

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

JÉSSICA CRECENCIO MATEI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS
HIDROALCOÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA E CHÁ PRETO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA
2015

JÉSSICA CRECENCIO MATEI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS
HIDROALCOÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA E CHÁ PRETO**

Projeto de pesquisa, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Giselle Maria Maciel

CURITIBA
2015

JÉSSICA CRECENCIO MATEI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS
HIDROALCOÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA E CHÁ PRETO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Profa. Dra. Marlene Soares
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientadora – Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenador de Curso – Prof. Alessandro Feitosa Machado

Curitiba, 01 de julho de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que me conduz sempre ao melhor caminho.

Aos meus pais, por me ajudarem em tudo, fazendo até o impossível. Por me ampararem nas horas difíceis, de choros e desespero. Obrigada por todo o carinho e dedicação em mais esta etapa da minha vida.

Ao Marcelo, pelo amor, companheirismo e paciência que me transmitia. Que me fez enxergar a luminosidade no fim dessa travessia.

Às minhas amoras, Luma, Amanda, Vanessa e Paloma, que suportaram minhas crises e que fizeram toda a trajetória do curso mais divertida. Obrigada pela amizade de vocês, que tenho certeza, levarei pra vida toda.

Aos colegas dos laboratórios de microbiologia e biotecnologia, pelo auxílio e pelas conversas rotineiras.

Aos professores do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi), por me passarem seus conhecimentos. Em especial agradeço, além de minha orientadora, à Marlene, Fátima, Lucila, Charles e Gustavo, por me ajudarem na formação acadêmica e nas pesquisas que desenvolvi ao longo da graduação.

Agradeço muitíssimo à minha orientadora Giselle Maria Maciel. Obrigada por sempre estar disponível para minhas dúvidas, por me dar assistência durante o trabalho e por tolerar minhas ligações diárias e mensagens de madrugada.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), que forneceu toda a estrutura e materiais necessários para a realização deste estudo, além de me capacitar para o mercado de trabalho.

A todos que posso ter esquecido de mencionar, mas que, de alguma maneira, cooperaram para a realização desta obra.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito... Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.

(Martin Luther King)

RESUMO

MATEI, Jéssica Crecencio. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva e chá preto. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Antibióticos são frequentemente usados e descartados no meio ambiente, na sua maioria não metabolizados por seres humanos e animais, mantendo-se biologicamente ativos contra as bactérias. A larga aplicação e o uso indiscriminado deles pode levar ao aparecimento de bactérias resistentes à droga. Portanto, a utilização de agentes antimicrobianos naturais poderia contribuir para a redução de agentes patogênicos resistentes e aumento de bactérias susceptíveis a antibióticos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva Bordô (*Vitis labrusca*) e chá preto (*Camellia sinensis*). A escolha de uma variedade de bagaço de uva bordô baseou-se no fato de que é um importante resíduo agroindustrial no Brasil, que ainda é rico em compostos fenólicos, enquanto o chá preto é bastante produzido e consumido no mundo. Ensaio de difusão em agar foi efetuado com diferentes concentrações dos extratos hidroalcoólicos (100%, 75%, 50% e 25%), individualmente ou em combinação com antibióticos comerciais, contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Amostras de etanol 40% (v/v) e os antibióticos, cefalexina e amoxicilina, foram utilizados como controles negativo e positivos, respectivamente. Os extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva e do chá preto foram eficazes contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, inibindo parcial ou totalmente o crescimento destas bactérias no ensaio de difusão em agar. A combinação de amoxicilina e extrato do bagaço de uva resultou num efeito sinérgico contra *S. aureus*, aumentando a inibição da bactéria, em comparação com os resultados individuais das substâncias. A interação de amoxicilina e do extrato de chá preto foi observada como sendo sinérgica contra *P. aeruginosa*. Além disso, também se fez teste de concentração inibitória e bactericida mínima sob a cepa de *S. aureus*. Os valores obtidos foram menores do que alguns encontrados em outros estudos de atividade antimicrobiana de extratos vegetais, indicando que baixas quantidades destes são eficazes contra o crescimento bacteriano desta espécie. Os resultados deste estudo *in vitro* mostraram que os extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô e chá preto apresentam efeitos antibacterianos contra bactérias patogênicas e poderiam ser uma alternativa como agentes antimicrobianos naturais. Os efeitos sinérgicos dos extratos em combinação com antibióticos pode ser um valioso meio para potencializar a inibição do crescimento de estirpes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Antibióticos. Bactérias. Antimicrobianos naturais. Compostos bioativos. Sinergismo.

ABSTRACT

MATEI, Jéssica Crecencio. Evaluation of the antibacterial activity of hydroalcoholic extracts from grape pomace and black tea. 2015. Degree Completion Work – Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Antibiotics are frequently used and discarded in the environment, mostly unmetabolized by humans and animals, remaining biologically active against bacteria. The wide and indiscriminate application of antibiotics can lead to the appearance of drug resistant bacteria. Therefore, the use of natural antimicrobials could contribute to the reduction of resistant pathogens and increase bacteria susceptibility to antibiotics. In this context, the objective of this work was to evaluate the antibacterial activities of hydroalcoholic extracts from bordô grape pomace (*Vitis labrusca*) and black tea (*Camellia sinensis*). The choice of grape pomace from bordô variety was based on the fact that it is an important agroindustrial residue in Brazil, which is still rich in phenolic compounds, and black tea is produced and consumed worldwide. Agar well diffusion plate assay was carried out with different concentrations of the hydroalcoholic extracts (100%, 75%, 50% and 25%) individually or in combination with commercial antibiotics against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Samples of ethanol 40% (v/v) and the antibiotics cephalixin and amoxicillin were used as negative and positive controls, respectively. The hydroalcoholic extracts of grape pomace and black tea were effective against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, inhibiting partially or totally the growth of this bacteria in agar well diffusion assay. The combination of amoxicillin and grape pomace extract resulted in a synergistic effect against *S. aureus* increasing the inhibition of this bacterium in comparison with the individual results of the antibiotic and the extract. The interaction of amoxicillin and black tea extract was observed to be synergistic against *P. aeruginosa*. Furthermore, also made inhibitory concentration and minimum bactericidal test under the strain of *S. aureus*. The values obtained were lower than any found in other studies antimicrobial activity of plant extracts, indicating that low amounts of these are effective against bacterial growth of this species. The results from this *in vitro* study showed that the hydroalcoholic extracts of bordô grape pomace and black tea present antibacterial effects against pathogenic bacteria and could be an alternative as natural antimicrobials. The synergistic effects of the extracts in combination with antibiotics might be a valuable mean to potentialize growth inhibition of strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Keywords: Antibiotics. Bacteria. Natural antimicrobials. Bioactive compounds. Synergism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da cefalexina.....	22
Figura 2 – Estrutura química da amoxicilina.....	24
Figura 3 – <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 4 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figura 5 – <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Figura 6 – <i>Streptococcus pyogenes</i>	35
Figura 7 – <i>Enterococcus faecalis</i>	36
Figura 8 – Estrutura simples de molécula fenólica.....	41
Figura 9 – Estrutura básica dos flavonoides.....	43
Figura 10 – Inoculação das placas para os ensaios de difusão em ágar com poços.....	49
Figura 11 – Fotografias das bactérias estudadas, em microscópio óptico, após coloração de Gram, com aumento de mil vezes.....	54
Figura 12 – Resultados do teste da lactose.....	55
Figura 13 – Resultados do teste da glicose.....	56
Figura 14 – Resultados do teste de vermelho-de-metila.....	57
Figura 15 – Resultados do teste de produção de indol.....	58
Figura 16 – Resultados do teste do citrato.....	59
Figura 17 – Resultados do crescimento bacteriano em ágar MacConkey.....	60
Figura 18 – Resultados do crescimento bacteriano em ágar cetrimide.....	61
Figura 19 – Resultado do ReadyCult Coliforms.....	62
Figura 20 – Resultado do Enterolert.....	63
Gráfico 1 – Curva padrão de ácido gálico.....	64
Figura 21 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos sob <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
Figura 22 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob <i>Streptococcus pyogenes</i>	68
Figura 23 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob <i>Enterococcus faecalis</i>	68
Figura 24 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob <i>Escherichia coli</i>	69
Figura 25 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figura 26 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob <i>Escherichia coli</i>	71
Figura 27 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob <i>Streptococcus pyogenes</i>	72
Figura 28 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob <i>Enterococcus faecalis</i>	72
Figura 29 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob <i>Escherichia coli</i>	73
Figura 30 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob <i>Streptococcus pyogenes</i>	74
Figura 31 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob <i>Enterococcus faecalis</i>	74
Figura 32 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75

