeruginosa* o valor foi de 62,5 µg/mL.

Investigamos ainda se a atividade dos diferentes compostos era bactericida ou bacteriostática. Os compostos 1, 2 e 14 mostraram atividade bactericida na *E. coli* em concentrações de 125 µg/mL (2×CMI). Para os compostos 3, 4, 5 e 6 os valores de CMB foram superiores a 250 µg/mL, aqui o crescimento bacteriano não foi inibido pelas diluições correspondentes a 2×CMI, exibindo assim um efeito bacteriostático. Os restantes compostos obtiveram um valor de CMB igual ao CMI de 125 µg/mL, ou seja o crescimento bacteriano foi inibido pela concentração CMI o que indica que houve lise celular.

Há inúmeros relatos na literatura sobre as atividades antibacterianas dos triterpenóides pentacíclicos, mas ainda assim são escassos os exemplos onde estes se encontram em estado puro já que os diferentes estudos sobre antibacterianos como o AU ou o AO até agora têm sido realizados principalmente a partir de extratos de plantas e usando estirpes bacterianas definidas como *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.<sup>125</sup>

#### 4.1.3.2.1. *Escherichia coli* ATCC 25922

Fontanay [et.al.],<sup>125</sup> estimaram a potencial atividade antibacteriana da “forma comercial” do ácido ursólico em cinco estirpes de referência bacterianas ATCC bem como em isolados clínicos Gram-positivo e Gram-negativo, contendo diferentes determinantes de resistência. Para *E. coli* registaram valores  $\geq 256$  mg/L.

Shai [et.al.],<sup>124</sup> obtiveram valores de CMI de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tanto para o ácido ursólico como para o ácido hidroxiursólico para *E. coli*.

Makboul [et.al.],<sup>126</sup> isolaram, a partir das folhas de *Lantana montevidensis*, um novo triterpeno pentacíclico, o ácido 3 $\beta$ ,25-epóxi-3 $\alpha$ ,22 $\beta$ ,23 $\alpha$ -trihidróxi-olean-12-en-28-óico. Concluíram que este possui moderada a fraca atividade antibacteriana, com valores de CMI contra *E. coli* de 1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Horiuchi [et.al.],<sup>78b</sup> utilizaram um extrato de folhas *Salvia officinalis*, e isolaram os diferentes triterpenóides, entre eles o ácido ursólico, que apresentou valores de CMI superiores a 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a *E. coli*. Mallavadhani [et.al.],<sup>127</sup> isolaram e analisaram os principais metabolitos das folhas de *Diospyros melanoxylon* viz, quanto à sua atividade antibacteriana contra uma série de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. O ácido ursólico inibiu o crescimento de *E. coli*, com um valor de CMI de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Já os seus derivados para *E. coli* obtiveram valores  $\geq 90 \mu\text{g}/\text{mL}$ . De referir que este ensaio foi feito seguindo uma metodologia diferente embora a *Escherichia coli* seja a ATCC 25922.

Nascimento [et.al.],<sup>128</sup> sintetizaram dois derivados do ácido ursólico através de um extrato etanólico das partes aéreas de *Sambucus australis*, o ácido 3 $\beta$ -acetóxi-urs-12-en-28-óico e o ácido 3 $\beta$ -formilóxi-urs-12-en-28-óico. Segundo eles, o ácido 3 $\beta$ -acetóxi-urs-12-en-28-óico mostrou atividade significativa contra todas as estirpes testadas, exceto para *S. aureus* ATCC 12624. Os melhores resultados foram encontrados contra *E. coli* ATCC 25922 com um valor

de CMI de 32 µg/mL. O ácido 3β-acetóxi-urs-12-en-28-óico é o resultado da adição ao C28 de um anel aromático do tipo trimetil-benzeno, ou seja a estrutura do composto em C28 é muito diferente dos nossos derivados.

#### 4.1.3.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Em *P. aeruginosa* os compostos AU, 1, 2 e 14 mostraram atividade bactericida em concentrações de 125 µg/mL (2×CIM). Nos restantes compostos os valores de CMB foram superiores a 250 µg/mL, apresentado desta forma um efeito bacteriostático.

Fontanay [et.al.],<sup>125</sup> estimaram a potencial atividade antibacteriana do ácido ursólico e registaram valores de CMI *P. aeruginosa* ≥ 256 mg/L. Os dois derivados do ácido ursólico sintetizados por Nascimento [et.al.]<sup>128</sup> registaram valores de CMI contra a *P. aeruginosa* de 512 µg/mL. O ácido ursólico estudado por Horiuchi [et.al.]<sup>78b</sup> apresentou valores de CMI superiores a 128 µg/mL para a *P. aeruginosa*. Shai [et.al.],<sup>124</sup> exibiram que o ácido ursólico e o ácido hidroxiursólico foram os mais ativos com valores de CMI contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 de 4,0 e 7,8 µg/mL respetivamente. Importante referir que apesar das estirpes serem iguais às utilizadas neste estudo a metodologia é bastante diferente, os valores de CMI foram determinados utilizando o método de microplacas em série desenvolvido por Eloff,<sup>129</sup> e modificado por Masoko, Picard e Eloff.<sup>130</sup>

#### 4.1.3.2.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, HUC 1 e HUC 2

No que diz respeito à estirpe *S. aureus* ATCC 29213, o AU foi o composto que apresentou um valor de CMI mais baixo de 31,3 µg/mL. Os compostos AO, 1, 2, 10, 11 e 14 exibiram um valor de 62,5 µg/mL enquanto os restantes compostos (7, 8, 9, 12 e 13) tiveram um valor de CMI de 125 µg/mL.

Os compostos 8 e 12 mostraram atividade bactericida em concentrações de 125 µg/mL (CIM). Os compostos AU, AO, 7 e 11 mostraram atividade bactericida em concentrações de 125 µg/mL (2×CMI). Os restantes compostos apresentaram um efeito bacteriostático.

Fontanay [et.al.],<sup>125</sup> obtiveram, para as duas estirpes *S. aureus* por eles estudadas, um valor de 8 mg/L. Makboul [et.al.],<sup>126</sup> registaram um valor de CMI de 625 µg/mL contra *S. aureus* com um novo triterpeno pentacíclico, o ácido 3β,25-epóxi-3α,22β,23α-trihidróxi-olean-12-en-28-óico, acabando por concluir que este possui fraca atividade antibacteriana. Nascimento [et.al.],<sup>128</sup> registaram valores de CMI contra *S. aureus* ATCC 6538 de 128 µg/mL no ácido 3β-acetóxi-urs-12-en-28-óico registou. Já o ácido 3β-formilóxi-urs-12-en-28-óico apresentou uma atividade com valores de CIM de 256 µg/mL para a mesma estirpe bacteriana. O ácido ursólico isolado por Mallavadhani [et.al.],<sup>127</sup> inibiu o crescimento de *S. aureus* com um valor de CMI de 50 µg/mL. Já os seus derivados para *S. aureus* obtiveram valores superiores ou iguais a 75µg/mL. De referir que este ensaio teve por base uma metodologia diferente da deste estudo assim como a estirpe, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144.

Chung, Navaratnam e Chung,<sup>121</sup> realizaram um estudo onde o principal objetivo foi avaliar a interação entre três triterpenóides pentacíclicos e os antibióticos padrão (metecilina e vancomicina) contra estirpes de referência de *S. aureus*. O triterpenóide pentacíclico α-amarina mostrou atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 29213 com valores de CMI de 64 µg/mL. Exibiu ainda um efeito bacteriostático com um valor superior a 512 µg/mL de CMB. Shai [et.al.],<sup>124</sup> o seu ácido ursólico inibiu *S. aureus*, com um valor de 62,5 µg/mL, já no ácido hidroxiusólico obtiveram um valor CMI de 32 µg/mL.

Na estirpe clínica *S. aureus* HUC 1 o composto AU apresentou um valor de 31,3 µg/mL enquanto os compostos 1 e 14 registaram um valor de 62,5 µg/mL de CMI. Já na *S. aureus* HUC 2 os compostos 1 e 14 registaram um valor de 31,3 µg/mL de CMI, enquanto o AU registou um valor de 62,5 µg/mL.

Na *S. aureus* HUC 1 os compostos 1, 2 e 14 mostraram atividade bacteriostática, enquanto todos os restantes compostos apresentaram atividade bactericida apresentando valores de CMB iguais à sua CMI. Na *S. aureus* HUC 2 os compostos AU, AO, 7 e 8 apresentaram atividade bactericida apresentando valores de CMB iguais à sua CMI, todos os restantes compostos apresentaram um efeito bacteriostático.

Fontanay [et.al.],<sup>125</sup> no que diz respeito aos isolados clínicos, o ácido ursólico e oleanólico, registaram valores superiores ou iguais a 256 mg/mL para MRSA. O triterpenóide pentacíclico α-amarina estudado por Chung, Navaratnam e Chung,<sup>121</sup> mostrou atividade antibacteriana

contra *S. aureus* MRSA (ATCC 43300) com valores de CMI de 64 µg/mL, exibindo ainda um efeito bactericida com um valor superior a 512 µg/mL de CMB. Já Horiuchi [et.al.],<sup>78b</sup> para a *S. aureus* MRSA obtiveram valores de 8 µg/mL de CMI, de referir que a metodologia utilizada é diferente da deste estudo.

#### 4.1.3.2.4. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, HUC 3 e HUC 4

Relativamente a *E. faecalis* o composto que apresentou um valor de CMI mais baixo foi o AU de 7,8 µg/mL, os compostos AO, I, 9 e I4 registaram um valor de 31,3 µg/mL. Os restantes compostos exibiram um valor de 62,5 µg/mL de CMI.

Os compostos AU, 7,8, I1 e I2 registaram um efeito bactericida com o seu valor de CMB a corresponder ao de CMI, os restantes compostos apresentaram um efeito bacteriostático.

Fontanay [et.al.],<sup>125</sup> para *E. faecalis* obtiveram um valor de CMI de 4 mg/L, e Shai [et.al.],<sup>124</sup> registaram valores de 47 e 38 µg/mL para o ácido ursólico e o ácido hidroxiursólico, respetivamente, para a mesma bactéria.

Nas estirpes clínicas *E. faecalis* HUC 3 e HUC 4 os compostos AU, AO, I e I4 apresentaram um valor de 15,6 µg/mL, enquanto o composto 2 registou 31,3 µg/mL de CMI. Os restantes compostos exibiram um valor de 62,5 µg/mL de CMI. Para VRE as CMIs são variáveis o que sugerem diferenças fisiológicas nas estirpes, não propriamente associadas ao mecanismo de resistência à vancomicina.

Em ambas as estirpes clínicas, o composto, AU apresentou um efeito bactericida com valores de CMB iguais a CMI. Na *E. faecalis* HUC 3 o compostos I1 também apresentou efeito bactericida, enquanto em *E. faecalis* HUC 4 foi o composto AO. Todos os restantes compostos tiveram um comportamento bacteriostático.

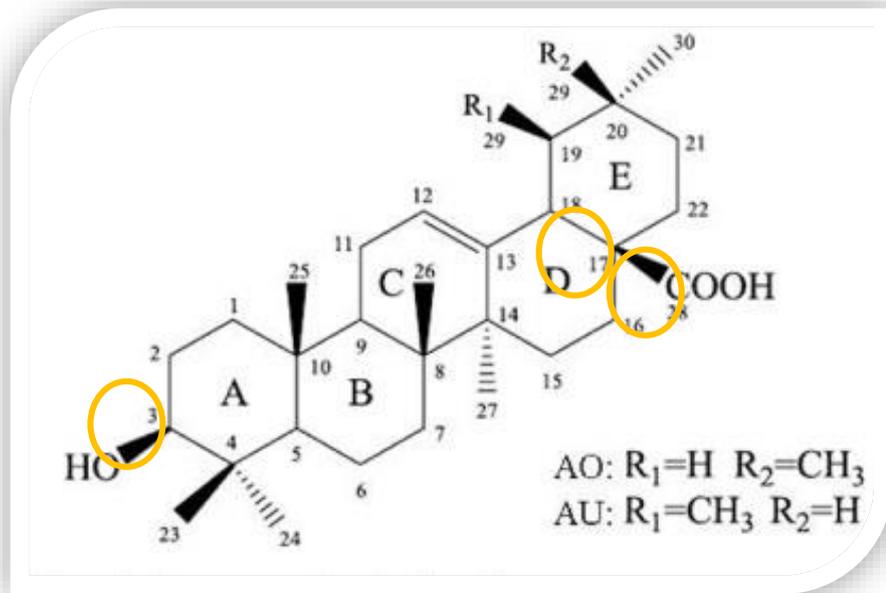
Fontanay [et.al.],<sup>125</sup> no que diz respeito aos isolados clínicos registaram valores de 256 mg/mL para *E. faecalis*. Já Horiuchi [et.al.],<sup>78b</sup> para *E. faecalis* VRE assinalaram valores de 4 µg/mL de CMI.

## 4.2. Relação Estrutura - Atividade dos Triterpenóides Pentacíclicos

A coloração de Gram é uma técnica utilizada para classificar as bactérias com base nas diferentes características das suas paredes celulares. Bactérias Gram-positivo ou Gram-negativo são determinadas pela quantidade de peptidoglicano na parede celular, e pelo fato das bactérias Gram-negativo apresentarem uma membrana externa, que limita a permeabilidade de muitos compostos. Compostos hidrofílicos atravessam a membrana externa por passagem através das porinas, proteínas que formam poros na membrana externa. O tamanho e estrutura tridimensional da molécula têm assim importância na permeabilidade através das porinas.

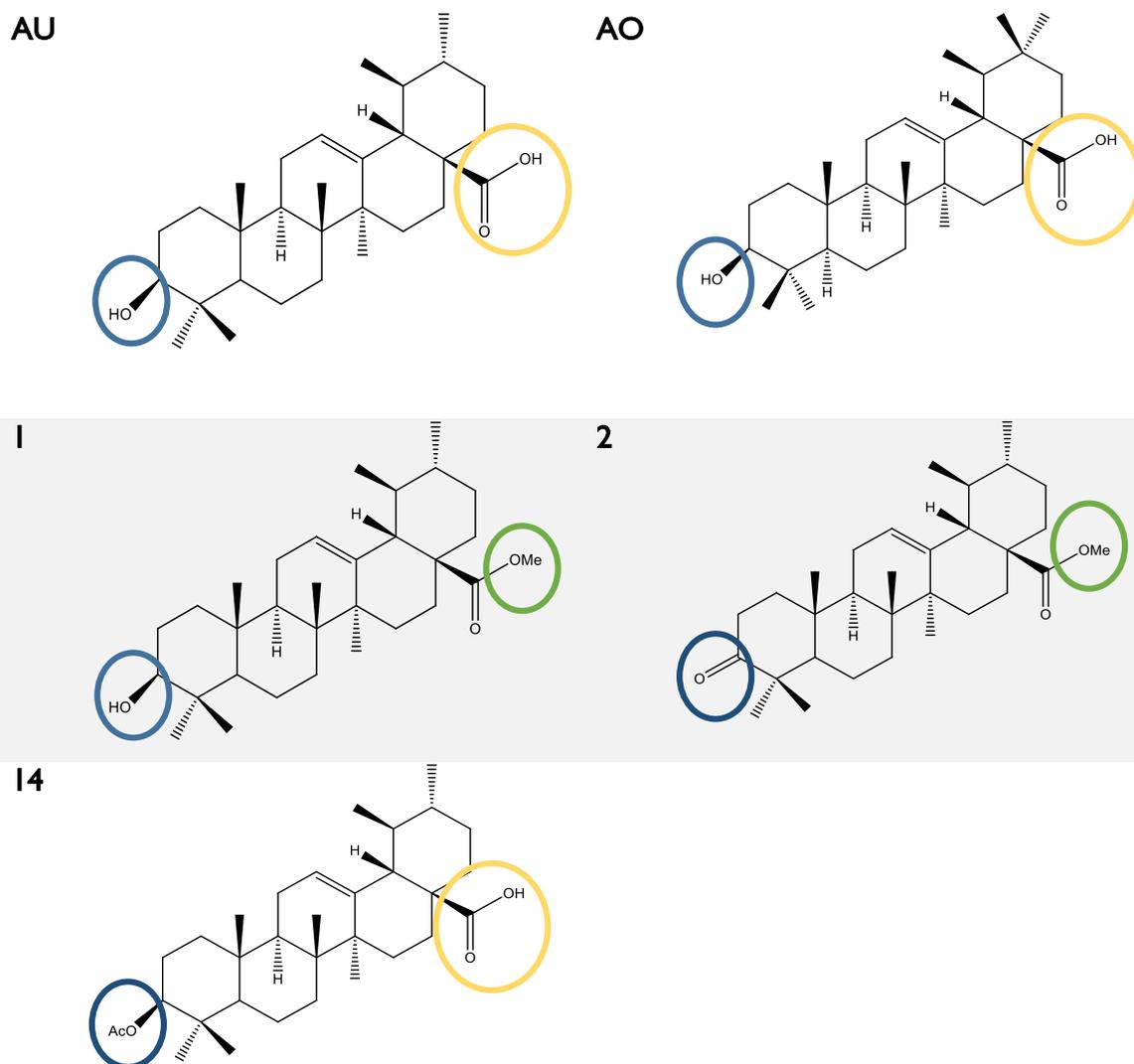
A atividade contra bactérias Gram-negativo tem sido pouco estudada em relação a bactérias Gram-positivo.<sup>131</sup> Kurek [et.al.],<sup>132</sup> defendem que os triterpenóides pentacíclicos inibem o crescimento e a sobrevivência de muitas bactérias especialmente das bactérias Gram-positivo. De entre as estirpes bacterianas padrão estudadas, foi nas bactérias Gram-negativo onde o valor de CMI se mostrou mais elevado, talvez devido à presença da membrana externa e à dificuldade de entrada do composto na bactéria.

As atividades biológicas estão relacionadas com a presença de grupos funcionais sobre a estrutura química de cada triterpeno. Estes carbonos estão indicados na figura 16, com especial importância para o C3, C17 e C28. Mais de 50 000 triterpenos pentacíclicos eram conhecidos, mas os estudos comparativos de atividade antibacteriana, que poderiam permitir compreender e esclarecer a possível relação estrutura-atividade são ainda raros.<sup>125</sup>



**Figura 16.** Estrutura base do ácido ursólico (AU) e oleanólico (AO) com os carbonos funcionalizados.

Na tabela 10 estão apresentados os compostos com as respectivas estruturas químicas que apresentaram uma melhor atividade antibacteriana, em que se destaca a importância para dos C3, C17 e C28.

**Tabela 10.** Nome e estrutura dos compostos que apresentaram uma melhor atividade bacteriana nas estirpes testadas.

A análise geral das relações entre estrutura e atividade de triterpenos contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo indica que a atividade antibacteriana do triterpeno pode ser relacionada com a presença de um grupo oxigenado em C3, uma vez que 95% dos triterpenos bactericidas apresenta essa funcionalidade. Esse grupo oxigenado pode ser um hidroxilo, carbonilo, glicosídeo, éster (principalmente acetil), ou hidroxilimina.<sup>131</sup> Como foi possível ver na tabela 3, todos os compostos apresentam um grupo oxigenado em C3. A presença de um grupo hidroxilo em C3 é importante para a atividade antibacteriana do ácido ursólico.<sup>124</sup> A atividade é maior para os triterpenos que contêm um grupo hidroxilo livre em C3. Os compostos AU, AO e I apresentam um grupo hidroxilo livre em C3. Além disso, a atividade bactericida atribuída ao local do C3 não é influenciada pelos efeitos estéricos, porque compostos muito ativos contêm grupos que apresentam grandes volumes em C3. O composto

I4 apresenta um grupo acetato em C3 e ainda assim foi o composto com melhor atividade, revelando que os efeitos estéricos não afetam a atividade bactericida.

Um grupo carboxilo em C17 no lado beta é também importante, e 78% e 81% de triterpenos ativos contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, respectivamente, apresentam este grupo funcional.<sup>131</sup> Os compostos AU, AO e I4 apresentam um grupo carboxilo em C17.

A maioria dos triterpenos bactericidas apresenta uma ligação- $\pi$  nas posições C5, C6, C9, C11, C12 e C13 (ou seja,  $\Delta^{5,6}$ ,  $\Delta^{9,11}$ , e  $\Delta^{12,13}$ , respectivamente), ou ainda em  $\Delta^{20,21}$  e  $\Delta^{20,30}$ , no entanto, as ligações- $\pi$  estão ausentes em alguns triterpenos ativos. Considerando que uma grande quantidade de triterpenos bactericidas contem ligações- $\pi$  no anel C, propõe-se que esta funcionalização também é importante para a atividade bactericida.<sup>131</sup> Todos os compostos que apresentaram uma melhor atividade antibacteriana (AU, AO, I, 2 e I4) contém uma ligação- $\pi$  em C12 e C13 ( $\Delta^{12,13}$ ) no anel C.

O grupo carboxílico em C28 e a funcionalidade éster em C3 são altamente essenciais para as atividades farmacológicas melhoradas dos triterpenos pentacíclicos. Tendo em conta estas observações, o grupo hidroxilo em C3 pode ser explorado para sintetizar cadeias de ésteres altamente lipofílicos.<sup>127</sup> Os compostos AU, AO e I4 apresentam um grupo carboxílico em C28 e o composto I4 têm ainda a particularidade de conter um acetato (derivado éster) em C3.

A conversão do grupo carboxilo em C17 no lado da ligação beta a uma latona em C13 e C17 aumenta a atividade bactericida,<sup>133</sup> (ocorre a perda de um protão do grupo carboxílico em C17 provocando a ciclização com o C13, devido à ligação insaturada), fatos que poderão contribuir para uma futura perspectiva de síntese de novos compostos com potencial atividade bactericida.

### 4.3. Possível Mecanismo de Ação dos Triterpenóides Pentacíclicos

É defendido que, devido ao carácter hidrofóbico dos hidrocarbonetos, o principal local da sua ação é a membrana celular.<sup>134</sup> Os hidrocarbonetos acumulam-se na bicamada lipídica de acordo com o seu coeficiente de partição, que é específico para cada composto. O resultado da acumulação de hidrocarbonetos na membrana biológica é uma alteração da estrutura e função da mesma, nomeadamente a atividade da enzima citocromo c oxidase é reduzida e a permeabilidade aos protões aumenta. Uma das modificações importantes é o aumento aparente da área da superfície da membrana, devido ao aumento da membrana após a

acumulação de compostos lipofílicos.<sup>135,136</sup> É afirmado também que a lipofilicidade é um parâmetro importante para o desenvolvimento de agentes antibacterianos. Ela aumenta com o aumento da cadeia de carbonos. As moléculas com cadeias de carbono acima do C10 são candidatos bastante lipofílicos e bons para a avaliação farmacológica.<sup>137</sup>

Kurek [et.al.],<sup>132</sup> defendem que os triterpenóides AU e AO podem afetar as enzimas que participam no metabolismo do peptidoglicano, tais como as proteínas envolvidas na síntese da parede celular, hidrólise, ou modificação, o que pode diminuir o peptidoglicano da ligação transversal e, assim, melhorar a sua suscetibilidade à mutanolisina.

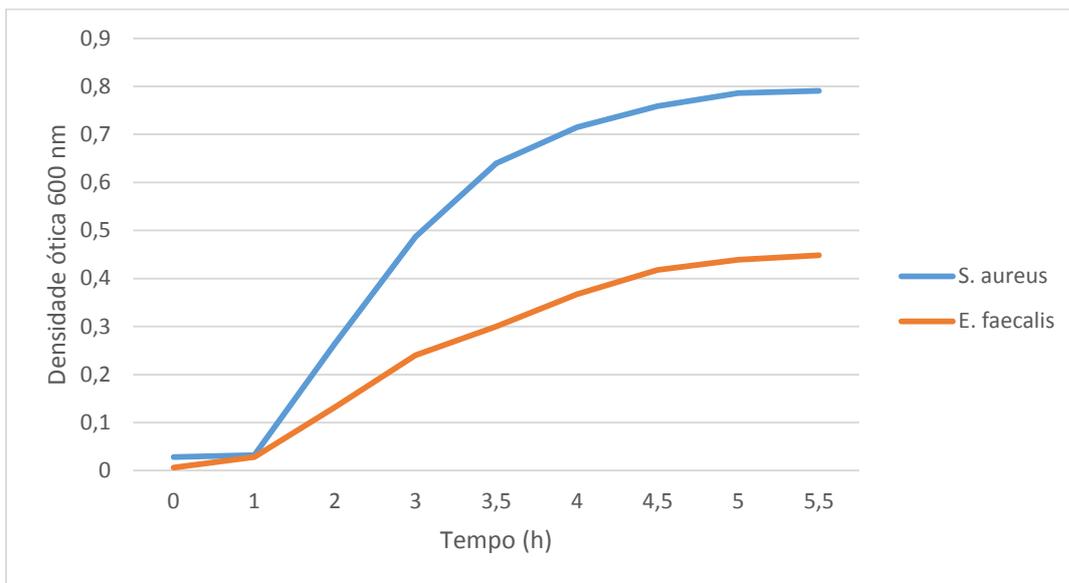
Léon e Moujir<sup>138</sup> defendem que os triterpenóides em combinação com os antibióticos metilina e vancomicina poderiam atuar em diferentes locais/alvos das bactérias que, teoricamente, poderiam levar quer a uma adição ou a um efeito sinérgico. Tem sido postulado que os triterpenóides zeilasteral e dimetilzeilasteral, exibiram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivo, através da inibição da síntese de DNA e síntese macromolecular de peptidoglicano em *Bacillus subtilis*. A inibição da síntese de peptidoglicano pode ser devido a danos na membrana da célula.

#### 4.4. Curvas de Crescimento Bacteriano

##### 4.4.1. Efeito do Ácido Ursólico e seu Derivado Semi-sintético na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

De forma a determinar o efeito antibacteriano dos compostos AU e I4 sobre as bactérias *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212, procedeu-se à determinação da sua taxa de crescimento em função do tempo de exposição. De referir que, estes dois compostos foram escolhidos pelo fato de serem aqueles que apresentaram melhores valores de CMI, e portanto, uma melhor atividade antibacteriana.

A partir dos valores obtidos por DO, foi possível definir uma curva de crescimento para cada uma das bactérias em estudo (figura 17).