Figura 33 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figura 34 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob <i>Staphylococcus aureus</i>	77
Figura 35 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob <i>Staphylococcus aureus</i>	78
Figura 36 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob <i>Escherichia coli</i>	79
Figura 37 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob <i>Streptococcus pyogenes</i>	79
Figura 38 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob <i>Enterococcus faecalis</i>	80
Figura 39 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob <i>Escherichia coli</i>	81
Figura 40 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob <i>Streptococcus pyogenes</i>	81
Figura 41 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob <i>Enterococcus faecalis</i>	82
Figura 42 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob <i>P. aeruginosa</i>	83
Figura 43 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
Figura 44 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob <i>Staphylococcus aureus</i>	85
Figura 45 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob <i>Staphylococcus aureus</i>	85
Figura 46 – Resultado das concentrações de amoxicilina (0,03 a 64 mg/L), no teste CIM.....	89
Figura 47 – Resultado das concentrações de amoxicilina (0,03 a 0,25 mg/L), no teste CBM.....	89
Figura 48 – Resultado das concentrações de cefalexina (0,03 a 64 mg/L), no teste CIM.....	90
Figura 49 – Resultado das concentrações de cefalexina (0,25 a 2 mg/L), no teste CBM.....	91
Figura 50 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô (2.500 a 25.000 mg/L), no teste CIM.....	92
Figura 51 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô (2.500 a 7.500 mg/L), no teste CBM.....	92
Figura 52 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do chá preto (2.500 a 25.000 mg/L), no teste CIM.....	93
Figura 53 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do chá preto (2.500 a 7.500 mg/L), no teste CBM.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classes de contaminantes emergentes, e seus usos.....	18
Quadro 2 – Estudos já realizados que demonstram a atividade antibacteriana da uva.....	39
Quadro 3 – Estudos já realizados que demonstram a atividade antibacteriana do chá preto	40
Quadro 4 – Classes de compostos fenólicos, segundo seu esqueleto básico.....	42
Quadro 5 – Grupos de flavonoides, com seus componentes e fontes alimentares....	44
Quadro 6 – Resultados dos testes de Gram e bioquímicos.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações dos antibióticos (amoxicilina e cefalexina) e dos extratos hidroalcoólicos (bagaço de uva bordô e chá preto) em cada poço.....	50
Tabela 2 – Concentrações dos antibióticos e concentrações finais utilizadas no teste CIM.....	51
Tabela 3 – Volume dos extratos hidroalcoólicos e concentrações finais utilizadas no teste CIM.....	52
Tabela 4 – Compostos fenólicos totais (mg de GAE/g) em amostras de chá preto e bagaço de uva.....	65
Tabela 5 – Resultados da atividade antibacteriana dos controles e extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô e chá preto: média ± DP (n=3).....	66
Tabela 6 – Concentração Inibitória e Bactericida Mínima (n=2).....	88
Tabela 7 – Estudos antibacterianos realizados com vegetais, frente ao <i>Staphylococcus aureus</i>	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVO	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1 CONTAMINANTES EMERGENTES	17
4.1.1 Fármacos	19
4.1.1.1 Antibióticos	20
4.1.1.1.1 Cefalexina	21
4.1.1.1.2 Amoxicilina	23
4.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	25
4.3 BACTÉRIAS	27
4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	28
4.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
4.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.3.4 <i>Streptococcus pyogenes</i>	34
4.3.5 <i>Enterococcus faecalis</i>	35
4.4 ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	36
4.4.1 Bagaço de Uva.....	37
4.4.2 Chá Preto	39
4.5 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	40
4.5.1 Compostos Fenólicos → Flavonoides	40
5 METODOLOGIA	45
5.1 BACTÉRIAS	45
5.1.1 Coloração de Gram, Testes Bioquímicos e Meios Seletivos e/ou Diferenciais	45
5.2 AMOSTRAS	46
5.3 EXTRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS	46
5.4 ANTIBIÓTICOS (PREPARO DE SOLUÇÕES)	47
5.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS.....	47
5.5.1 Teste de Difusão em Ágar com Perfuração de Poços.....	47
5.5.2 Preparo de Placas de Petri para os Ensaios	48
5.5.3 Padronização do Inóculo e Inoculação.....	48
5.5.4 Aplicação das Amostras e dos Antibióticos nas Placas	50
5.5.5 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima (CIM / CBM) .	51

5.6 TESTES ESTATÍSTICOS.....	52
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1 Coloração de Gram, Provas Bioquímicas e Meios Seletivos e/ou Diferenciais ...	53
6.2 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais	63
6.3 Difusão em Ágar com Perfuração de Poços.....	65
6.3.1 Extratos Hidroalcoólicos do Bagaço de Uva Bordô	71
6.3.2 Extratos Hidroalcoólicos do Chá Preto	78
6.3.3 Discussão.....	86
6.4 Concentração Inibitória e Bactericida Mínima	87
7 CONCLUSÃO	95
8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	96
REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Micropoluentes orgânicos emergentes são compostos que ainda não foram incluídos em programas nacionais ou internacionais de monitoramento, porém, são lançados no ambiente frequentemente. Estas substâncias não são exatamente novas, contudo, suas destinações e seus efeitos (eco) toxicológicos não eram estudados até pouco tempo (FERREIRA, 2011). Estes poluentes são pertencentes a várias classes, podendo ser: fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e reguladores lipídicos), produtos de beleza (bronzeadores, antissépticos e perfumes), produtos químicos industriais (anticorrosivos, aditivos de gasolina e plastificantes), hormônios, esteroides e pesticidas (ABREU e BRANDÃO, 2013).

O controle de fármacos residuais no meio ambiente vem adquirindo, cada vez mais interesse, pois têm sido descobertos em efluentes de estação de tratamento de esgotos e águas naturais na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L . O principal acesso destas substâncias na natureza advém das suas grandes utilizações na medicina, humana e veterinária, pois, após a administração no organismo, são parcialmente metabolizados e excretados. Isto ocorre porque os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, conservando suas propriedades químicas o bastante para atender sua finalidade. Portanto, 50 a 90% de uma dose de fármaco são excretados de forma inalterada e contínua no ambiente, resultando, assim, na sua persistência (BILA e DEZOTTI, 2003).

Um dos grupos de fármacos residuais que se destaca é a dos antimicrobianos. Eles são bastante discutidos na literatura por apresentarem um potencial de evolução de bactérias resistentes no meio ambiente (BILA e DEZOTTI, 2003). Os antibióticos e estes tipos de microrganismos são jogados em grandes quantidades no ambiente como resultado do crescente uso indiscriminado de medicamentos. Os corpos hídricos são os principais receptores destes poluentes, pois são eles que recebem os esgotos urbano, industrial e hospitalar. E pelo fato dos rios serem uma das principais fontes de água para consumo, esta poluição, contida nele, pode contribuir para a manutenção a até para a disseminação da resistência bacteriana (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

Sendo assim, o uso de antimicrobianos químicos sintéticos leva à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes. Por isso, o uso de antimicrobianos de origem natural passa a ser uma alternativa (VARGAS *et al.*, 2004). As substâncias antimicrobianas, metabolizadas secundariamente por muitas plantas e animais, possuem ampla aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e nutricional, além da utilização como aditivos naturais em alimentos.

No mundo todo e, principalmente, no Brasil, que tem sua economia muito baseada no agronegócio, são geradas enormes quantidades de resíduos pela indústria alimentícia. Embora sejam considerados como graves problemas ambientais, eles podem servir como fontes ricas de compostos bioativos, incluindo substâncias antioxidantes e antimicrobianas. Deste modo, estes resíduos podem ser fontes potenciais de compostos naturais, sendo que, quando usados, geram lucros e diminuem o impacto ambiental que surgiria do descarte inadequado destes materiais no meio ambiente (MELO, 2010).

Devido à problemática do uso excessivo de antibióticos e da importância dos compostos antimicrobianos naturais para a saúde e para a qualidade do meio ambiente, este trabalho foi desenvolvido para avaliar as atividades antimicrobianas que podem estar presentes na uva (bagaço) e no chá preto, que são dois alimentos muito consumidos mundialmente, sendo que o primeiro gera um resíduo agroindustrial importantíssimo. A exemplo, vale mencionar que na fabricação de 100L de vinho branco, são desperdiçados 20 kg de bagaço de uva (ROCKENBACH, 2008). Neste contexto, o estudo verificará os efeitos antibacterianos dos extratos hidroalcoólicos das substâncias mencionadas, para que seja possível reduzir-se a utilização de fármacos, que cada vez mais prejudicam o ecossistema, como um todo.

2 JUSTIFICATIVA

Conforme a WORLD HEALTH ORGANIZATION (Organização Mundial da Saúde, OMS), a resistência dos microrganismos aos antibióticos pode afetar qualquer ser humano, em qualquer idade e em qualquer país; o que se torna uma grande ameaça à saúde pública. No seu último relatório, Resistência Antimicrobiana – Relatório Global sobre Vigilância, um subdiretor da OMS, Keiji Fukuda, disse: “O mundo está a caminhar para uma era pós-antibióticos, em que as infecções comuns e os pequenos ferimentos, tratáveis há décadas, podem voltar a matar.” Segundo ele, se não houver iniciativas significativas, que tenham como finalidade a prevenção de infecções e mudanças na forma de produzir, prescrever e usar os antibióticos, “as implicações serão devastadoras”. Desta maneira, a análise de alimentos (e seus resíduos) com potenciais atividades antimicrobianas poderá contribuir para a redução da utilização de medicamentos e, conseqüentemente, na diminuição de resistências bacterianas.

Dentre vários desses produtos alimentícios, a uva e o chá preto podem ser destacados, pois os dois são muito produzidos e consumidos mundialmente. A primeira, teve sua produção brasileira, em 2013, maior que um milhão de toneladas (IBGE, 2013); enquanto o segundo é produzido mundialmente e anualmente em mais de dois bilhões de toneladas (LIMA *et al.*, 2009).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antibacteriano de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva da variedade bordô (*Vitis labrusca*) e do chá preto (*Camellia sinensis*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ativar as cepas bacterianas, controlando-as qualitativamente por coloração de Gram, repiques em meios seletivos e realização de análises bioquímicas;
- Extrair os compostos bioativos do bagaço de uva e do chá preto, em solução hidroalcoólica;
- Quantificar os compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos brutos obtidos com bagaço de uva e chá preto;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos (brutos, diluídos e misturados com antibióticos) frente à ação de bactérias patogênicas, por meio dos testes de difusão em ágar com perfuração de poços;
- Determinar a concentração inibitória e bactericida mínima, dos extratos e dos antibióticos, na bactéria que apresentou a maior inibição pelos mesmos.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

O interesse acadêmico e a criação de órgãos de proteção ambiental, como a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), a começar da década de 1970, proporcionaram um maior número de pesquisas sobre monitoramento de compostos, denominados xenobióticos, em várias divisões ambientais, em todo o mundo (SOUZA, 2011).

Devido ao desenvolvimento de métodos mais sensíveis, compostos químicos passaram a ser encontrados, identificados e definidos quanto aos riscos que podem vir a causar no meio ambiente. Estes são os contaminantes emergentes. O termo “poluente emergente” se refere a um grupo de substâncias com características próprias, devido à sua crescente frequência de utilização pela sociedade e pela sua capacidade de contaminação, porque não precisam ter persistência no ambiente para causar danos (ABREU e BRANDÃO, 2013).

Nos exemplos de compostos considerados como tais contaminantes estão incluídos os fármacos, contrastes de raio X, hormônios e esteróides, componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal, surfactantes, entre outros (SILVA, 2011). A Quadro 1 aponta algumas das classes destes poluentes.

Diariamente as indústrias, a agricultura e a população como um todo, consomem água e eliminam em seus efluentes muitas substâncias químicas, colaborando com a entrada de poluentes na natureza. Estes, podem provocar mudanças no ciclo da água e, por conseguinte, na qualidade dos recursos hídricos. Apesar destes compostos estarem sendo estudados na atualidade, sua presença no meio é antiga, já que são uma fração de produtos consumidos há longo tempo por todo o mundo. Porém, a produção de novos compostos e a modificação na utilização e na disposição de substâncias existentes, podem fornecer novas fontes de contaminantes emergentes no meio ambiente (IDE, 2014).

Classe	Exemplo de substâncias	Uso
Fármacos	Cafeína	Estimulante
	Atenolol	Anti-hipertensivo
	Carbamazepina	Antiepilético
	Codeína	Analgésico
	Fluoxetina	Antidepressivo
	Amoxicilina	Antibiótico
Produtos de higiene pessoal	DEET	Repelente de inseto
	Triclosan	Agente antimicrobiano
	Isoborneol	Fragrância
	Galaxolide	Fragrância
Hormônios	Estrona	Hormônio reprodutivo
	Estradiol	Hormônio reprodutivo
	Estriol	Hormônio reprodutivo
	Progesterona	Hormônio reprodutivo
	Dietilestilbestrol	Antineoplásico
	Levonorgestrel	Anticoncepcional
	Mestranol	Anticoncepcional
	Testosterona	Hormônio reprodutivo
Plastificantes	Etinilestradiol	Anticoncepcional
	Bisfenol A	Plastificante
	Dietilftalato	Plastificante
Pesticidas	Di-2-etilexilftalato	Plastificante
	Metolacoloro	Herbicida
Surfactantes não iônicos	Atrazina	Herbicida
	Nonilfenol	Surfactante
	Octilfenol	Surfactante

Quadro 1 – Classes de contaminantes emergentes, e seus usos.

Fonte: SANTANA, 2013.

Existem aproximadamente 11 milhões de substâncias químicas registradas no *Chemical Abstracts Service* (CAS). Cerca de 100 mil compostos são fabricados e usados para diversos fins nos Estados Unidos e Japão. Apenas nesse primeiro país são alistados de 1.200 a 1.500 produtos químicos por ano. No globo, aproximadamente, 3 mil substâncias são produzidas em larga escala alcançando quantidades acima de 500 mil Kg/ano. Sendo que, desses, menos de 45% foram

submetidos a ensaios toxicológicos básicos e menos de 10% foram analisados quanto aos efeitos tóxicos sobre organismos em desenvolvimento (SOUZA, 2011).

Em águas naturais, os contaminantes emergentes aparecem, principalmente, a partir do descarte de efluentes domésticos e/ou industriais (SODRÉ *et al.*, 2010). Em alguns estudos que foram realizados, foi mostrado que estações de tratamento de esgoto são uma das mais importantes fontes de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos. E o motivo disto ocorrer é o fato de que as ETEs fazem uso de tratamentos convencionais que, por sua vez, não foram projetados para remover moléculas complexas (IDE, 2014).

4.1.1 Fármacos

De todos os poluentes emergentes, os que provavelmente geram maior preocupação e estudos nos últimos anos são os fármacos, e em particular, os antibióticos (BARCELÓ *et al.*, 2007), por serem potenciadores no desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente.

Os fármacos antimicrobianos são classificados segundo sua estrutura molecular, seu mecanismo de ação e seu espectro da atividade antimicrobiana. Mais de 500 toneladas métricas de tipos distintos de remédios são fabricados e usados a cada ano (MADIGAN *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, que atualmente concede ao mercado milhões de substâncias com finalidade terapêutica, causa um sério problema ambiental, cuja atenção e preocupação vêm crescendo. A presença de produtos farmacológicos no ambiente é proveniente do uso abundante no tratamento de doenças em seres humanos e animais. Além disso, esses compostos são excretados na forma não metabolizada ou como um metabólito ativo, sendo lançados, então, nos corpos hídricos (REIS FILHO *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas envolvendo produtos farmacêuticos foram feitas em vários países, como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Áustria, Croácia, Itália, Espanha, Alemanha, Brasil, entre outros, e obtiveram concentrações de 80 fármacos na faixa de µg/L em ambientes aquáticos.

As substâncias em questão possuem características que as distinguem de outros compostos químicos, tais quais: polimorfismo, chegada no meio ambiente (após metabolização), estrutura química complexa, e possibilidade de suportar ionização em diversos sítios da molécula. Por isso, os fármacos podem sofrer complexação com metais e matéria orgânica, sorção em sedimentos e no material particulado, oxidação química, fotólise, volatilização e biodegradação.

A questão é que, além desses medicamentos serem um grave problema por causarem poluição nos compartimentos de água, ainda podem colaborar no desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos, por causa da presença destes compostos na água proveniente de esgotos (IDE, 2014).

A existência de fármacos residuais no esgoto doméstico e nas águas naturais é de grande importância nacional e internacional; vários estudos demonstram que estas substâncias e seus metabólitos são existentes em ambientes aquáticos de várias partes do mundo (BILA e DEZOTTI, 2003). KOLPIN *et al.* (2002), por exemplo, encontraram antibióticos, como tetraciclina, sulfonamidas, macrolídeos, fluoroquinolonas, lincomicina, trimetoprim e tilosina, em amostras de águas superficiais nos Estados Unidos.

4.1.1.1 Antibióticos

Os antibióticos são agentes antimicrobianos produzidos por microrganismos. A maior parte é produzida por bactérias do gênero *Streptomyces* ou por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*. Eles podem ter ação antibacteriana, antifúngica e antiviral. Desta forma, inibem o crescimento, inativam ou matam o agente infeccioso (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

A sensibilidade de microrganismos individuais a antimicrobianos isolados varia significativamente. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, por exemplo, distinguem-se quanto a suscetibilidade a um antibiótico específico, tal como a penicilina; as do primeiro grupo são geralmente afetadas enquanto a maioria daquelas do segundo grupo são naturalmente resistentes.

Nas bactérias, os ribossomos, parede celular, membrana plasmática, enzimas envolvidas na biossíntese de lipídeos e elementos da replicação e transcrição são os

maiores alvos dos antibióticos. Muitos destes impossibilitam a tradução, pois interagem com os ribossomos, inibindo a síntese proteica. Outros inibem a síntese de RNA por impedirem a transcrição, especificamente.

Um dos mais notáveis grupos de antibióticos, tanto do ponto de vista médico como do histórico, corresponde aos β -lactâmicos. Neste conjunto estão inclusas as penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, que têm em comum um componente estrutural exclusivo, o anel β -lactâmico. As duas primeiras respondem a maior parte dos antibióticos produzidos e usados no mundo (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os antibióticos representam uma grande classe de fármacos que são usadas presentemente no planeta em várias aplicações. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o consumo anual de antibióticos no Brasil ultrapassou 1.200 toneladas nos anos de 2004 e 2005; sendo que 28 β -lactâmicos responderam por mais de 70% desses medicamentos. A ingestão de antibióticos durante 2005 atingiu 390 toneladas de amoxicilina (AMX), seguida de 184 toneladas de ampicilina (AMP), 163 toneladas de cefalexina (CEF), 133 toneladas de sulfametoxazol (SMX), 45 toneladas de tetraciclina (TET), 38 toneladas de norfloxacin (NOR), 30 toneladas de ciprofloxacina (CIP), e 27 toneladas de trimetoprim (TMP), entre outros. Vale ressaltar que estes compostos citados são responsáveis por mais de 80% de todos os antibióticos consumidos no país (LOCATELLI *et al.*, 2011).

4.1.1.1.1 Cefalexina

A cefalexina (Figura 1) é muito comercializada no Brasil, e está presente em várias formulações farmacêuticas. É um antibiótico bastante usado na medicina humana para o combate de inúmeras infecções (CASSELLA *et al.*, 2010).

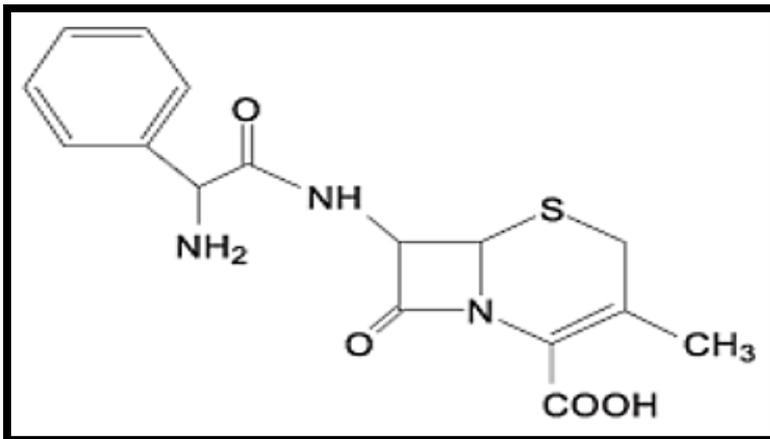


Figura 1 – Estrutura química da cefalexina.

Fonte: CASSELLA *et al.*, 2010.

O *Cephalosporium acremonium*, a primeira fonte de cefalosporinas, foi isolado em 1948, a partir de um microrganismo (fungo) chamado Brotzu. Nesta época, foi verificado que os filtrados não tratados desta cultura inibiam o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*. Também foram identificados três antibióticos distintos nos líquidos das culturas onde o fungo era cultivado, que foram denominados cefalosporinas P, N e C. A partir do isolamento do núcleo ativo deste último (ácido 7-aminocefalosporânico) e com a adição de cadeias laterais, foram produzidos compostos semissintéticos com atividade antibacteriana superior à da substância original, dentre eles, as cefalexinas (BRUNTON *et al.*, 2012).

Quanto às características farmacológicas deste medicamento, segundo a MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA (2014), é um antibiótico de forma molecular $C_{16}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$ e peso molecular de 365,4, chamado ácido 7-(D-amino-fenilacetamido)-3-metil-3-cefem-4-carboxílico monoidratado. É um pó cristalino branco, com sabor amargo. Contém o núcleo dos demais antibióticos cefalosporínicos e é um zwitterion, ou seja, a molécula contém agrupamentos ácido e básico. As cefalexinas se distinguem das penicilinas na estrutura do sistema bicíclico de anéis, já que possuem um radical D-fenilglicídico como substituinte na posição 7-amino e um radical metil na posição 3.

Quanto às propriedades farmacocinéticas, o fármaco é ácido estável e é rapidamente absorvido após administração oral. A cefalexina é excretada na urina por

filtração glomerular e secreção tubular. Estudos realizados mostram que mais de 90% do medicamento é excretado inalteradamente dentro de 8 horas.

Testes *in vitro* revelam que as cefalosporinas são bactericidas por inibirem a síntese da parede celular bacteriana. E conforme descrito na bula padrão da MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA (2014), este antibiótico é indicado para o tratamento das infecções listadas a seguir, quando causadas por cepas sensíveis:

- Sinusites bacterianas: causadas por estreptococcus, *S. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (apenas os sensíveis à meticilina);
- Infecções no trato respiratório: ocasionadas por *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* (a cefalexina normalmente é eficaz na eliminação de estreptococos da nasofaringe);
- Otite média: acarretada por *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, demais estafilococos e estreptococos;
- Infecções da pele e tecidos moles: geradas por estafilococos e/ou streptococos sensíveis à cefalexina;
- Infecções ósseas: provocadas por estafilococos e/ou *P. mirabilis*;
- Infecções do trato geniturinário, incluindo prostatite aguda: criadas por *E. coli*, *P. mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*;
- Infecções dentárias: promovidas por estafilococos e/ou streptococos sensíveis à cefalexina.