**Figura 17.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

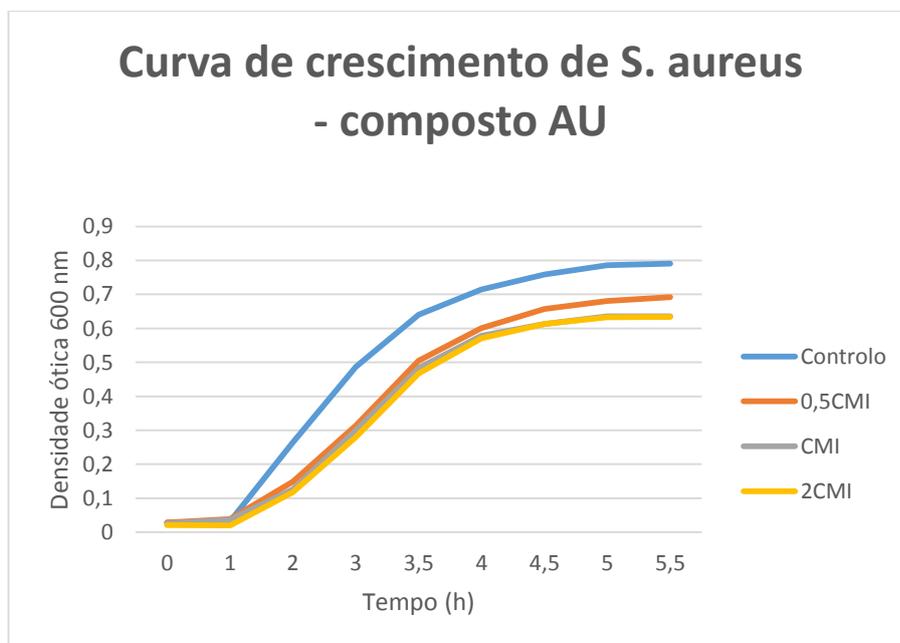
A análise destas curvas de crescimento indica que as culturas de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212, mantidas em meio MH, atingem a fase estacionária ao fim de cinco a cinco horas e meia de incubação. *S. aureus* apresenta um crescimento em função do tempo mais rápido que o da estirpe *E. faecalis*, comparando ambos os gráficos é visível a diferença entre as estirpes.

A partir da fase exponencial das curvas de crescimento definidas é possível determinar os parâmetros cinéticos de crescimento, nomeadamente a taxa específica de crescimento ( $k$ ) e o tempo de geração ( $g$ ). A  $k$  é a taxa de aumento da biomassa/número de células a cada intervalo de tempo, sendo que ela é constante e máxima na fase exponencial. O  $g$  é o intervalo de tempo requerido para que uma nova célula complete o ciclo de crescimento e divisão, dando origem a duas células filhas. Para determinar estes parâmetros, traçou-se uma curva de logaritmo (Log) da fase exponencial das curvas de crescimento.

#### 4.4.1.1. Efeito do Ácido Ursólico na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

##### 4.4.1.1.1. Curva de Crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 na Presença do Ácido Ursólico a Várias Concentrações

A figura 18 mostra as curvas de crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 na ausência (controlo) e na presença de AU com concentrações de 15,65 µg/mL, 31,3 µg/mL e 62,5 µg/mL, ou seja, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, respetivamente.



**Figura 18.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. aureus* em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

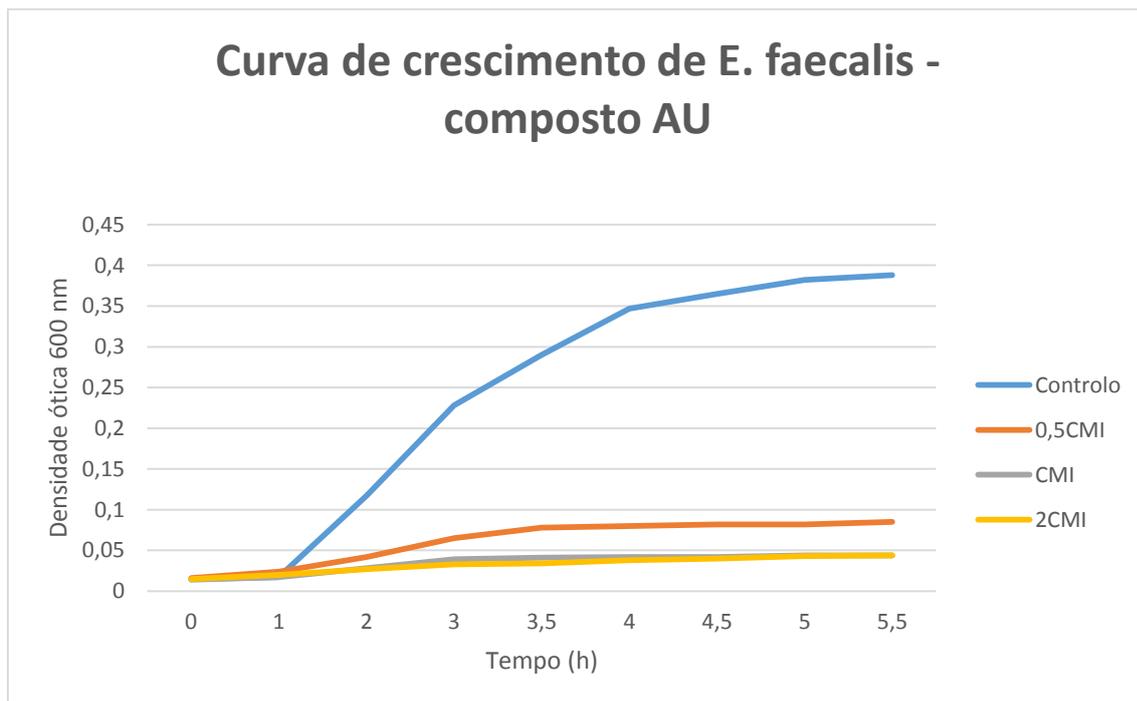
a) CMI - Concentração Mínima Inibitória.

Apesar de haver uma tendência de maior crescimento bacteriano no controlo, as diferenças estatísticas só foram observadas a partir de uma hora de incubação, altura em que o composto AU é adicionado. Durante o tempo de incubação, nas curvas com os compostos não se observaram diferenças significativas, apesar da taxa de crescimento da concentração 2×CMI ser sensivelmente menor face à CMI e esta por sua vez menor que 0,5×CMI.

A maior taxa de crescimento bacteriano foi observada no controlo. Desta forma podemos observar que há uma resposta negativa relativamente à adição do composto, ou seja, à medida que aumenta a sua concentração a taxa de crescimento diminui, no entanto não há lise celular pois a DO não baixa de forma abrupta.

#### 4.4.1.1.2. Curva de Crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 na Presença do Ácido Ursólico a Várias Concentrações

A figura 19 mostra as curvas de crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 na ausência (controlo) e na presença de AU com concentrações de 3,9 µg/mL, 7,8 µg/mL e 15,6 µg/mL, ou seja, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, respetivamente.



**Figura 19.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *E. faecalis* em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

a) CMI – Concentração Mínima Inibitória

É possível observar que existe claramente uma tendência de menor crescimento bacteriano na presença do composto AU. Durante o tempo de incubação com o composto não se

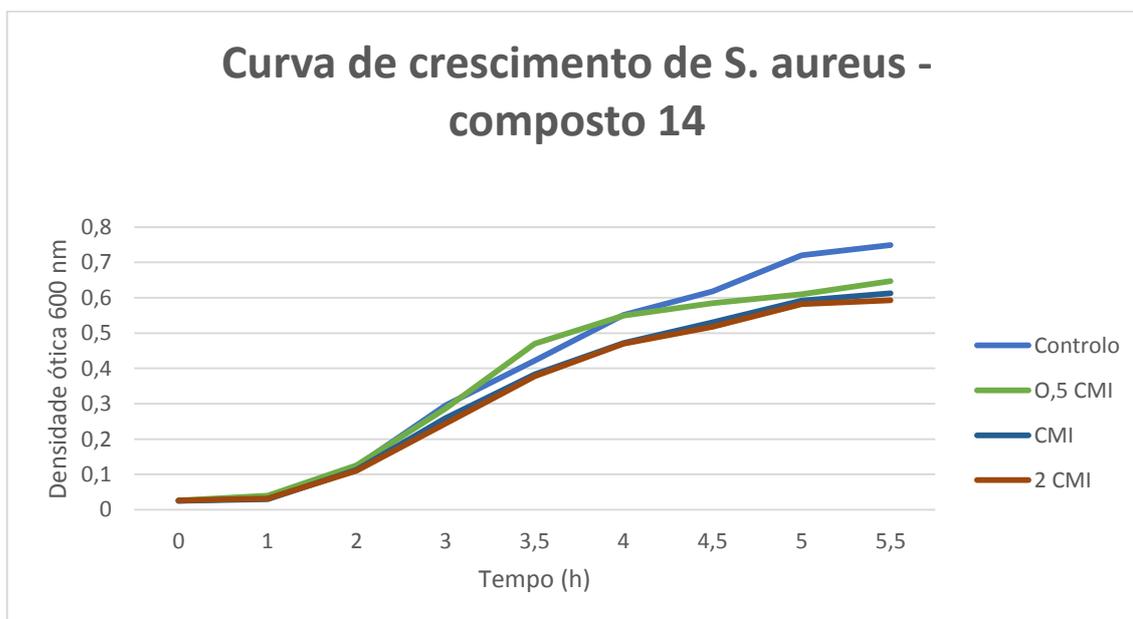
observaram diferenças significativas, apesar do declive da curva de 2×CMI ser ligeiramente menor face ao da CMI e esta, por sua vez, menor que 0,5×CMI.

O maior crescimento bacteriano foi observado no controlo, e tal deve-se à ausência de composto, e por sua vez, o menor crescimento foi observado em 2×CMI, onde a concentração de AU era maior. Desta forma podemos observar que há uma resposta negativa relativamente à adição do composto, ou seja, à medida que aumenta a sua concentração a taxa de crescimento diminui.

#### 4.4.1.2. Efeito do Derivado Semi-sintético do Ácido Ursólico na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

##### 4.4.1.2.1. Curva de Crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 na Presença do Composto 14 a Várias Concentrações

A figura 20 mostra as curvas de crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 na ausência (controlo) e na presença do composto 14 com concentrações de 31,3 µg/mL, 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, ou seja, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, respetivamente.



**Figura 20.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *S. aureus* em contato com o composto 14, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

a) CMI - Concentração Mínima Inibitória.

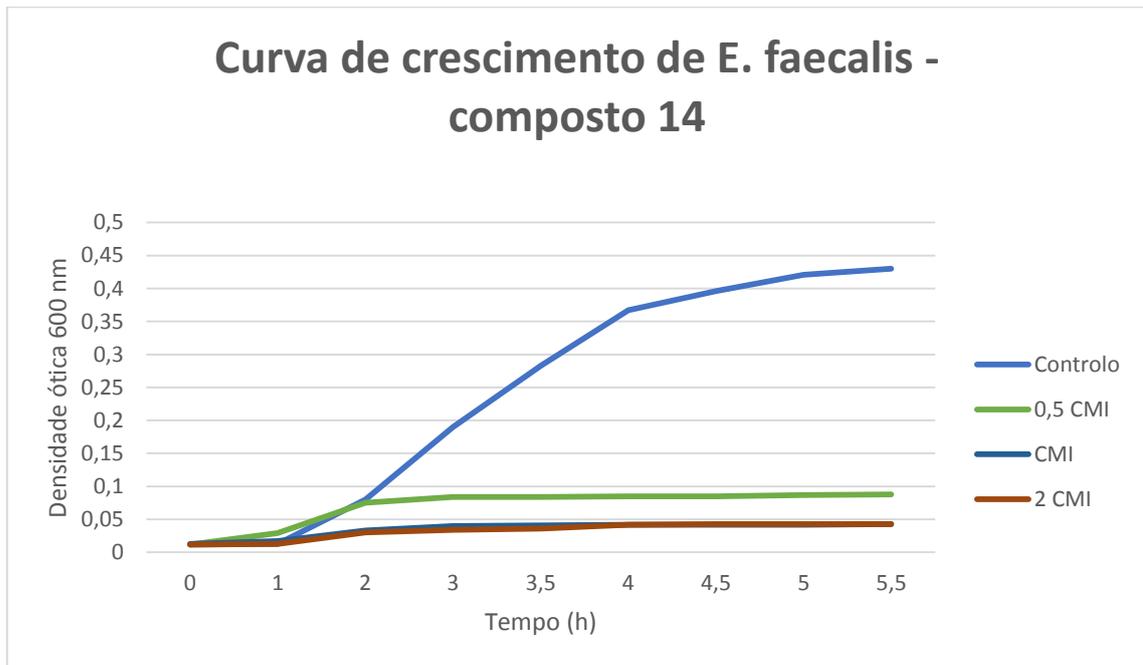
Apesar de haver uma tendência de maior crescimento bacteriano no controlo, as diferenças estatísticas só foram observadas a partir de 3 horas de incubação, momento onde se verifica um decréscimo considerável da taxa de crescimento CMI e 2×CMI.

Durante o tempo de incubação com o composto não se observaram diferenças significativas relativamente às curvas de 2×MIC e CMI, embora a taxa de crescimento em 0,5×CMI se ter mostrado um pouco mais elevada.

O maior crescimento bacteriano foi observado no controlo, e tal deve-se à ausência de composto, e por sua vez o menor crescimento foi observado em 2×CMI, onde a concentração do composto 14 era maior. Desta forma podemos observar que há uma resposta negativa relativamente à adição do composto, ou seja, à medida que aumenta a sua concentração a taxa de crescimento diminui, no entanto não há lise celular pois a DO não baixa de forma abrupta, indicando que a bactéria sofre um efeito bacteriostático por parte do composto 14.