Importante ressaltar que os estafilococos meticilino-resistentes e grande parte das cepas de enterococos são resistentes à cefalexina. Este remédio não é ativo contra a maioria das cepas de *Enterobacter* spp., *Proteus vulgaris* e *Morganella morganii*, assim como não tem atividade contra as espécies de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter calcoaceticus*.

4.1.1.1.2 Amoxicilina

A amoxicilina (Figura 2) é um antibiótico semissintético, pertencente à classe das penicilinas, que se diferencia da ampicilina por apresentar a hidroxila ao invés do hidrogênio. Seu espectro de ação é amplo pelo fato de possuir um grupo amino e possui maior biodisponibilidade e sua absorção independe da presença de alimentos.

Além destes fatores, é ácido-resistente, agindo sobre várias bactérias, sendo muito aplicada no tratamento de infecções do trato respiratório. Contudo, pode ser inativada por beta-lactamases produzidas por diversos microrganismos (CAIAFFA *et al.*, 2002; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2008).

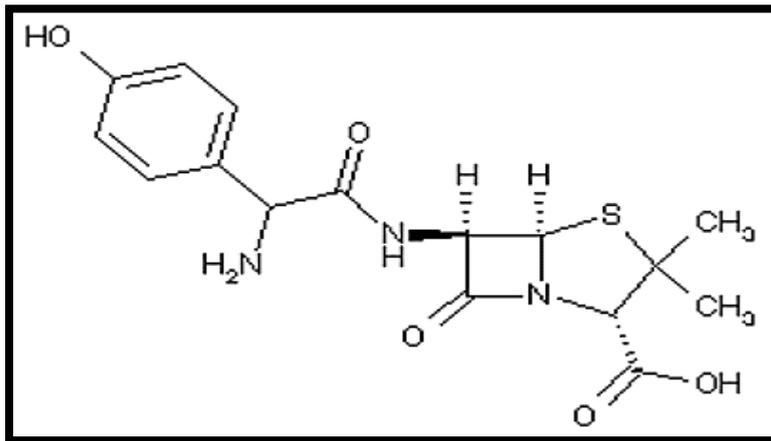


Figura 2 – Estrutura química da amoxicilina.

Fonte: Microbiología! (outside).

Segundo descrito na bula padrão deste antibiótico, do fabricante EMS S/A (2015), a amoxicilina tem como princípio ativo o D-(-)-alfa-amino p-hidroxibenzil penicilina -, que é pertencente ao grupo β -lactâmico de antibióticos. Possui um grande espectro de atividade contra vários microrganismos gram-positivos e gram-negativos, atuando através da inibição da biossíntese do mucopeptídeo da parede celular. Esse remédio age rapidamente como bactericida, porém como dito anteriormente, é passível de degradação por beta-lactamases e, sendo assim, não possui efeito contra microrganismos que produzem essas enzimas, como o *Staphylococcus* resistente e todas as cepas de *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Enterbacter*.

A amoxicilina é bem absorvida e sua ingestão oral numa dosagem de três vezes ao dia gera, normalmente, altos níveis plasmáticos. Ela é muito ligada às proteínas plasmáticas, pois aproximadamente 18% do total do medicamento, presente no plasma, são conectados a estas. E quanto a sua excreção, a principal via de expulsão da amoxicilina são os rins. Sendo que cerca de 60 a 70% da droga é excretada inalterada pela urina durante as seis primeiras horas, e a meia-vida de eliminação é em torno de uma hora. Ela também pode ser parcialmente eliminada por

este fluido, na forma de ácido peniciloico inativo, em volumes equivalentes entre 10 e 25% da dose inicial.

A EMS S/A (2015) descreve que a indicação de amoxicilina é para o tratamento de infecções bacterianas causadas por germes sensíveis à ação da mesma. Os seguintes microrganismos frequentemente são suscetíveis a sua ação bactericida:

- Gram-positivos: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* sensível à penicilina, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* e espécies de *Corynebacterium* e *Clostridium*.
- Gram-negativos: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella septica*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, espécies de *Salmonella*, *Brucella* e *Shigella*.

Suas prescrições, então, são para tratamento de infecções do aparelho respiratório, como faringite bacteriana, sinusite, bronquite e otite média aguda, assim como para doenças gonocócicas e febre tifóide. Também pode ser utilizada em infecções de feridas provenientes de queimaduras da pele e do tecido mole, do trato biliar e do trato geniturinário, para tratamento. Este antibiótico é contraindicado para aqueles que têm sensibilidade às penicilinas, para mulheres grávidas ou que estão amamentando, para os que possuem insuficiência renal e/ou mononucleose infecciosa, para os que têm infecções causadas por estafilococos penicilino-resistentes ou por bacilos piocianicos, riquetsias e vírus (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2008).

4.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

No Brasil, muitas farmácias vendem medicamentos controlados sem prescrição médica. E isto ocorre em todo o país, porém é principalmente aliado com as regiões urbanas, por causa do número elevado destes estabelecimentos per capita. Portanto, a automedicação torna-se um ponto importante quando se analisa a descarga de fármacos no ambiente. Antibióticos automedicados podem ser clinicamente desnecessários, ou muitas vezes inadequadamente doseados ou podem

não possuir quantidades adequadas de compostos ativos. Ademais, é o principal fator que auxilia no aumento da resistência microbiana (LOCATELLI *et al.*, 2011).

Contudo, o saber da ocorrência da resistência dos microrganismos para com os agentes físicos e químicos não é algo novo, pois data do começo da era microbiana. Alexander Fleming, ao encontrar a penicilina, em 1929, foi a primeira testemunha da resistência natural de microrganismos aos antibióticos, relatando que bactérias do grupo colitifoide e da espécie *Pseudomonas aeruginosa* já não eram inibidas pela ação do antibiótico, como antes o foram. A explicação para isso foi evidenciada por Abraham e Chain, em 1940, que, em um ano antes da primeira matéria sobre a utilização clínica da penicilina, constataram em extratos de *Escherichia coli* uma enzima, cujo nome deram de penicilinase, com capacidade para acabar com a ação da penicilina.

Ao longo do tempo, vem sendo mostrado por várias pesquisas que o aumento do consumo de antibióticos contribui para o aparecimento da resistência antimicrobiana em vários gêneros de bactérias (BOSCARIOL, 2013). Estas têm manifestado significativa resistência aos antimicrobianos de amplo espectro, como nos seguintes casos: *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. formadores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) ou que expressam resistência às cefalosporinas de terceira geração; *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA); *Acinetobacter* spp. sensível apenas aos carbapenêmicos; *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina; *Pseudomonas* spp. resistentes à aminoglicosídeos, carbapenêmicos e/ou cefalosporinas (SERAFIM, 2013).

As bactérias podem ser sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos, normalmente, são pertencentes a estas últimas quando crescem *in vitro*, nas concentrações que estes agentes atingem no sangue quando administrados nas sugestões clínicas. O ganho de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre em virtude de uma alteração genética que se manifesta bioquimicamente. Essas mudanças genômicas podem ser originadas de mutações cromossômicas ou por obtenção de plasmídeos R (de resistência) ou por transposons.

A resistência adquirida por mutações é frequentemente simples, ou seja, acerta apenas um antibacteriano, pois raramente uma célula bacteriana sofre mudança simultânea para mais que um. O alcance por fator R (plasmídeo) na maior parte é múltipla, tornando o microrganismo resistente a dois ou mais antimicrobianos. O que se deve a existência de genes resistentes a diversos agentes, num único

plasmídeo ou a presença de vários plasmídeos R distintos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Segundo MADIGAN *et al.* (2010) e descrição da ANVISA, há seis razões que fazem alguns microrganismos serem naturalmente resistentes, os motivos e exemplos são os seguintes:

- O organismo pode não possuir estrutura que seria inibida por um antibiótico. Ex. Bactérias como micoplasmas são desprovidas de parede celular, sendo, desta forma, resistentes às penicilinas;
- O organismo pode não ser permeável ao antibiótico. Ex. A maioria das bactérias Gram-negativas são impermeáveis à penicilina G e à platensimicina;
- O organismo pode ter capacidade de alterar o antibiótico para uma forma que seja inativa. Ex. Vários estafilococos possuem β -lactamases, que clivam o anel de muitas penicilinas;
- O organismo pode mudar o alvo do antibiótico. Ex. *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina podem obter o gene cromossômico Mec A e produzir uma proteína de ligação da penicilina (PBP ou PLP) resistente aos β -lactâmicos;
- O organismo pode gerar uma via bioquímica resistente. Ex. Patógenos criam resistência às sulfas, que inibem a produção de ácido fólico nas bactérias; os microrganismos que são resistentes alteram seu metabolismo para captarem esta substância pré-formada a partir do ambiente, desviando a utilização da via obstruída pelas sulfas;
- O organismo pode ser competente para bombear para fora um antibiótico que está invadindo a célula, pelo processo de efluxo. Ex. *Escherichia coli* possui resistência às tetraciclinas devido a este mecanismo ativo.

4.3 BACTÉRIAS

As bactérias são células procarióticas uni ou pluricelulares, autotróficas (fotossintéticas ou quimiossintéticas) ou heterotróficas (saprófitas e parasitas), que possuem tamanho de 1 a 2 μm por 1 a 4 μm , com membrana plasmática, sem esteróis, composta por 60% de proteínas imersas numa bicamada de lipídeos (40%), sendo os

fosfolípídeos os mais importantes. E possuem em sua estrutura uma parede celular, que evita o estouro das células, devida a pressão osmótica existente no interior destes microrganismos.

As paredes possuem diferenças significativas e distinguem as bactérias Gram-negativas das Gram-positivas. As do primeiro grupo possuem a parede mais complexa, formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicanos, sendo que o destaque é a presença de uma membrana externa e a ausência de ácidos teicóicos; que são ausente e presentes, respectivamente, nas bactérias Gram-positivas. Além disso, 70 a 75% da parede, deste último grupo, são constituídos de peptidoglicanos. O conhecimento dessas particularidades é bem relevante para o estudo dos mecanismos de ação dos antibióticos e quimioterápicos, bem como da patogenicidade de cada um dos grupos. Pois a existência de uma membrana externa na bactéria confere à ela uma barreira hidrofóbica adicional, que dificulta a penetração de algumas substâncias. Alguns antibióticos, corantes, metais pesados e sais biliares, por exemplo, não penetram na parede das Gram-negativas tão facilmente quanto o fazem nas Gram-positivas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

4.3.1 *Escherichia coli*

As bactérias do gênero *Escherichia coli* (Figura3) são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Elas são Gram negativas, não esporuladas, anaeróbicas facultativas, fermentativas, em sua maioria móveis (flagelos peritríqueos) e podem crescer entre temperaturas de 18 a 44°C, sendo ideal 37°C (ALMEIDA, 2013). Metabolizam D-glicose e outros carboidratos, com formação de ácido e gás. São oxidase negativa, catalase positiva, vermelho de metil positivo, Vogues Proskauer negativo e, geralmente, citrato Simmons negativo (HOLT *et al.*, 1994)

Estes microrganismos são encontrados de vários modos na natureza, desde estirpes comensais até estirpes patogênicas para seus hospedeiros, humanos ou animais. O trato gastrointestinal da maior parte dos animais de sangue quente é colonizado pela *E. coli* em poucas horas ou dias após o nascimento (ALVES, 2012).

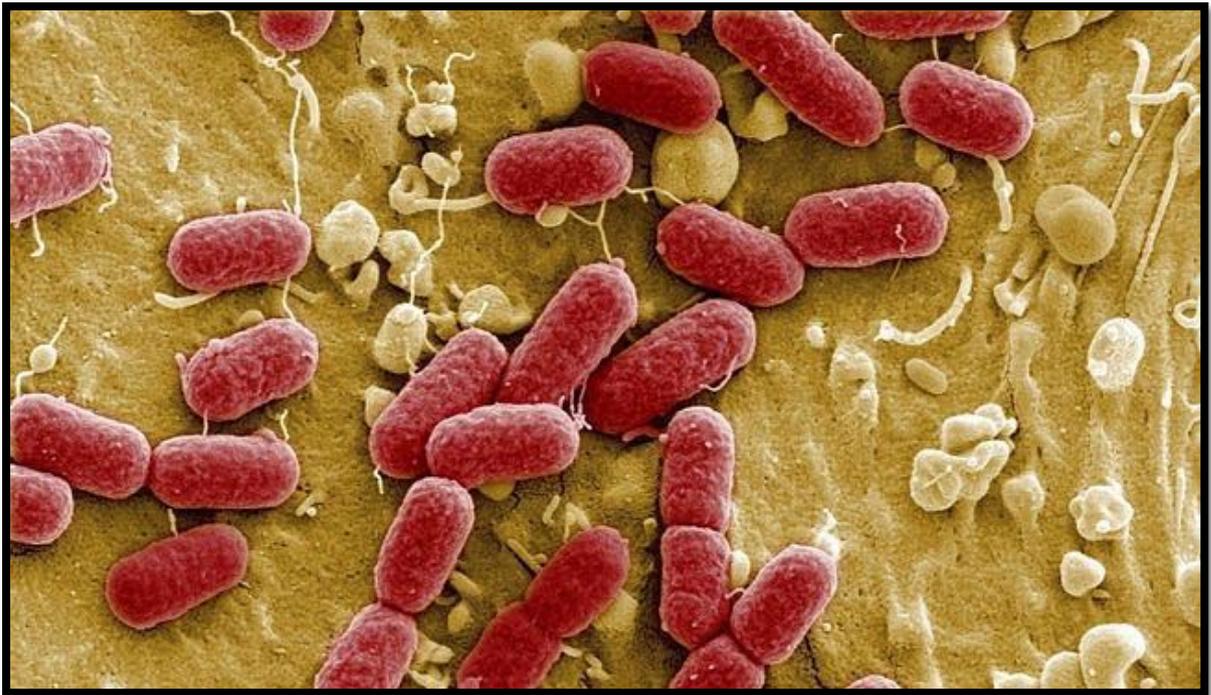


Figura 3 –*Escherichia coli*

Fonte: ABC.es / sociedad

A maioria dos sorogrupos dessa espécie fazem parte da flora comensal do intestino dos mamíferos. Porém, determinados sorotipos são patogênicos para os seres humanos e outros animais, neste caso, estes não são considerados parte da flora intestinal regular. O contágio da *E. coli* segue três vias: contato direto com animais, contato com humanos e consumo de alimentos contaminados (CARNEIRO, 2008).

Se tratando dos mecanismos de virulência específicos das cepas patogênicas, a *Escherichia coli* pode ser classificada em patotipos, sendo: enteropatogênica (EPEC), enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EgEC), enterohemorrágica (EHEC), uropatogênica (UPEC), de meningite neonatal (NMEC), enteropatogênica para coelhos (REDEC) e patogênica para aves (APEC) (ALMEIDA, 2013).

Os sintomas mais frequentes em pessoas infectadas são colites hemorrágicas evidenciadas por uma diarreia sanguinolenta, fortes dores abdominais, vômitos e ausência de febre. Nos casos mais graves, pode ocorrer síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e púrpura trombótica trombocitopênica (PTT) em crianças e idosos, respectivamente. Estas síndromes são caracterizadas por anemia hemolítica

microangiopática, trombocitopenia, mudanças na função renal, febre e anomalias no sistema nervoso central. Sendo a taxa de mortalidade bastante elevada (CARNEIRO, 2008).

Os antimicrobianos utilizados contra bactérias têm alta ação destrutiva nas células das mesmas, porém mesmo com este potencial, as cepas de *E. coli* estão se tornando cada vez mais resistentes à ação antimicrobiana. Num estudo com frangos de corte, por exemplo, LAMBIE *et al.* (2000) constataram uma grande tendência de resistência a amoxicilina, novas quilonas e sulfazotrim e uma taxa significativa à norfloxacin em cepas isoladas deste animais. A resistência obtida pela *E. coli* é resultado do uso inadequado de antimicrobianos e administração em doses sub-terapêuticas, que selecionam, assim, agentes bacterianos mais resistentes, não eliminando a infecção (ROCHA, 2010).

4.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* (Figura 4) é um bacilo Gram negativo, não formador de esporos, que pertence à família *Pseudomonadaceae*. O bacilo pode ser móvel, reto ou pouco curvado, geralmente estão em pares e medem de 1 a 5 µm de comprimento e 0,5 a 1 µm de largura. Estes microrganismos consomem carboidratos através da respiração aeróbica, usando o oxigênio como aceptor final de elétrons. Em alguns casos, pode ser utilizado o nitrato como aceptor alternativo, permitindo que ocorra crescimento em condições anaeróbicas. A maior parte, se não todas, as espécies não conseguem crescer sob condições ácidas. Crescem numa temperatura entre 37 e 42 °C e produzem pigmentos difusíveis, como a piocianina, a pioverdina, a piomelanina e a piorrubina, que lhes dão uma aparência característica numa cultura. Além disso, produzem catalase e algumas enzimas extracelulares, como lipases, esterases e proteases (KVITKO, 2010; HOLT *et al.*, 1994).

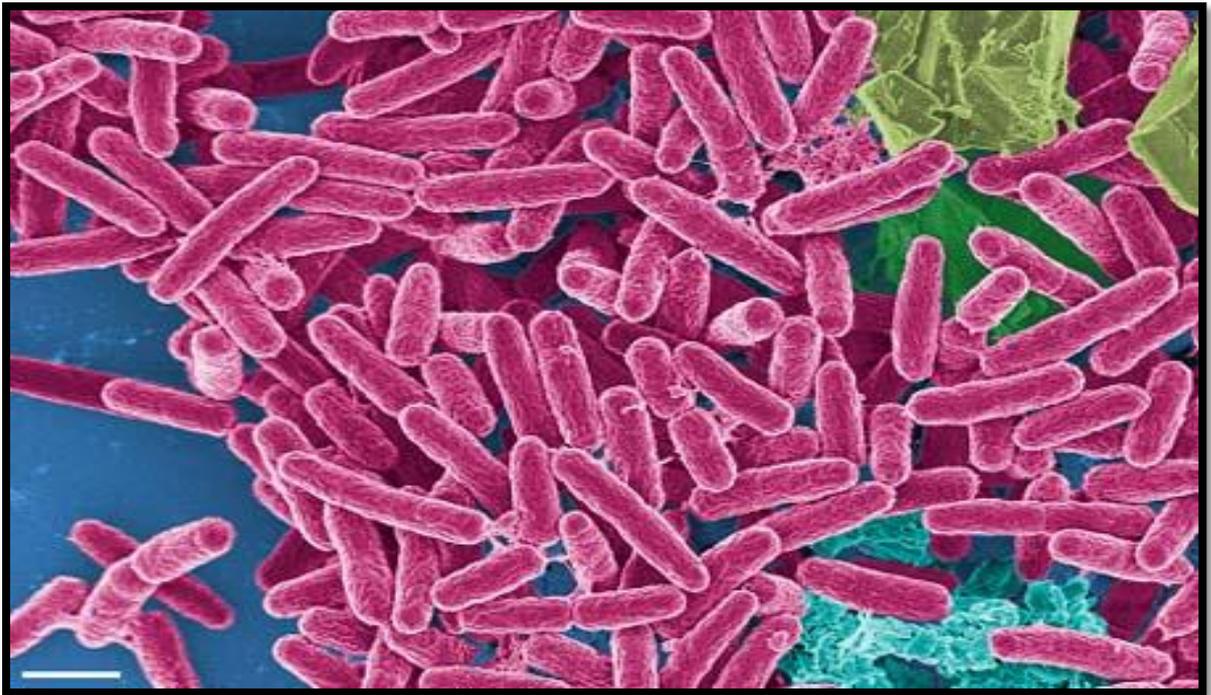


Figura 4 – *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Global Medical Discovery

Essa espécie de bactéria possui ampla distribuição, sendo isolada do solo, da água, de plantas, de animais e de humanos. As pequenas necessidades nutricionais, comprovadas por sua capacidade de se desenvolver em água destilada e sua tolerância a várias condições físicas colaboram no sucesso ecológico da *P. aeruginosa* e na sua atribuição como agente oportunista.

Esse microrganismo possui preferência por ambientes úmidos, sendo que nos humanos é isolado de locais como o períneo, axila e ouvido. A umidade é um fator crucial para o desenvolvimento de reservatórios dessa bactéria em ambiente hospitalar, podendo ser isolada de equipamentos respiratórios, medicamentos, desinfetantes, pias e vegetais.

A *P. aeruginosa* faz parte da microbiota normal de humanos, em alguns casos; sendo que a colonização em indivíduos saudáveis é relativamente baixa. As taxas de dominação de sítios específicos são estas: pele, 0 a 2%; mucosa nasal, 0 a 3,3%; faringe, 0 a 6,6%; e intestino, 2,6 a 24%. No hospital, os pacientes tem uma taxa maior de colonização destes sítios, que vai aumentando de acordo com o tempo permanecido neste ambiente e com o uso de antimicrobianos (ZAVASCKI, 2003).