#### **4.4.1.2.2. Curva de Crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 na Presença do Composto 14 a Várias Concentrações**

A figura 21 mostra as curvas de crescimento de *E. faecalis* ATCC 29212 na ausência (controlo) e na presença do composto 14 com concentrações de 15,6 µg/mL, 31,3 µg/mL e 62,5 µg/mL, ou seja, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, respetivamente.



**Figura 21.** Representação gráfica das curvas de crescimento de *E. faecalis* em contato com o composto 14, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

a) CMI – Concentração Mínima Inibitória

É possível observar que o composto 14 afeta significativamente o crescimento da estirpe. Durante o tempo de incubação com o composto não se observaram diferenças significativas relativamente às taxas das curvas de 2×CMI e CMI, e a curva de 0,5×CMI mostrou-se por sua vez maior relativamente às anteriores.

O maior crescimento bacteriano foi observado no controlo tal deve-se à ausência de composto e por sua vez o menor crescimento foi observado em CMI e 2×MIC, onde a concentração do composto 14 era maior.

#### 4.4.2. Parâmetros Cinéticos

O valor da inclinação (declive) da reta de semi-logaritmo das absorvâncias da fase exponencial das curvas de crescimento corresponde à taxa específica de crescimento ( $k$ ). O tempo de geração ( $g$ ) uma cultura em crescimento exponencial pode ser calculado a partir dessa inclinação, tendo em conta que:<sup>91</sup>

$$k = \frac{0,301}{g}$$

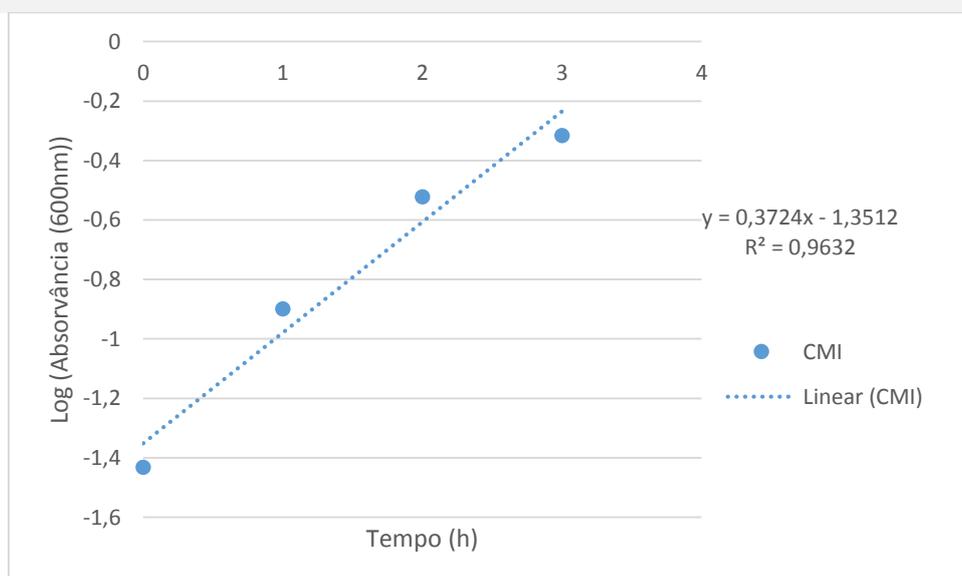
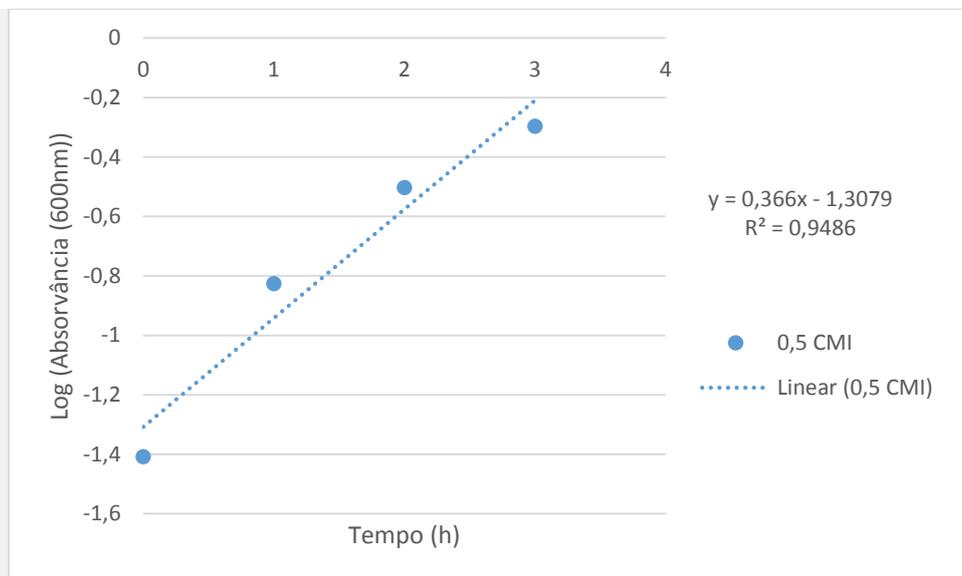
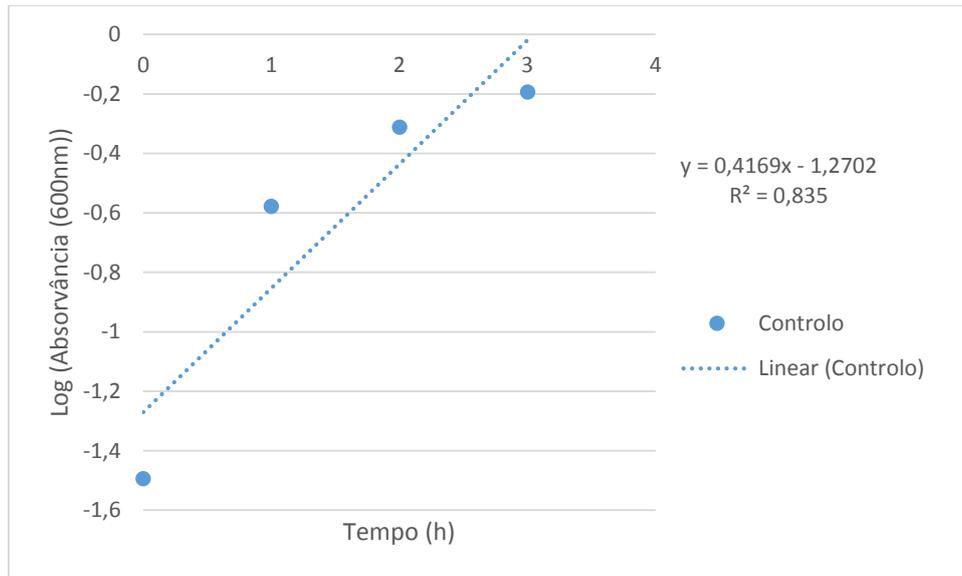
Logo:

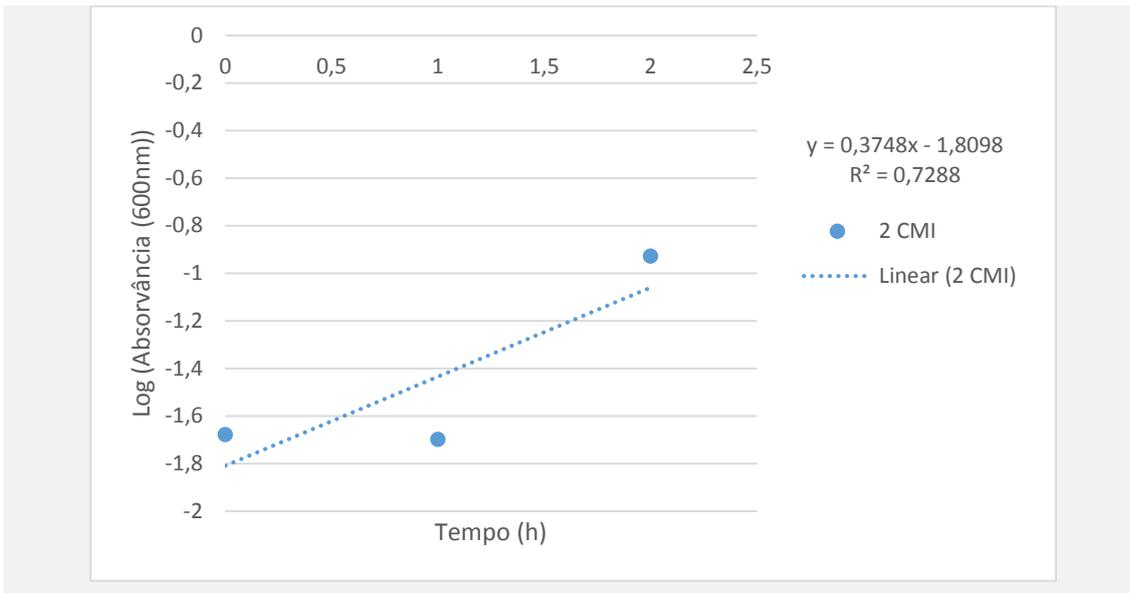
$$g = \frac{0,301}{k}$$

#### 4.4.2.1. Retas de Semi-logaritmo das Absorvâncias (600nm) da Fase Exponencial das Curvas de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212 na Presença do Ácido Ursólico a Várias Concentrações

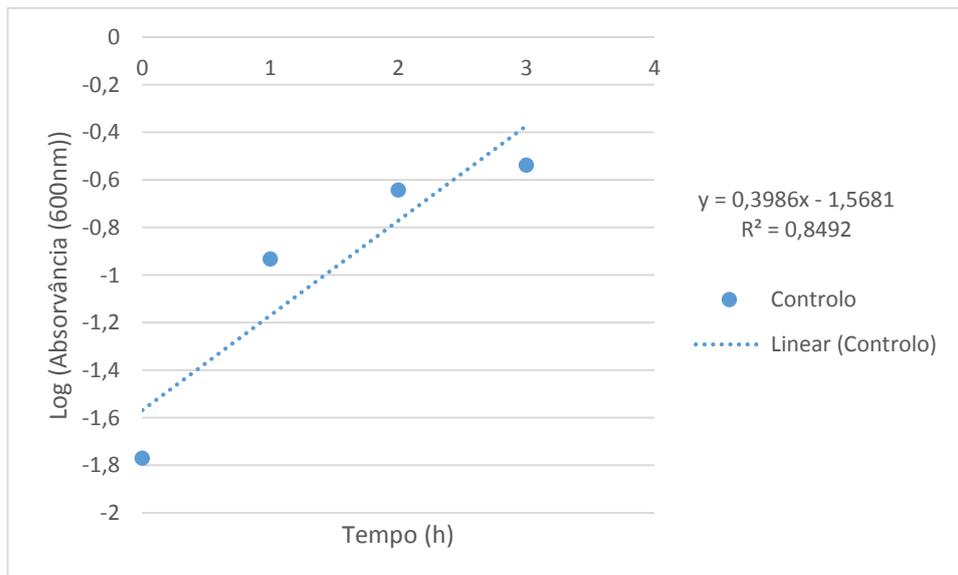
Para determinar os parâmetros cinéticos do crescimento na presença do ácido ursólico, em meio MH, a 37 °C, traçou-se uma reta de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento, para o controlo, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, repetivamente. Tabela 11, *S. aureus* e na tabela 12 *E. faecalis* na presença de AU, respetivamente. Da equação da reta verifica-se que o declive (a taxa específica de crescimento) é maior no controlo que nos outros, sendo que o crescimento com dupla CMI, não é muito alterado relativamente à CMI, sensivelmente o mesmo valor de declive, o que se verifica pela quase sobreposição das curvas, principalmente em *S. aureus*.