A bactéria em questão é um patógeno nasocomial, embora se associe, também, a certas infecções adquiridas na comunidade. Como por exemplo, as infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística, endocardites e osteoartrites em usuários de drogas endovenosas, otite externa maligna em diabéticos, meningites, infecções oculares e pneumonias. Nos hospitais, pode estar envolvida à infecções do trato urinário, de corrente sanguínea e de sítio cirúrgico (ZAVASCKI, 2003).

Nos ambientes hospitalares, mais precisamente nas UTIs, uma particularidade marcante das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* é a multirresistência (FERREIRA, 2005). Esta bactéria possui uma resistência cruzada, que é resultado da presença de múltiplos mecanismos, como a produção de enzimas, bombas de efluxo e modificações no sítio de ligação e membrana plasmática, num único hospedeiro. Tal característica a torna forte contra muitos fármacos (FIGUEIREIDO *et al.*, 2007).

4.3.3 *Staphylococcus aureus*

Os *S. aureus* (Figura 5) pertencem à família *Micrococcae*, eles são cocos Gram-positivos, imóveis, não-esporulados e, geralmente, não encapsulados com diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5 µm. Podem estar de diferentes formas, desde isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente, por causa da sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (SANTOS *et al.*, 2007). Apresentam-se como microrganismos anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37 °C (BRESOLIN *et al.*, 2005).

Podem ser encontrados em vários lugares, sendo o próprio ser humano seu principal reservatório; eles estão presentes em várias partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Desses sítios corporais, é nas narinas que está o maior índice de colonização, sendo a prevalência aproximada de 40% na população adulta, que pode ser ainda maior nos hospitais.



Figura 5 – *Staphylococcus aureus*

Fonte: Microbeworld

O desenvolvimento de *S. aureus* nas narinas não apresenta nenhum sintoma e isto tem uma grande importância clínica, porque as pessoas contaminam suas próprias mãos e passam a transmitir a bactéria por simples contato. De acordo com estudos feitos, o carregamento nasal auxilia também na transmissão do microrganismo por disseminação aérea (SANTOS *et al.*, 2007). Como agente de infecções nosocomiais, o *S. aureus* é o patógeno isolado com maior frequência, causando infecções de sítio cirúrgico, endocardites, pneumonias e bacteremias. É perceptível, ainda, uma forte tendência dessa bactéria em desenvolver resistência aos antimicrobianos (CORDEIRO, 2011). No Brasil, acima de 80% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e aproximadamente 70% dos isolados de pacientes da comunidade apresentaram resistência às penicilinas naturais e, também, à ampicilina e amoxicilina (TAVARES, 2000).

4.3.4 *Streptococcus pyogenes*

Esta espécie de bactéria é do tipo coco Gram-positivo e β -hemolítico, é também conhecida como estreptococo do grupo A de Lancefield ou como GAS (*group A streptococci*), caracterizada pela presença da proteína M (polissacarídeo), que é um dos seus fatores de virulência, em sua parede celular (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Possui células esféricas ou ovoides, que ocorrem em pares ou em cadeias quando cultivadas em meio líquido. Não é móvel e tampouco esporulado. Seu metabolismo é fermentativo, produzindo lactato, sem gás. Geralmente é restrito à temperaturas entre 25 e 45 °C, com o ótimo em 37° (HOLT *et al.*, 1994).

O *Streptococcus pyogenes* (Figura 6) é o responsável por um espectro clínico de doenças bem variado, com muitas morbidades e mortalidades, incluindo faringoamigdalites, infecções de pele e partes moles, meningites, pneumonias, septicemias e síndromes do choque tóxico estreptocócico, além de causar febres reumáticas e glomerulonefrites pós-estreptocócicas (FERREIRA e LEITE, 2013). O contágio por este microrganismo acontece por contato direto através de secreções, o que favorece sua disseminação em ambientes com grande número de indivíduos (MACIEL *et al.*, 2003).

Nos últimos 30 anos constatou-se um aumento frequente na incidência de infecções invasivas por esse patógeno, que pode explicado pelo aparecimento de cepas mais virulentas e resistentes. Além disso, verificou-se um maior número de pacientes imunodeficientes e de alterações sócio-demográficas populacionais, que ajudam na transmissão bacteriana (FERREIRA e LEITE, 2013).



Figura 6 – *Streptococcus pyogenes*

Fonte: *Streptococcus pyogenes*

4.3.5 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis (Figura 7) é a espécie mais frequente do gênero, é uma Gram-positiva, de células esféricas ou ovoides, que ocorrem em pares ou em cadeias curtas em meios líquidos. Esta bactéria não é formadora de esporos e às vezes move-se por escassos flagelos. Fermenta uma ampla variedade de carboidratos com produção, principalmente, de L(+) – ácido láctico, porém sem gás, com um pH final entre 4,2 e 4,6. Sua temperatura ideal para crescimento é 37 °C (HOLT *et al.*, 1994).

Compreende aproximadamente 80 a 85% de amostras isoladas de enterococos de material clínico, e pertencente ao grupo sorológico D de Lancefield. Membro da microbiota regular humana, encontra-se no trato intestinal, na mucosa oral e vaginal e na pele (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Podem originar doenças como infecções urinárias e endocardites (KAYAOGLU e ORSTAVIK, 2004).

Esse microrganismo possui diversos fatores de virulência, que incluem enzimas líticas, citolisinas, substâncias de agregação, feromônas e ácido lipoteicóico. Possuem capacidade de adesão às células do hospedeiro, proteínas que o permitem

competir com outras bactérias e aptidão para alterar respostas do indivíduo infectado, isto por causa do seu poder de suprimir ação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (STUART *et al.*, 2006).

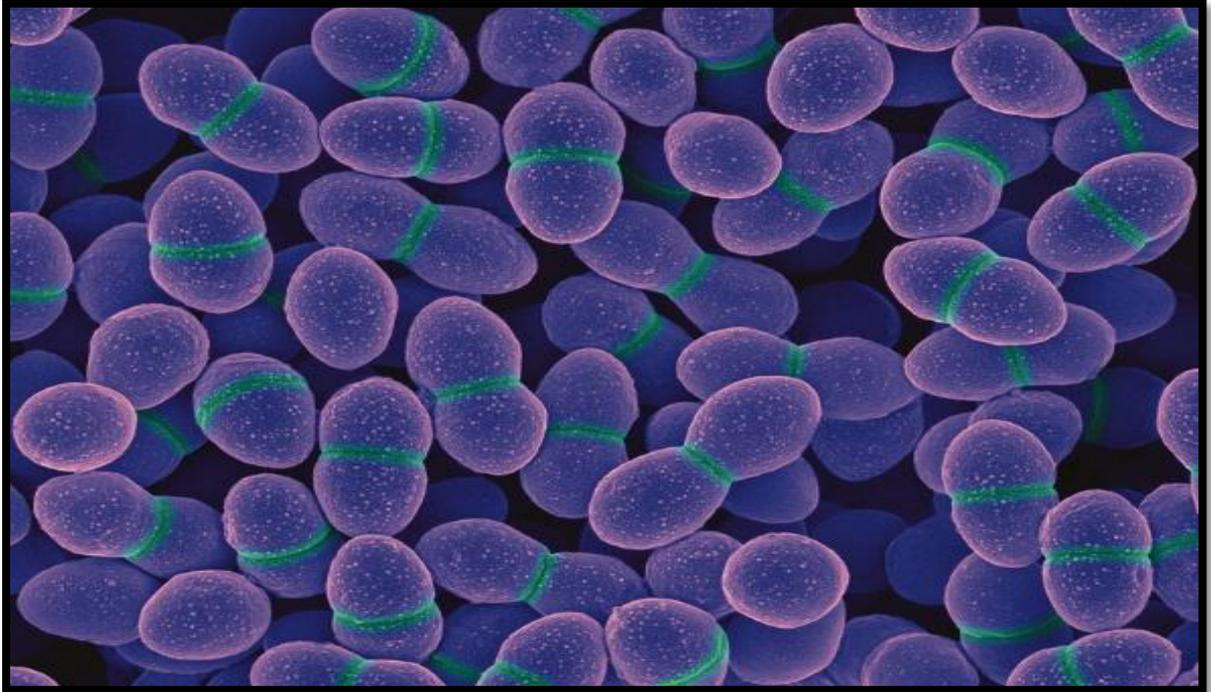


Figura 7 – *Enterococcus faecalis*

Fonte: Environmental Health Perspectives

O *E. faecalis* possui resistência intrínseca à muitos antimicrobianos usados, normalmente, no tratamento das infecções causadas por bactérias Gram-positivas. Neste contexto, ele se torna um obstáculo terapêutico enorme e assegura sua atuação como um importante patógeno hospitalar (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

4.4 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Os antimicrobianos são substâncias de origem natural, semissintética ou sintética, com capacidade de matar ou inibir o crescimento de um microrganismo,

responsável por uma doença infecciosa específica, provocando nenhuma ou pouca lesão (PALERMO NETO *et al.*, 2005).

A utilização prolongada e indiscriminada de compostos antimicrobianos sintéticos não é aconselhada, visto que isto leva à seleção de microrganismos patogênicos mais resistentes. No Brasil, o problema se intensifica, pois as pessoas tem o costume de se automedicar, utilizando os antibióticos de forma errada, tanto na dosagem como na posologia. Devido à grande importância clínica, laboratorial e terapêutica, várias pesquisas já foram e estão sendo feitas com finalidade de se encontrar fármacos naturais, que possam ser menos tóxicos e que manifestem atividade contra cepas de microrganismos resistentes (REN *et al.*, 2014).

Entre vários compostos naturais que possuem atividade antimicrobiana pode-se encontrar a uva. Estudo feito por ÖZKAN *et al.* (2004) demonstrou a forte atividade antimicrobiana deste alimento. Além dele, pode-se citar, também, o chá preto, que num trabalho realizado por JARDIM JR *et al.* (2013), comprovou sua ação contra bactérias.

4.4.1 Bagaço de Uva

A árvore que produz a uva é a videira, também chamada de parreira; é originária do árido Cáucaso, na Ásia, desde 6.000 ac (KATO *et al.*, 2012). Esta fruta é umas das mais cultivadas no mundo (XU *et al.*, 2010), sendo que a produção brasileira em 2013 foi de 1.482.951 toneladas segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013).