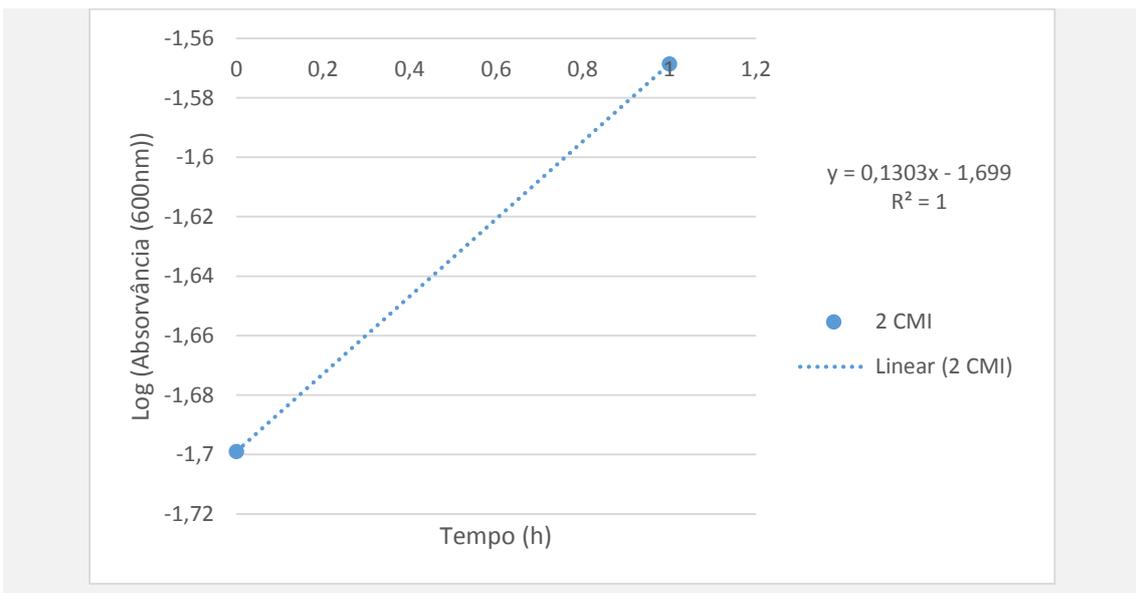
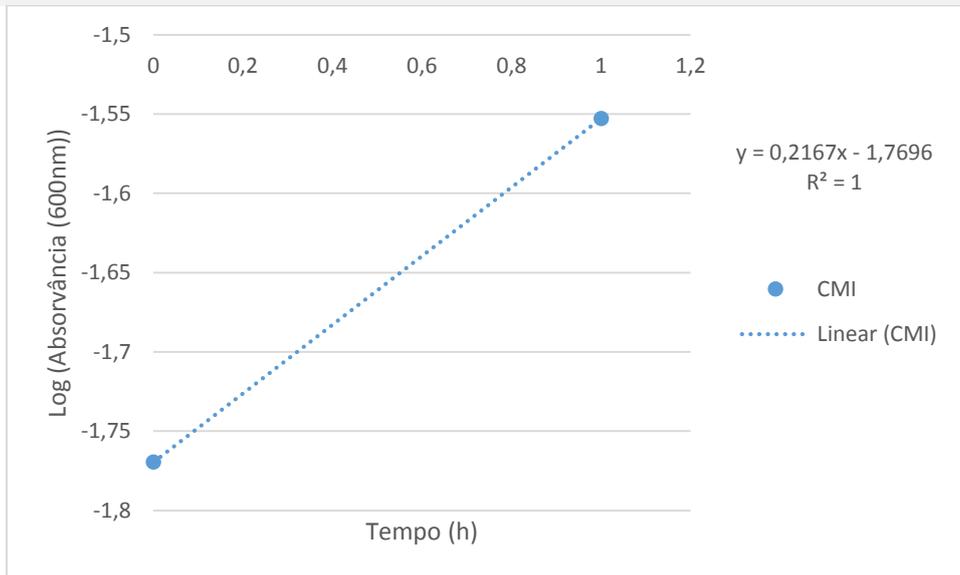
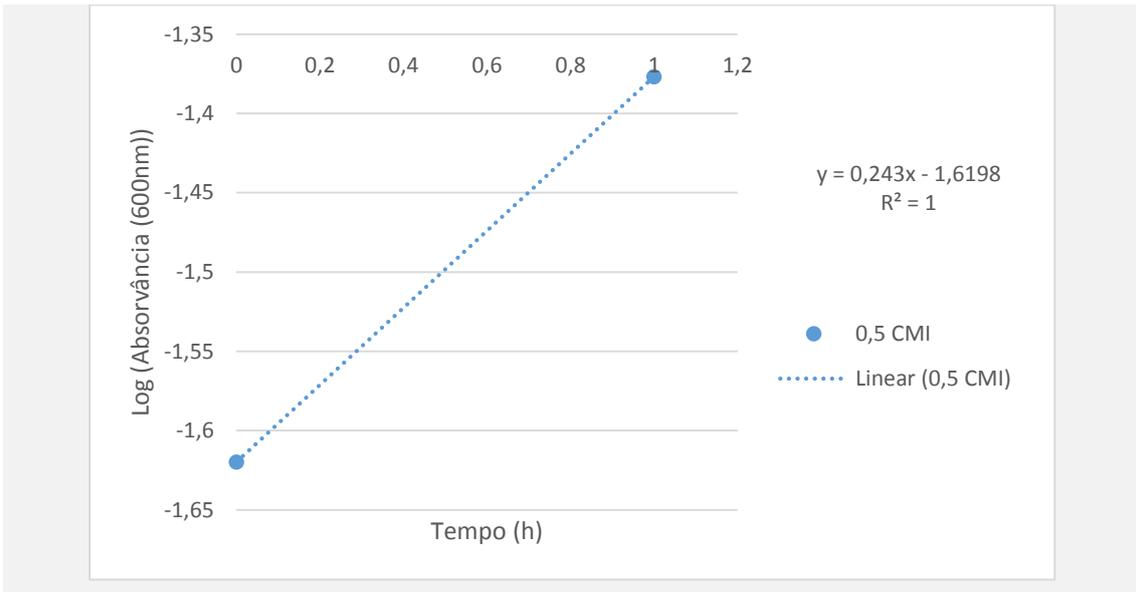
**Tabela II.** Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para *S. aureus* em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.





**Tabela 12.** Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controle e para as diferentes CMI para *E. faecalis* ATCC 29212 em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.





#### 4.4.2.2. Análise dos Parâmetros Cinéticos das Curvas de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e de *E. faecalis* ATCC 29212 na Presença do Ácido Ursólico a Várias Concentrações

Os resultados dos parâmetros cinéticos calculados são apresentados nas Tabelas 13 e 14. É de salientar que estes cálculos foram efetuados apenas para a fase exponencial de cada curva de crescimento e respetiva estirpe.

**Tabela 13.** Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para *S. aureus* ATCC 29213 em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

Parâmetros cinéticos	Controlo	0,5×MIC	MIC	2×MIC
k (h <sup>-1</sup> )	<b>0,417</b>	0,366	0,372	0,375
g (h)	0,722	0,822	0,808	0,803

**Tabela 14.** Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para *E. faecalis* ATCC 29212 em contato com o composto AU, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

Parâmetros cinéticos	Controlo	0,5×MIC	MIC	2×MIC
k (h <sup>-1</sup> )	<b>0,399</b>	0,243	0,217	0,130
g (h)	<b>0,755</b>	1,239	1,389	<b>2,310</b>

O conhecimento dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento permite prever a evolução da concentração de um microrganismo ao longo do tempo de crescimento exponencial. Neste caso específico *S. aureus* ATCC 29213 revelou ser a estirpe que menos tempo demorou a duplicar o número de células, refletindo-se na representação gráfica da sua curva de crescimento.

A k e o g foram similares para *S. aureus* tanto no controlo como na presença do composto AU, embora se observe que a k foi um pouco limitada pela presença do composto. Podemos então concluir que no controlo o aumento de *S. aureus* a cada intervalo de tempo é maior quando comparado com a presença de AU, no entanto o tempo necessário para duplicar o seu número de células é relativamente igual em ambos os casos.

Por sua vez *E. faecalis* ATCC 29212 foi a estirpe que revelou uma maior eficiência no tempo de duplicação das células, apresentando deste modo valores de  $k$  menores relativamente a *S. aureus*.

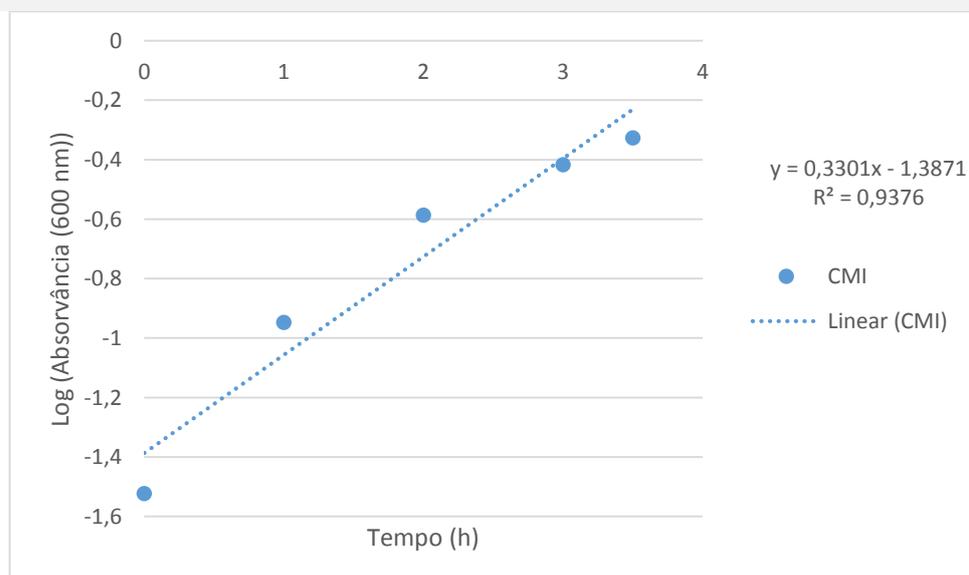
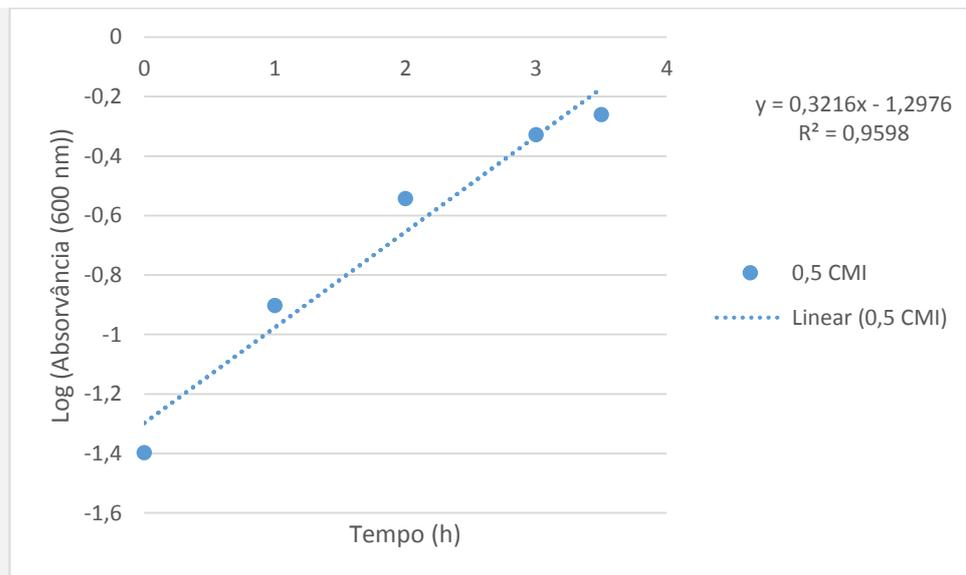
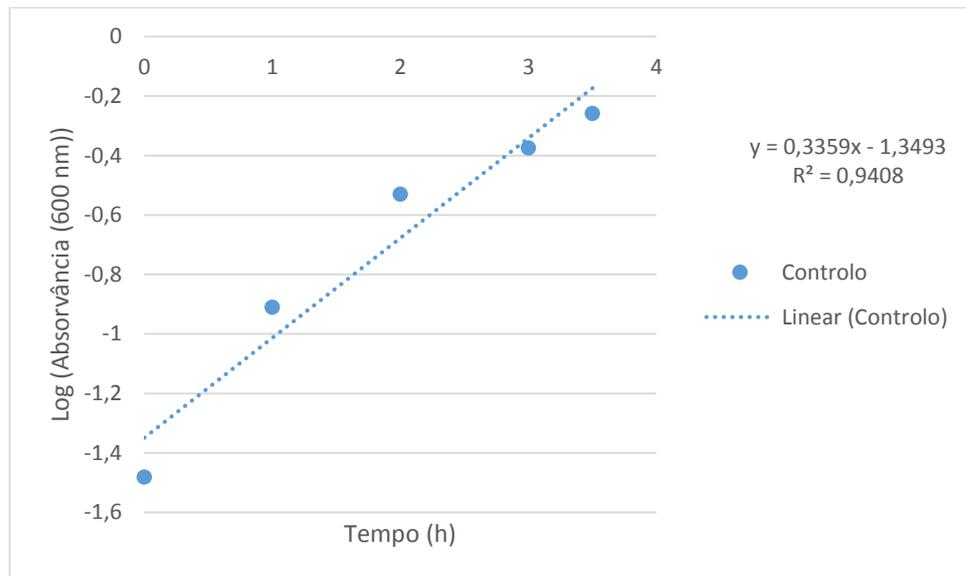
O facto de *E. faecalis* apresentar uma  $k$  mais baixa poderá explicar a melhor atividade antibacteriana do composto AU relativamente a *S. aureus*, pois como referido anteriormente AU tem um efeito bactericida em *E. faecalis*, enquanto em *S. aureus* este efeito é bacteriostático.