A produção de uvas e vinhos no Brasil é uma atividade com muita importância socioeconômica e ela é concentrada nas regiões sul, sudeste e nordeste do país. Cerca de 50% da fabricação brasileira de uvas é destinada a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados (ROCKENBACH, 2008). Para a produção deste segundo, as uvas da espécie *Vitis labrusca* são as mais usadas na América do Sul. No Brasil, a vitivinicultura se desenvolveu tendo base nas uvas americanas, que são mais comuns, como a mencionada agora e a *Vitis bourquina*, utilizadas, também, para a produção de vinhos de mesa. Contudo, no século XX, o país já começou a produzir vinhos finos, com uvas da variedade *Vitis vinifera*, conhecidas como uvas finas. Dentre os cultivares

de *Vitis labrusca* plantados, o cultivar Bordô tem uma representação significativa, pois possui muita adaptação ao clima brasileiro, fertilidade e tolerância a doenças fúngicas.

Agora, com relação aos resíduos, nas vinícolas há uma grande preocupação com o gerenciamento dos mesmos, dentre eles, o bagaço de uva é o mais importante, já que é gerado em maior quantidade. Este é constituído pelas cascas, sementes e talos da fruta, que sobram após a atividade industrial da produção de vinhos e sucos (SOUZA, 2013). No Brasil, a maior parte desse bagaço é tratado como resíduo de baixo valor, sendo, então, destinado para a ração animal.

Os resíduos agroindustriais gerados pelas vinícolas merecem notoriedade por serem fontes abundantes de compostos fenólicos e pela grande quantidade formada do processamento, já que o total deles, bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo representam cerca de 30% do volume de uvas usadas para a fabricação do vinho (MELO, 2010). Dados da indústria demonstram que para a produção de 100 L de vinho branco, por exemplo, são gerados 31,7 kg de resíduos, dos quais 20 kg são de bagaço de uva (ROCKENBACH, 2008).

O extrato obtido dos bagaços têm ingredientes funcionais, tais como antioxidantes naturais e suplementos alimentares, pois é nas sementes e nas cascas da uva onde estas substâncias se acumulam, majoritariamente. Estes compostos podem ser classificadas em flavonóides e não-flavonóides (SOUZA, 2013). No primeiro grupo estão as flavanas, flavonóis e as antocianinas; já no segundo estão os ácidos benzoicos e os ésteres tárticos (GENOVESE *et al.*, 2007). Os flavanóides são reconhecidos por exibirem várias atividades biológicas, tais como: atividade antioxidante, antimicrobiana, capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio, inibir a nitrosação, quelar metais e modular a atividade de algumas enzimas celulares (SOUZA, 2013).

Com relação às atividades antimicrobianas dos bagaços de uva, um estudo feito por ÖZKAN *et al.* (2004), que utilizava extratos de duas cultivares distintas da fruta (Emir e Kalecik Karasi), apresentou ação antimicrobiana contra 13 diferentes bactérias patogênicas. Além desta pesquisa, muitas outras foram feitas, sendo que algumas delas, contendo as variedades de uva, as bactérias inibidas e as suas referências, estão representadas no Quadro 2.

Variedades da Uva	Bactérias	Referências
<i>Vitis vinifera</i> (Emir e Kalecik karasi)	<i>E. faecalis</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> ...	Özkan <i>et al.</i> , 2004
<i>Vitis vinifera</i> (Posip)	<i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>C. jejuni</i> ; <i>S. infantis</i> ; <i>E. coli</i> .	Katalinik <i>et al.</i> , 2012
<i>Vitis vinifera</i> (Lasin)	<i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>C. jejuni</i> ; <i>S. infantis</i> ; <i>E. coli</i> .	Katalinik <i>et al.</i> , 2012
<i>Vitis vinifera</i> (Merlot)	<i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> .	Oliveira <i>et al.</i> , 2012
<i>Vitis vinifera</i> (Syrah)	<i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> .	Oliveira <i>et al.</i> , 2012
<i>Vitis labrusca</i> (Bordô)	<i>S. aureus</i> ; <i>L. monocytogenes</i> ; <i>S. enteritide</i> .	Souza, 2013

Quadro 2 –Estudos já realizados que demonstram a atividade antibacteriana da uva.

4.4.2 Chá Preto

O chá é uma das bebidas mais consumidas e antigas do mundo, e na literatura é indicado como uma das melhores fontes de compostos fenólicos (MORAIS *et al.*, 2009). É um alimento de origem vegetal, proveniente de arbustos identificados como *Camellia sinensis*. O chá preto corresponde à maior parte do colhimento e é o tipo mais consumido no Estados Unidos, no Reino Unido, na Europa e na Índia. Cerca de 78% da produção mundial de chá é a dele (LIPTON CHÁ & SAÚDE, 2004).

Este chá é feito por meio da exposição das suas folhas ao ar, com finalidade de provocar um processo natural de fermentação, que o deixa com cor escura e confere à ele um aroma intenso (LIPTON CHÁ & SAÚDE, 2004). Ele possui em sua composição vitaminas do complexo B e C, ácidos fenolcarboxílicos, taninos antioxidantes, bases púricas e catequinas. Sendo que estas últimas são flavonóides, que atuam como antioxidantes e sequestradores de radicais livres. Este chá ingerido na forma de infusão auxilia na extração dos compostos fenólicos, que são considerados benéficos à saúde (MORAIS *et al.*, 2009).

O chá preto tem potencial anticarcinogênico, antimutagênico e capacidade para diminuir doenças cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2009). Além disso, há estudos que demonstram sua atividade antimicrobiana, como o realizado por JARDIM JR *et al.* (2013), que comprovou a eficácia deste chá em inibir o crescimento de fusobactérias bucais. Pode-se ver, também, pelo Quadro 3, que já foram feitos outros trabalhos a respeito da ação antibacteriana do chá; abaixo se encontram dados desses estudos realizados.

Chá preto	Bactérias	Referências
<i>Camellia sinensis</i>	<i>F. nucleatum</i> .	Jardim JR <i>et al.</i> , 2013
<i>Camellia sinensis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Flayyih <i>et al.</i> , 2013
<i>Camellia sinensis</i>	<i>M. luteus</i> ; <i>B. cereus</i> .	Chan <i>et al.</i> , 2011
<i>Camellia sinensis</i>	<i>S. Typhi</i> ; <i>V. cholerae</i> .	Mandal <i>et al.</i> , 2011
<i>Camellia sinensis</i>	<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> .	Funmilayo <i>et al.</i> , 2012
<i>Camellia sinensis</i>	<i>S. aureus</i> ; <i>B. cereus</i> ; <i>S. typhimurium</i> ; <i>E. coli</i> .	Ching, 2007

Quadro 3 – Estudos já realizados que demonstram a atividade antibacteriana do chá preto.

4.5 COMPOSTOS BIOATIVOS

Alimentos de origem vegetal possuem compostos com atividades biológicas, que são fomentadoras da saúde, tais como: anti-inflamatórias, antioxidantes e hipocolesterolêmica. A oportunidade de reduzir a ameaça de doenças através da dieta vem chamando atenção da comunidade científica e das indústrias alimentícias, pois têm o propósito comum de elaborar os chamados “alimentos funcionais”, cheios de um ou mais compostos bioativos que exibem efeitos benéficos à saúde.

As substâncias bioativas podem ser identificadas como nutrientes e/ou não nutrientes com execução metabólica ou fisiológica específica. Podem pôr em atividade seus efeitos, atuando como antioxidantes, estimulando enzimas de detoxificação hepática, obstruindo a operação de toxinas virais ou bacterianas, impossibilitando a absorção do colesterol, minimizando a agregação plaquetária, ou eliminando bactérias gastrintestinais malélicas. Alguns desses compostos já possuem relatos comprovados: ácidos fenólicos, ácidos graxos, cafeína, bicarbonato de sódio, estereato de sódio, fibras, fibra de aveia, frutooligossacarídeos, fitoesteróis, inulina, lactulose, licopeno, sorbitol, manitol, quitosana e xilitol (QUEIROZ, 2012).

4.5.1 Compostos Fenólicos → Flavonoides

Os compostos ativos frequentemente mais encontrados em frutas e hortaliças são as substâncias fenólicas, que já se sabe são potentes antioxidantes e

antagonistas naturais de patógenos. Elas estão nos vegetais de maneira livre ou ligada à açúcares e proteínas (CATANEO *et al.*, 2008). São metabólitos secundários de plantas e contêm em sua estrutura química um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxila, podendo diversificar entre uma molécula fenólica simples (Figura 8) e um polímero complexo de peso molecular alto (ALVES, 2013).

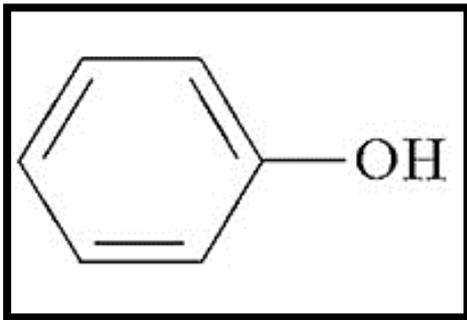


Figura 8 – Estrutura simples de molécula fenólica

Fonte: LookForDiagnosis.com

Não há uma classificação única para os compostos fenólicos. As categorizações mais vistas na literatura se baseiam na quantidade e arranjo da cadeia de carbonos e na via biossintética da qual o grupo foi produzido (ARAÚJO, 2014). Eles podem ser separados conforme o tipo de seu esqueleto principal, conforme o Quadro 4, em que C6 equivale ao anel benzênico e CX a cadeia substituinte com x átomos de carbono (ROCHA, 2011).

Esqueleto básico	Classe de Compostos Fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides, ácido cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides e isoflavonoides
(C6-C3-C6) ₂	Lignanas
(C6-C3) ₂	Diflavonoides
(C6) _N	Melaninas vegetais
(C6-C3) _N	Ligninas
(C6-C1) _N	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _N	Taninos condensados

Quadro 4 – Classes de compostos fenólicos, segundo seu esqueleto básico.

Fonte: ROCHA, 2011.

Um dos grupos mais significativos, variados e amplamente distribuídos nos produtos de origem e no reino vegetal são os flavonoides. Estes e os isoflavonoides incluem-se numa classe de fitoquímicos que não podem ser sintetizados por humanos, portanto, necessitam de uma ingestão dietética. Contudo, a preparação dos alimentos para consumo, em certas ocasiões, pode gerar perdas desses compostos, sendo o grau dependente do tipo de alimento e preparo utilizado. Sem embargo, são moderadamente estáveis, pois conseguem resistir a oxidação, à temperaturas elevadas e à razoáveis variações de acidez.