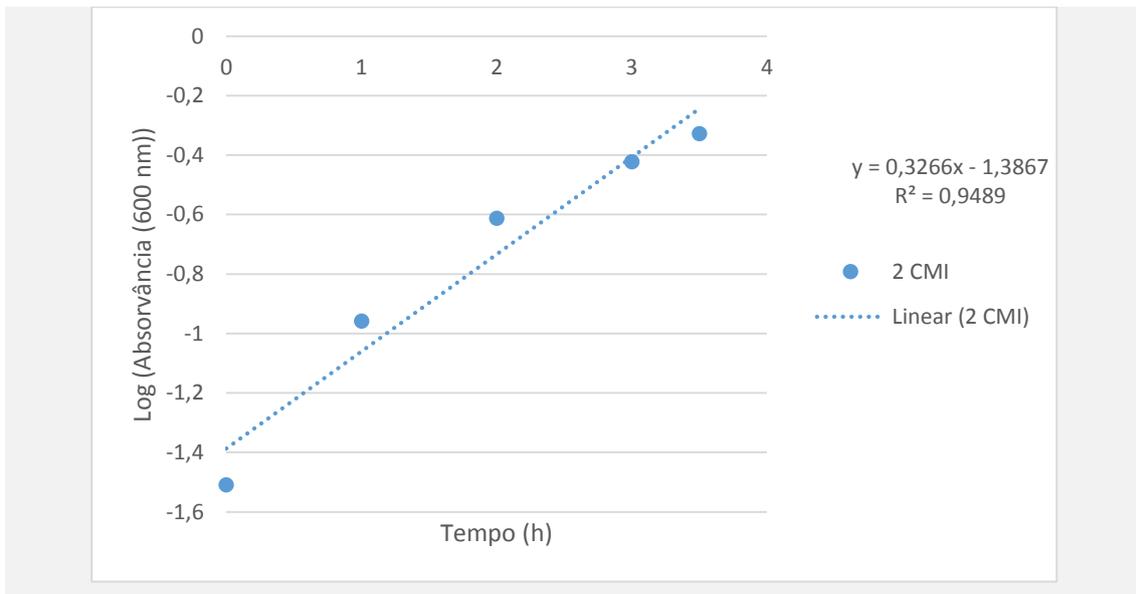
#### **4.4.2.3. Retas de Semi-logaritmo das Absorvâncias (600nm) da Fase Exponencial das Curvas de Crescimento de *S.aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 na Presença do Composto 14 a Várias Concentrações**

Para determinar os parâmetros cinéticos do crescimento na presença do composto 14, em meio MH, a 37 °C, traçou-se uma reta de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento, para o controlo, 0,5×CMI, CMI e 2×CMI, repetivamente. Tabela 15, *S. aureus* e na tabela 16 *E. faecalis* na presença de AU, respetivamente.

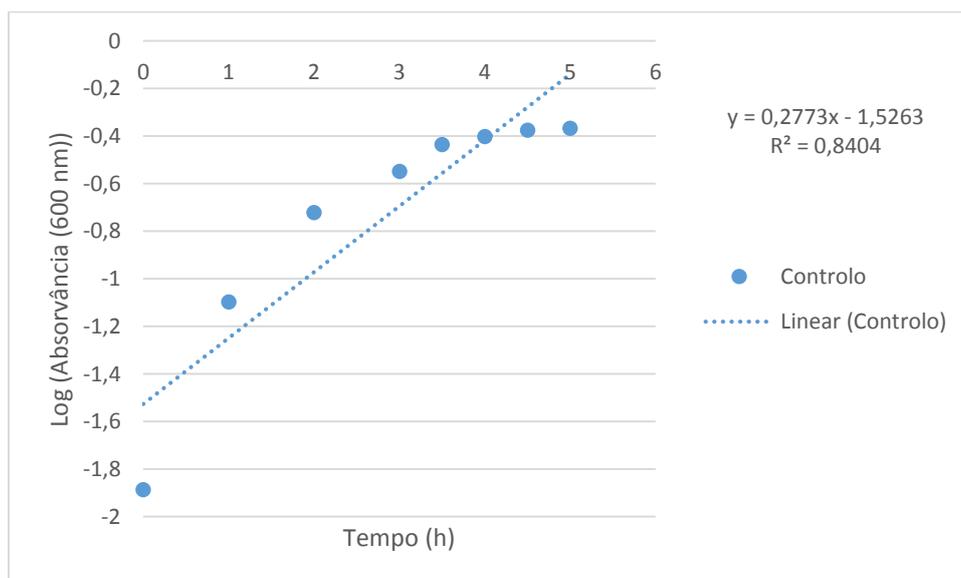
A inclinação é maior no controlo que nos outros, sendo que o crescimento com dupla CMI, não é muito alterado relativamente à CMI, sensivelmente o mesmo valor de declive. Dados semelhantes aos obtidos para AU.

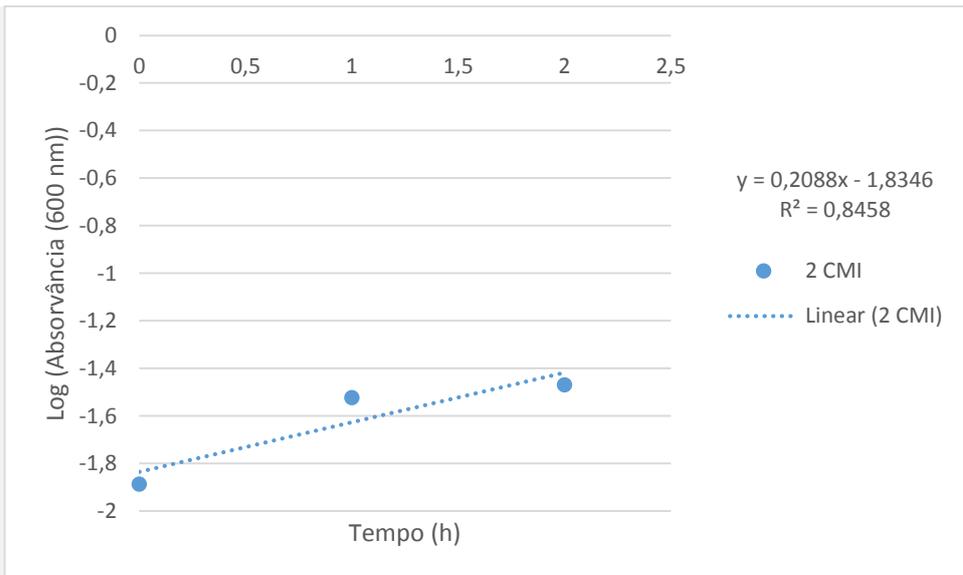
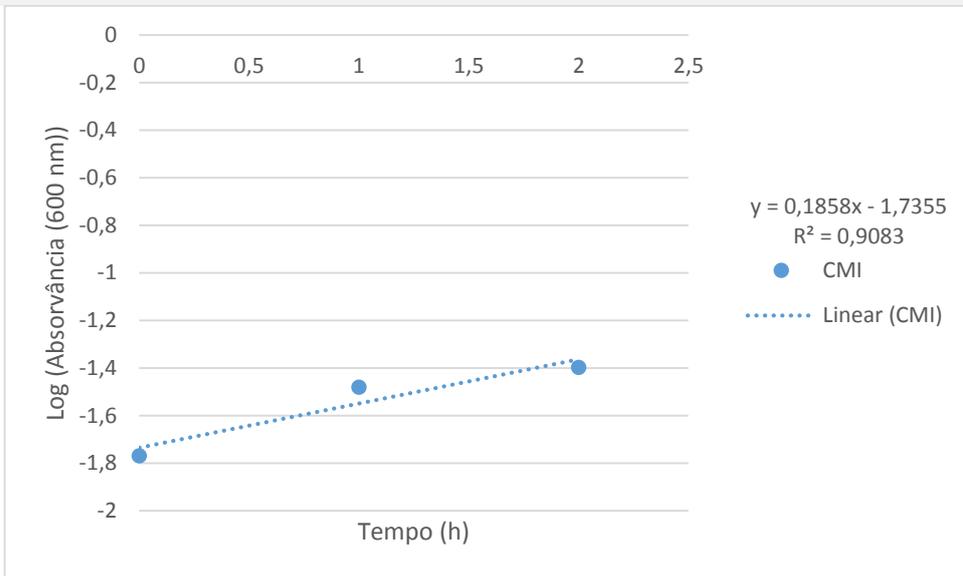
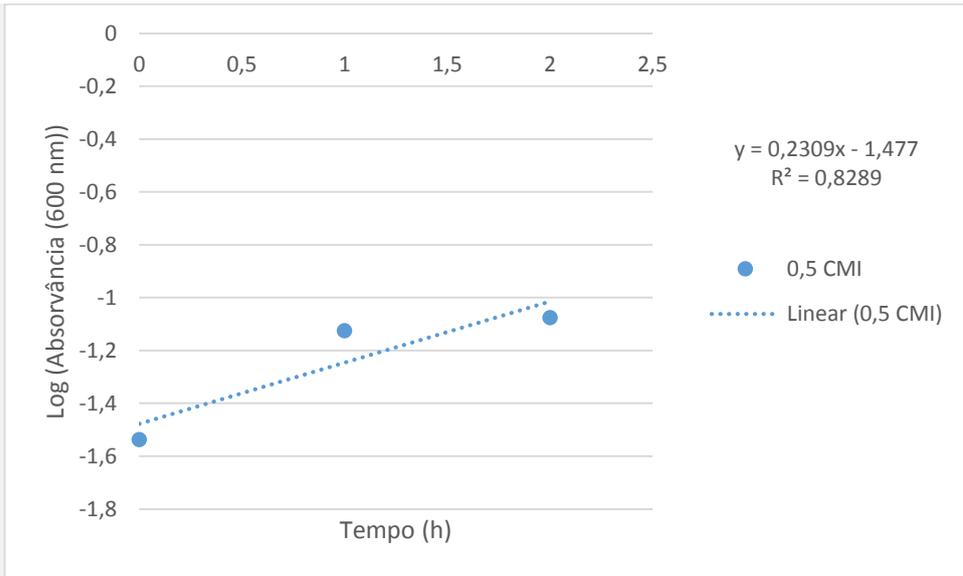
**Tabela 15.** Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI para *S. aureus* em contato com o composto 14, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.





**Tabela 16.** Representação gráfica das retas de semi-logaritmo das absorvâncias (600nm) da fase exponencial das curvas de crescimento para o controle e para as diferentes CMI para *E. faecalis* ATCC 29212 em contato com o composto I4, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.





#### 4.4.2.4. Análise dos Parâmetros Cinéticos das Curvas de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e de *E. faecalis* ATCC 29212 na Presença do Composto 14 a Várias Concentrações

Os resultados dos parâmetros cinéticos calculados são apresentados nas Tabelas 17 e 18. De referir que estes cálculos foram efetuados apenas para a fase exponencial de cada curva de crescimento e respetiva estirpe.

**Tabela 17.** Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para *S. aureus* ATCC 29213 em contato com o composto 14, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

Parâmetros cinéticos	Controlo	0,5×MIC	MIC	2×MIC
k (h <sup>-1</sup> )	<b>0,336</b>	0,322	0,330	0,327
g (h)	<b>0,896</b>	0,935	0,912	0,920

**Tabela 18.** Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento para o controlo e para as diferentes CMI's para *E. faecalis* ATCC 29212 em contato com o composto 14, por DO, em meio Mueller-Hinton, a 37°C.

Parâmetros cinéticos	Controlo	0,5×MIC	MIC	2×MIC
k (h <sup>-1</sup> )	<b>0,277</b>	0,231	0,186	0,209
g (h)	<b>1,087</b>	1,303	1,618	1,440

A k e o g foram similares para *S. aureus* tanto no controlo como em contato com o composto 14, no entanto é possível observar que a k foi um pouco limitada pela presença do composto.

*E. faecalis* ATCC 29212 revelou ser a estirpe que mais tempo demorou a duplicar o número de células. A presença do composto 14 limitou um pouco a taxa de aumento do número de células a cada intervalo de tempo, sendo a k menor para valores de CMI do que para o controlo. Tal reflete-se nos valores de g, onde por exemplo em 2×CMI este foi cerca de 0,4 vezes maior quando comparado com o controlo.

#### 4.4.3. Análise Geral do Efeito do Ácido Ursólico e seu Derivado Semi-sintético na Taxa de Crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212

Pela análise das curvas de crescimento bacteriano para as estirpes *S. aureus* e *E. faecalis* em contato com os compostos AU e I4 podemos concluir que ambos os compostos afetam o crescimento bacteriano das estirpes. No que diz respeito à análise dos parâmetros cinéticos o composto AU apresentou valores de  $k$  mais elevados em ambas as estirpes indicando assim que para os valores de  $0,5 \times \text{CMI}$ ,  $\text{CMI}$  e  $2 \times \text{CMI}$  de cada composto, o composto I4 foi aquele que melhor atividade bacteriana teve sobre as bactérias, ou seja, a taxa de aumento do número de células a cada intervalo de tempo foi menor.

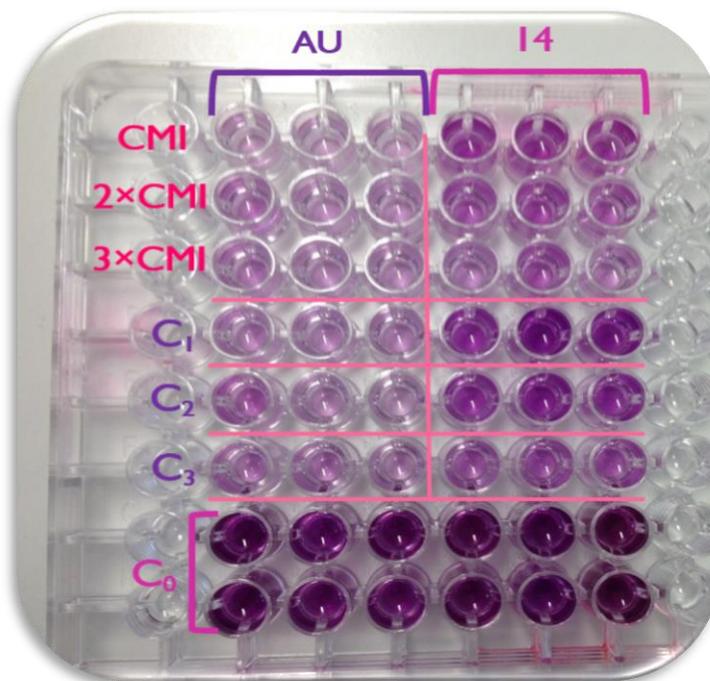
De referir que as curvas de crescimento,  $k$  e  $g$  acima apresentados são específicas para estas bactérias, para este meio e para este ensaio, uma vez que estes parâmetros se alteram facilmente consoante o meio em que as bactérias são desenvolvidas.

#### 4.5. Avaliação da Citotoxicidade

No desenvolvimento de novas moléculas é importante que uma atividade antibacteriana promissora não confira toxicidade para as células do hospedeiro. Muitos dos compostos que se apresentam inicialmente como promissores acabam por apresentar citotoxicidade em células do hospedeiro, não prosseguindo para avaliação clínica. Assim, no presente trabalho foi avaliada a toxicidade dos compostos AU e I4 em linhas celulares de macrófagos, recorrendo ao teste do MTT, após incubação com as respetivas concentrações  $\text{CMI}$ ,  $2 \times \text{CMI}$  e  $3 \times \text{CMI}$  (Figura 22).

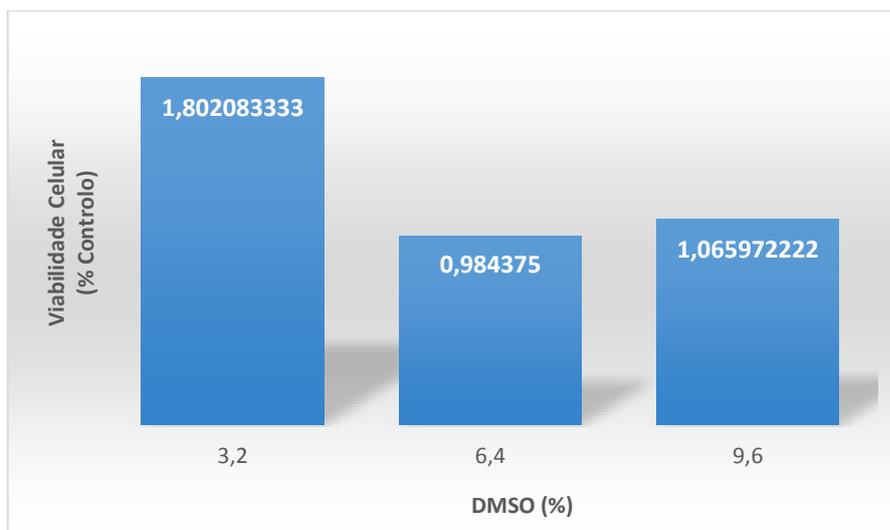
Foram utilizados quatro controlos:  $C_0$ : contendo apenas os macrófagos com o meio;  $C_1$ ,  $C_2$ , e  $C_3$ : contendo meio e DMSO a diferentes concentrações tendo em conta a dissolução dos compostos.

De referir que estes dois compostos foram selecionados pelo fato de serem aqueles que apresentaram valores de  $\text{CMI}$  mais baixos e portanto uma melhor atividade antibacteriana.



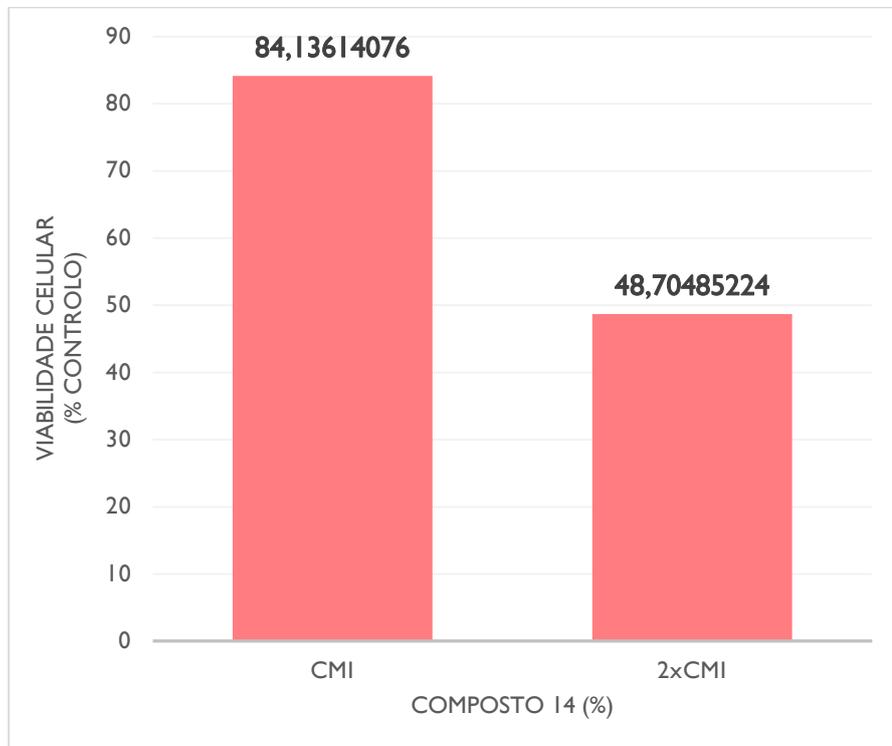
**Figura 22.** Placa de MTT em linhas celulares de macrófagos para avaliação da viabilidade celular dos compostos AU e I4 após incubação com as respectivas concentrações CMI, 2xCMI e 3xCMI. Quatro controles: C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, e C<sub>3</sub>. Ensaio feito em triplicado.

O veículo de dissolução apresentou toxicidade nos macrófagos a partir de 4  $\mu\text{L}/250 \mu\text{L}$  de volume total. Perante estes resultados não é possível concluir nada sobre a toxicidade do composto AU pois o DMSO foi tóxico para os macrófagos. O DMSO induziu toxicidade celular nos macrófagos, na CMI, uma vez que a viabilidade celular dos mesmos foi de 1,8 % quando comparado com o controlo (figura 23).



**Figura 23.** Viabilidade celular dos macrófagos na presença de DMSO, tendo em conta os diferentes controlos para CMI, 2xCMI e 3xCMI do composto AU.

O composto 14 não induziu toxicidade celular nos macrófagos, na CMI,, uma vez que a viabilidade celular dos mesmos foi de 84,14 % quando comparado com o controlo (figura 24).



**Figura 24.** Viabilidade celular dos macrófagos na presença do composto 14 a CMI e 2xCMI.

# **5. Conclusão**



## 5. Conclusão

A resistência bacteriana aos antibióticos é um importante problema de saúde pública a nível mundial, existindo o sério risco dos antibióticos atualmente utilizados deixarem de ser eficazes para o tratamento de doenças infecciosas, tornando eminente a procura de novas opções terapêuticas.

Os compostos testados mostraram melhor atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivo relativamente às Gram-negativo, provavelmente devido à presença da membrana externa nos últimos e à possível dificuldade de entrada dos compostos nas bactérias.

O composto AU e o derivado semi-sintético I4 foram de entre os compostos testados aqueles que apresentaram uma melhor atividade antibacteriana.

A atividade antibacteriana mostrou ser melhor em *E. faecalis* ATCC 29212 apresentando valores de taxas específicas de crescimento mais baixos, o que indica a inibição do crescimento bacteriano

Relativamente à relação estrutura-atividade antibacteriana verificou-se que a presença de um grupo oxigenado em C3 (hidroxilo, carbonilo ou acetato) assim como a presença de um grupo carboxilo em C17 e uma ligação  $\pi$  em  $\Delta^{12,13}$  são importantes para a atividade antibacteriana dos derivados triterpenóides.

O composto semi-sintético I4 não induziu toxicidade celular significativa em macrófagos o que, associado à sua atividade antibacteriana observada neste estudo, o coloca como potencial molécula de estudo para obtenção de possíveis compostos antibacterianos.

O trabalho futuro passará por sintetizar novos derivados semi-sintéticos de modo a aumentar o seu potencial e perfil antibacteriano (por exemplo, aumentar a permeabilidade celular e estender a bactérias Gram-negativo), testar a sua citotoxicidade e observar alterações nas membranas ou paredes celulares por microscopia eletrónica.

Em suma, confirma-se o potencial antibacteriano do ácido ursólico e de alguns dos seus derivados semi-sintéticos obtidos neste estudo pela primeira vez.



# **6. Referências**

## **Bibliográficas**



## 6. Referências Bibliográficas

1. FLEMING, A. - On the antibacterial action of cultures of a penicillin with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. J. Exp. Pathol. 10 (1929) 226-236.
2. OLIVEIRA, J.H. [et.al.] - Ácido Clavulânico e cefamicinas C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. Química Nova, 32,8 (2009) 2142-2150.
3. COHEN, M. L. - Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. Science 257 (1992) 1050-1055.
4. VORSATZ, Carla de Mello et al - **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2005. ISBN 85-86804-28-2.
5. ANDREWS, J. M. - Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 (2001) 5-16.
6. PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. - Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. Clinical Infectious Diseases 38 (2004) 864-70.
7. ROLINSON, G. N. - Forty years of  $\beta$ -lactam research. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41 (1998) 589-603.
8. World Health Organization - **The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action**. GPS PUBLISHING, France (2012). ISBN 978 92 4 150318 1. [Acedido a 20 de Setembro de 2014]. Disponível na internet: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf)
9. KOTRA, L. P.; MOBASHERY, S. - Mechanistic and Clinical Aspects of b-Lactam Antibiotics and b-Lactamases. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 47 (1999) 211-216.
10. SALYERS, A. A.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F. - Why Are Antibiotic Resistance Genes So Resistant to Elimination? Antimicrobial agents and chemotherapy 41, 11, (1997) 2321-2325.

11. COLLIGNON, P. [et.al.] - World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. *Clinical Infectious Diseases* 49 (2009) 132-141.
12. MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. - Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ* 180, 4 (2009) 408-415.
13. HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, M. B.; MARTÍNEZ, J. L. - Quinolone resistance: much more than predicted. *Frontiers in Microbiology* 2 (2011) 1-6.
14. SOULI, M [et.al.] - Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *EUROSURVEILLANCE* 13 (2008) 1-11.
15. GUEDRAITIENÉ, A. [et.al.] - Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)* 47, 3 (2011) 137-46.
16. BUFFET-BATAILLON, S. [et.al.] - Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds - a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39 (2012) 381-389.
17. MARTINEZ, J. L. - Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 157 (2009) 2893-2902.
18. ONWUBIKO, N. E.; SADIQ, N. M. - Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwestern Nigeria. *Pan African Medical Journal* 8, 4 (2011) 1-7.
19. KUREK, A. [et.al.] - Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine* 19 (2012) 515-519.
20. World Health Organization - **Containing antimicrobial resistance**. Geneva (2005). [Acedido a 20 de Setembro de 2014]. Disponível na internet: <http://www.who.int/management/anmicrobialresistance.pdf>
21. OKEKE, I. N. [et.al.] - Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment. *Lancet Infect Dis* 5 (2005) 568-80.
22. LIVERMORE, D. M. - Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 5 (2005) 450-59.
23. GRUNDMANN, H. [et.al.] - A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug Resistance Updates* 14 (2011) 79-87.
24. BRONZWAER, S. L.A.M. [et.al.] - The Relationship between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 8, 3, (2002) 278-282.
25. Direção Geral de Saúde - **Programa nacional de Prevenção das Resistências aos Antimicrobianos**. (2009). [Acedido a 22 de Setembro de 2014]. Disponível na internet:

- [https://www.google.pt/search?q=Dire%C3%A7%C3%A3o+Geral+de+Sa%C3%BAde+-+Programa+nacional+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+das+Resist%C3%AAs+aos+Antimicrobianos.+ \(2009\).&oq=Dire%C3%A7%C3%A3o+Geral+de+Sa%C3%BAde+-+Programa+nacional+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+das+Resist%C3%AAs+aos+Antimicrobianos.+ \(2009\).&aqs=chrome..69i57.728j0j9&sourceid=chrome&es\\_sm=93&ie=UTF-8](https://www.google.pt/search?q=Dire%C3%A7%C3%A3o+Geral+de+Sa%C3%BAde+-+Programa+nacional+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+das+Resist%C3%AAs+aos+Antimicrobianos.+ (2009).&oq=Dire%C3%A7%C3%A3o+Geral+de+Sa%C3%BAde+-+Programa+nacional+de+Preven%C3%A7%C3%A3o+das+Resist%C3%AAs+aos+Antimicrobianos.+ (2009).&aqs=chrome..69i57.728j0j9&sourceid=chrome&es_sm=93&ie=UTF-8)
26. JUCKER, Ernst - **Progress in Drug Research, natural compounds as drugs. Volume I.** 1ª Ed. Basel – Boston – Berlin: Birkhäuser Verlag AG, 2008. ISBN 978-3-7643-8098-4.
  27. MUKHERJEE, AK. [et.al.] - Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1467-1486.
  28. NEWMAN, DJ; CRAGG, GM; SNADER, KM. - The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17 (2000) 215-234.
  29. McCHESNEY, J. D. [et.al.] - Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68 (2007) 2015-2022.
  30. CHIN, Y.-W. [et.al.] - Drug Discovery From Natural Sources. *The AAPS Journal* 8, 2 (2006) 239-253.
  31. BUTLER, M. S. - Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22 (2005) 162-195.
  32. BUTLER, M. S. - Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 25 (2008) 475-516.
  33. HARVEY, A. L. - Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 13 (2008) 894-901.
  34. GANESAN, A. - The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* 12 (2008) 306-317.
  35. CLARDY, J.; WALSH, C. - Lessons from natural molecules. *Nature* 432 (2004) 829-837.
  36. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. - Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 1022-1037.
  37. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. - Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461-477.
  38. NEWMAN, D. J. - Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2589-2599.
  39. BUTLER, M. S. - The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 2141-2153.

40. PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. - The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. *Science* 310 (2005) 451-453.
41. LAM, K. S. - New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology* 15, 6 (2007) 279-289.
42. GULLO, V. P. - Drug discovery from natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33 (2006) 523-531.
43. KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. - The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 206-220.
44. HARVEY, A. L - Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today* 5 (2000) 294-300.
45. BAKER, D.D. [et.al.] - The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 1225-1244.
46. LI, J. W-H.; VEDERAS, J. C. - Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* 325 (2009) 161-165.
47. BALUNAS, M.J; KINGHORN, A.D. - Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78 (2005) 431-441.
48. GALM, U.; SHEN, B. - Natural Product Drug Discovery: The Times Have Never Been Better. *Chemistry & Biology* 14 (2007) 1098-1104.
49. LIU, J. - Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 49 (1995) 57-68.
50. BECKER, H. [et.al.] - Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia* 76 (2005) 580-584.
51. DJOUKENG, J.D. [et.al.] - Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 101 (2005) 283-286.
52. KUETE, V. [et.al.] (2007a) - Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 114 (2007) 54-60.
53. KUETE, V. [et.al.] (2007b) - Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. *Pharmazie* 62 (2007) 552-556.
54. HEMMERLIN, A.; HARWOOD, J.L.; BACH, T.J. - A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Progress in Lipid Research* 51 (2012) 95-148.
55. FABIO A. [et.al.] - Screening of the Antibacterial Effects of a Variety of Essential Oils on Microorganisms Responsible for Respiratory Infections. *Phytother. Res.* 21 (2007) 374-377.

56. BURT, S. - Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 223-253.
57. BAKKALI, F. [et.al.] - Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446-475.
58. BERTHELOT, K. [et.al.] - Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie* 94 (2012) 1621-1634.
59. SANTOS, F. A. [et.al.] - 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 579-584.
60. MUFFLER, K. [et.al.] - Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46 (2011) 1-15.
61. XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. - On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65 (2004) 261-291.
62. CATCHPOLE, O. J.; KAMP, J-C.; GREY, J. B. - Extraction of Squalene from Shark Liver Oil in a Packed Column Using Supercritical Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36 (1997) 4318-4324.
63. PIETSCH, A.; JAEGER, P. - Concentration of squalene from shark liver oil by short-path distillation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (2007) 1077-1082.
64. SHIBUYA, M. [et.al.] - Origin of structural diversity in natural triterpenes: Direct synthesis of seco-triterpene skeletons by oxidosqualene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1450-1455.
65. KUSHIRO, T. [et.al.] - Chimeric triterpene synthase. A possible model for multifunctional triterpene synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 1208-1216.
66. ABE, I. - Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 1311-1331.
67. DZUBAK, P. [et.al.] - Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 23 (2006) 394-411.
68. COLLINS, M A.; CHARLES, H. P. - Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology* 4 (1987) 311-315.
69. LIU, J. - Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 92-94.
70. RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N. R. - Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and

- DNA damage in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions* 176 (2008) 99-107.
71. SOSA, S. [et.al.] - Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 12 (2005) 271-277.
72. KANG, S. [et.al.] - The anti-arthritic effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models. *JPP* 60 (2008) 1347-1354.
73. IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. - Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 26-42.
74. MACHADO, D.G. [et.al.] - Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis L.* in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 103 (2012) 204-211.
75. CHINO, I. [et.al.] - Cytotoxic activity of *Origanum dictamnus*. *Fitoterapia* 78 (2007) 342-344.
76. DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. - Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters* 215 (2004) 129-140.
77. HORIUCHI, K. [et.al.] (2007a) - Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 2 (2007) 287-290.
78. HORIUCHI, K. [et.al.] (2007b) - Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from *Salvia officinalis* and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.* 30, 6 (2007) 1147-1149.
79. CUNHA, S., L. C., [et.al.] - Antibacterial Activity of Triterpene Acids and Semi-Synthetic Derivatives against Oral Pathogens. *Z. Naturforsch.* 62 (2007) 668-672.
80. WOLSKA, K. I. [et.al.] - Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Cent. Eur. J. Biol.* 5, 5 (2010) 543-553.
81. SUN, H. [et.al.] - Structure-activity relationships of oleanane and ursane type triterpenoids. *Botanical Studies* 47 (2006) 339-368.
82. LEAL, A. [et.al.] (2012a) - Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21waf1 and NOXA in pancreatic cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (2012) 5774-5786.
83. LEAL, A. [et.al.] (2012b) - Semisynthetic Ursolic Acid Fluorolactone Derivatives Inhibit Growth with Induction of p21waf1 and Induce Apoptosis with Upregulation of NOXA and Downregulation of c FLIP in Cancer Cells. *ChemMedChem* 7 (2012) 1635-1646.

84. KALANI, K. [et.al.] - Pharmacophore, QSAR, and ADME based semisynthesis and in vitro evaluation of ursolic acid analogs for anticancer activity. *J Mol Model* 18 (2012) 3389-3413.
85. TANAKA, K. [et.al.] - Auxiliary-directed oxidation of ursolic acid by 'Ru'-porphyrins: chemical modulation of cytotoxicity against tumor cell lines. *Tetrahedron Letters* 53 (2012) 1756-1759.
86. JAMES, J. T.; DUBERY, I. A. - Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules* 14 (2009) 3922-3941.
87. MENG, Y.Q. [et.al.] - The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 848-854.
88. MENG, Y.Q. [et. al.] - Synthesis of Novel Ursolic Acid Derivatives. (2010).
89. LACAZ-RUIZ, Rogério – **Manual prático de Microbiologia**. 1ª Ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2000. ISBN: 85-314-0549-8.
90. TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. – **Microbiologia**. 10ª Ed. Brasil: Artmed Editora SA, 2012. ISBN: 9780321550071.
91. MADIGAN, M. T. et al. – **Microbiologia DE BROCK**. 12ª Ed. Brasil: Artmed Editora SA, 2010. ISBN: 978-0-132-32460-1.
92. USP- **Pharmacists' Pharmacopeia 2008-2009**. Estados Unidos da América: 2ª Ed, 2009. [Acedido a 6 de Janeiro de 2015]. Disponível na internet: [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/products/usp2008p2supplement3.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/products/usp2008p2supplement3.pdf)
93. Indian Pharmacopoeia Commission - **Indian Pharmacopeia 2007**. India: 1ª Ed, 2007. ISBN: 81-903436-0-3. [Acedido a 6 de Janeiro de 2015]. Disponível na internet: [http://www.academia.edu/4644677/INDIAN\\_PHARMACOPOEIA\\_2007\\_Volume\\_1;](http://www.academia.edu/4644677/INDIAN_PHARMACOPOEIA_2007_Volume_1;) [http://ajprd.com/download ebooks\\_pdf/9.pdf](http://ajprd.com/download ebooks_pdf/9.pdf) e [http://ajprd.com/download ebooks\\_pdf/10.pdf](http://ajprd.com/download ebooks_pdf/10.pdf)
94. CLSI - **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing seventeenth informational supplement**. 7ª Ed. U.S.A: Norma M100-S17 (2007). [Acedido a 11 de Março de 2014]. Disponível na internet: <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>
95. CLSI – **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 11ª Ed. U.S.A.: Norma M02-A11 (2012). [Acedido a 11 de Março de 2014]. Disponível na internet: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf>

96. BAUER, A. W. [et.al.] - Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology 45, 4 (1966) 493-496.
97. CLSI - **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**. 8ª Ed. U.S.A.: Norma M2-A8 (2010). [Acedido a 11 de Março de 2014]. Disponível na internet: [http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)
98. EUCAST - **Clinical breakpoint tables. VERSÃO 4.0 (2014)**. [Acedido a 11 de Março de 2014]. Disponível na internet: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
99. ADWAN, G.; MHANNA, M. - Synergistic Effects of Plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. East Journal of Scientific Research 3, 3 (2008) 134-139.
100. AIYEGORO, AO.; OKOH, AI. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: implications in antimicrobial chemotherapy. Journal of medical plants research 3 (2009) 1147-1152.
101. CLSI - **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 17ª Ed. U.S.A. (2006) ISBN 1-56238-587-9.
102. ALVES, M. J. [et.al.] - A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Planta Med. 78, (2012) 1707-1718.
103. MADIGAN, Michael T. et al. – BROCK Biology of Microorganisms. 13ª Ed. San Francisco: Pearson Education, 2012. ISBN: 978-0-321-64963-8.
104. CHAN, E.C.S.; PELCZAR JR., J.M.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª Ed. Makron Books. São Paulo (2005).
105. STANIER, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A.,. **General Microbiology**. 3ª Ed. Macmillan Student Editions. 1971.
106. CANTÓN E., PEMÁN J. Curvas de letalidade en antifúngicos. Rev Iberoam Micol. 16 (1999) 82-85.
107. DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. - Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. Revista Matéria 12, 1 (2007) 134-139.
108. KROLL, A. [et.al.] - Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 72 (2009) 370-377.
109. MOSMANN, T. - Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods 65, (1983) 55-63.

110. 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* 89 (1986) 271-277.
111. LIU, Y. – Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular bitt reduction to altered cellular cholesterol homeostatis. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.* 23 (1999) 377-395.
112. VARONA, S. R. [et.al.] - Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (2006) 2183-2195.
113. LIU, Y. [et.al.] – Mechanism of Cellular 3- (4,5 Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* 69, (1997) 581-593.
114. CHAPDELAIN, J. M. - MTT reduction - a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. *Pharmakon Research International*, (2010) 1-6.
115. SHAHID, M., MALIK, A., SHEEBA. - Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC  $\beta$ -lactamases isolated from hospitalized burn patients in a tertiary care hospital of North India. *FEMS Microbiology Letters* 228 (2003) 181-186.
116. SHAHID, M. et al - Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated cefoxitin resistance. *International Journal of Infectious Diseases* 12 (2008) 256-264.
117. HU, H-B. [et.al.] - Constituents of the Root of *Anemone tomentosa*. *Arch Pharm Res* 34, (2011) 1097-1105.
118. WONG, K-C., ALI M. H., D., BOEY, P-L. Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. *Natural Product Research* 26, 7 (2012) 609-618.
119. SINGH, B.; SINGH, S. - Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytother. Res.* 17 (2003) 814-816.
120. WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. - Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16 (2009) 97-110.
121. CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. - Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 10, 25 (2011) 1-6.

122. MULYANINGSIH, S. [et.al.] - Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 17 (2010) 1061-1066.
123. GE, F. [et.al.] - In vitro synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology* 59 (2010) 567-572.
124. SHAI, L. J. [et.al.] - Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. Leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 119 (2008) 238-244.
125. FONTANAY, S. [et.al.] - Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *Journal of Ethnopharmacology* 120 (2008) 272-276.
126. MAKBOUL, A. [et.al.] - A new pentacyclic triterpenoid from the leaves of *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. *Natural Product Research* 27, 21 (2013) 2046-2052.
127. MALLAVADHANI, U. V. [et.al.] - Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 10 (2004) 1576-1579.
128. NASCIMENTO, P. G.G. [et.al.] - Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivatives. *Molecules* 19 (2014) 1317-1327.
129. ELOFF, J. N. - A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica* 64 (1998) 711-713.
130. Masoko, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. - Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 99 (2005) 301-308.
131. PACHECO, A. G. [et.al.] - **Relationships Between Chemical Structure and Activity of Triterpenes Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 1-24. [Acedido a 15 de Outubro de 2014]. Disponível na internet: <http://www.intechopen.com/books/a-search-for-antibacterial-agents/relationships-between-chemical-structure-and-activity-of-triterpenes-against-gram-positive-and-gram->
132. KUREK, A. [et.al.] - Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie van Leeuwenhoek* 97 (2010) 61-68.
133. HICHRI, F. [et.al.] - Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *C. R. Chimie* 6 (2003) 473-483.

134. SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. - Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membran. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 269, 11 (1994) 8022-8028.
135. MACHLEIDT, H.; ROTH, S.; SEEMAN, P. [et.al.] - THE HYDROPHOBIC EXPANSION OF ERYTHROCYTE MEMBRANES BY THE PHENOL ANESTHETICS. Biochim. Biophys. Acta, 255 (1972) 178-189.
136. SEEMAN, P. – The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacological reviews 24, 2 (1972) 583-655.
137. TOKUYAMA, R. [et.al.] - Structure-Activity Relationship (SAR) Studies on Oxazolidinone Antibacterial Agents. 2. Relationship between Lipophilicity and Antibacterial Activity in 5-Thiocarbonyl Oxazolidinones. Chem. Pharm. Bull. 49, 4 (2001) 353-360.
138. DE LÉON, L.; MOUJIR, L. - Activity and mechanism of the action of zeylasterone against *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Microbiology 104 (2008) 1266–1274.