Quanto às funções dos flavonoides nas plantas pode-se citar muitas: ação antioxidante, inibição enzimática, proteção contra microrganismos e proteção contra a incidência de raios ultravioletas. Estes compostos vem sendo de interesse por causa de seus efeitos biológicos estudados *in vitro*, como exemplos: limpeza de radicais livres, interdição de proliferação celular, modulação da atividade enzimática, assim como seu uso potencial com finalidade antibiótica, antialérgica, antidiarreica, antiúlcera e anti-inflamatória (ROCHA, 2011).

A estrutura básica (Figura 9) dos flavonoides baseia-se de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos, A e B, agrupados pelo carbono heterocíclico do pirano. De acordo com o estado de oxidação da cadeia heterocíclica deste, tem-se classes distintas dos flavonoides: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas, antocianinas, diidroflavonóis e chalconas (ROCHA, 2011). No Quadro 5 estão representados os quatro maiores grupos, seus componentes e fontes de alimentos.

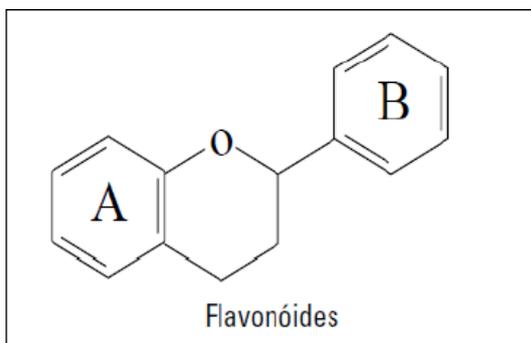


Figura 9 – Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: ROCHA, 2011.

Importante salientar que observando-se o Quadro 5, muitos dos flavonoides estão presentes na uva (incluso bagaços) e no chá. E não somente isso, diversos trabalhos já foram realizados para quantificar compostos fenólicos nestes alimentos. Num estudo feito por LIMA & MÉLO (2004), por exemplo, foi encontrado num chá preto com infusão de 10 minutos, 99,77 mg/g de fenólicos totais (da fonte vegetal em equivalente de catequina). E numa pesquisa feita por CATANEO *et al.* (2008), os autores verificaram que nos extratos de acetona 80% do bagaço seco de uva COUDERC havia entre 109,64 e 207,80 mg de fenólicos totais em 100 g equivalente de ácido gálico. Sendo que a mesma análise foi feita para os extratos do bagaço seco de uva PINOT GRIS, com resultados entre 370,17 e 420,61 mg GAE/100g.

GRUPOS	COMPONENTES	FONTE ALIMENTAR
Flavonas	Apigenina Chrisina Kaempferol Luteolina Miricetina Rufina Sibelina Quercetina	Cascas de maçãs Cerejas Brócolis Peles de frutas Cranberries Uvas Alface Oliva Alho
Flavanonas	Fisetina Hesperetina Narigina Naringenina Taxifolina	Frutas cítricas Peles de frutas cítricas
Catequinas	Catequina Epicatequina Epigallocatequina galate	Vinho tinto Chá
Antocianinas	Cianidina Delfinidina Malvidina Pelargonidina Peonidina Petunidina	Cerejas Uvas Raspberries Uvas vermelhas Morangos Chá Peles de frutas com pigmentos escuros

Quadro 5 – Grupos de flavonoides, com seus componentes e fontes alimentares.

Fonte: ROCHA, 2011.

5 METODOLOGIA

5.1 BACTÉRIAS

Para verificação da sensibilidade e inibição do crescimento bacteriano, pelos extratos, do bagaço de uva e do chá preto, e pelos antibióticos, cefalexina e amoxicilina, foram analisadas cinco espécies de bactérias, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Todas as bactérias utilizadas nesse trabalho estavam disponíveis no banco de cepas, do Laboratório de Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. Estes microrganismos foram controlados qualitativamente pela coloração de Gram e testes bioquímicos, além de serem analisados em meios seletivos e/ou diferenciais. Meios de cultivo adequados para o crescimento de cada bactéria foram utilizados para ativação e manutenção das cepas. O cultivo foi realizado em placas de Petri ou tubos de ensaio, os quais foram colocados em estufa, na temperatura de 37 °C, por 24 horas. A conservação foi realizada na geladeira em 4 °C, com repiques e ativações sucessivas.

5.1.1 Coloração de Gram, Testes Bioquímicos e Meios Seletivos e/ou Diferenciais

A análise qualitativa das bactérias foi realizada pela técnica de coloração de Gram e pelas seguintes provas bioquímicas: teste da lactose, teste da glicose, teste do vermelho-de-metila, teste do citrato e teste de produção de indol. A coloração bem como todos estes testes mencionados foram realizados segundo as metodologias descritas por RIBEIRO e SOARES (2002).

Meios seletivos e/ou diferenciais foram preparados para a verificação do crescimento, seleção e diferenciação das bactérias. São eles: Ágar cetrimide e Ágar MacConkey. A análise da presença de *E. coli* e de *E. faecalis* foi realizada nos testes qualitativos ReadyCult Coliforms e Enterolert, respectivamente.

5.2 AMOSTRAS

O bagaço de uva foi obtido do processo de fabricação de vinhos da região de Toledo, PR, sendo a amostra da espécie *Vitis labrusca*, da variedade bordô. O processamento inicial da amostra foi realizado em parceria com a UFPR, nos laboratórios vinculados a Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. A amostra foi submetida a um processo de secagem em estufa de circulação de ar por 36 horas, na temperatura de 40 °C. Posteriormente, foi moída em moinho de facas e armazenada em embalagem plástica de polietileno de baixa densidade (PEBD), selada a vácuo, ao abrigo da luz. O bagaço ficou armazenado no congelador da geladeira do laboratório de Biotecnologia da UTFPR, sendo mantido na temperatura de -18 °C.

O chá preto, *Camellia sinensis*, foi adquirido no Mercado Municipal de Curitiba, na forma de pó, embalado e lacrado. Armazenado na geladeira, à 4 °C, no laboratório de Biotecnologia da UTFPR.

Ambos foram preservados desta forma até a extração dos seus compostos, para utilização na avaliação de atividades antimicrobianas.

5.3 EXTRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos do bagaço de uva e do chá preto foram extraídos com etanol 40% (v/v) (HAMINIUK *et al.*, 2011) em frascos Erlenmeyer contendo 1 g de amostra para 20 mL de solvente. Os frascos foram agitados em shaker, a 120 rpm por 3 horas. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante de cada amostra foi filtrado em membrana de PVDF, com diâmetro de 13 mm e poro 0,45 µm. As amostras filtradas (extrato bruto com compostos bioativos) foram armazenadas em frascos âmbar e estéreis no congelador, a - 18°C.

5.3.1 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados no extrato bruto por análise colorimétrica, segundo a metodologia de SINGLETON *et al.* (1965) a 765 nm, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE) (VASCO *et al.*, 2008).

5.4 ANTIBIÓTICOS (PREPARO DE SOLUÇÕES)

Com a finalidade de se averiguar a resistência ou não das bactérias, foram utilizados como controles positivos dois tipos diferentes de antibióticos: a cefalexina (Medley) e a amoxicilina (EMS). O preparo da solução de cada antibiótico foi realizado da seguinte forma: Misturou-se 60 mg do pó de cada um, proveniente da cápsula, em 100 mL de água destilada. Sendo que na utilização, nos testes de difusão em ágar com perfuração de poços, foram analisadas as concentrações de 30 e 15 µg para 100 µL de solução.

5.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

5.5.1 Teste de Difusão em Ágar com Perfuração de Poços

A atividade antimicrobiana dos compostos foi avaliada de acordo com a metodologia sugerida pela *National Committee for Clinical Laboratory Standart* (NCCLS, 2003).

As avaliações foram procedidas utilizando-se todos os extratos com uma cepa de cada vez. Primeiramente, 48 horas antes da realização dos testes, os microrganismos foram ativados em caldo BHI, depois de 24 horas foram repicados para placas com ágar nutriente e, então, no hora do ensaio foram inoculados em

solução salina estéril (0,9% m/v). Sendo o inóculo padronizado conforme descrito em 5.5.3.

5.5.2 Preparo de Placas de Petri para os Ensaio

As placas de Petri utilizadas para os testes foram autoclavadas com papéis filtros em sua superfície (ou seja, na sua tampa), para evitar riscos de contaminação. Foi preparado, também, meio de cultura ágar Mueller-Hinton para preenchimento de 40 mL por placa. As placas, o meio e os cilindros de aço inoxidável, de 8 mm de diâmetro, usados para perfuração, foram esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

Utilizando-se a câmara de fluxo laminar, o procedimento em cada placa foi assim preparado: adicionou-se 20 mL do meio de cultivo, citado aqui anteriormente, para formação de uma camada basal; depois de endurecido o meio, foram colocados os cilindros, sendo 3 em cada placa (para a triplicata); então, se acrescentou mais 20 mL de ágar Mueller Hinton; após resfriamento do meio, foram retirados os aços com auxílio de uma pinça estéril (GHENOV, 2014).

5.5.3 Padronização do Inóculo e Inoculação

Os inóculos foram padronizados por meio da Escala de McFarland, sendo realizada no dia do teste. Nesse sentido, foi feito o padrão equivalente ao valor de 0,5 desta escala, que corresponde a mistura de 0,5 mL da solução de BaCl_2 0,048 mol/L e 99,5 mL da solução de H_2SO_4 1% (v/v). Isto se assemelha à uma suspensão que contém cerca de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ células/mL de bactérias (NCCLS, 2003).

Com ajuda de uma alça de platina estéril, as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaios, contendo solução salina estéril (0,9 m/v), que foram agitados em agitadores do tipo vórtex para mistura e homogeneização da solução. Comparou-se visualmente a igualdade da densidade óptica da suspensão de células do inóculo à

da escala de McFarland, com auxílio de uma folha branca com linhas contrastantes pretas (GHENOV, 2014).

A inoculação foi feita em ágar Mueller-Hinton, até 15 minutos depois da padronização. Os passos adaptados dessa metodologia, descrita por FERRONATO e SALMASO (2010) está apresentada na Figura 10.

- I. O swab, que deve ser estéril, é mergulhado no inóculo padronizado;
- II. Apertando-se e girando-se o swab contra a parede do tubo de ensaio, é removido o excesso de inóculo;
- III. Com estrias bem juntas uma da outra, é passado o swab na superfície do ágar, tomando-se cuidado para não atingir o interior dos poços. O que deve ser repetido mais duas vezes, girando-se a placa em torno de 60° a cada vez. Por último, o swab é passado em toda a borda da placa.
- IV. Pode-se deixar as tampas entreabertas por 3 a 5 minutos, na cabine de fluxo laminar, para retirada do excesso de umidade;

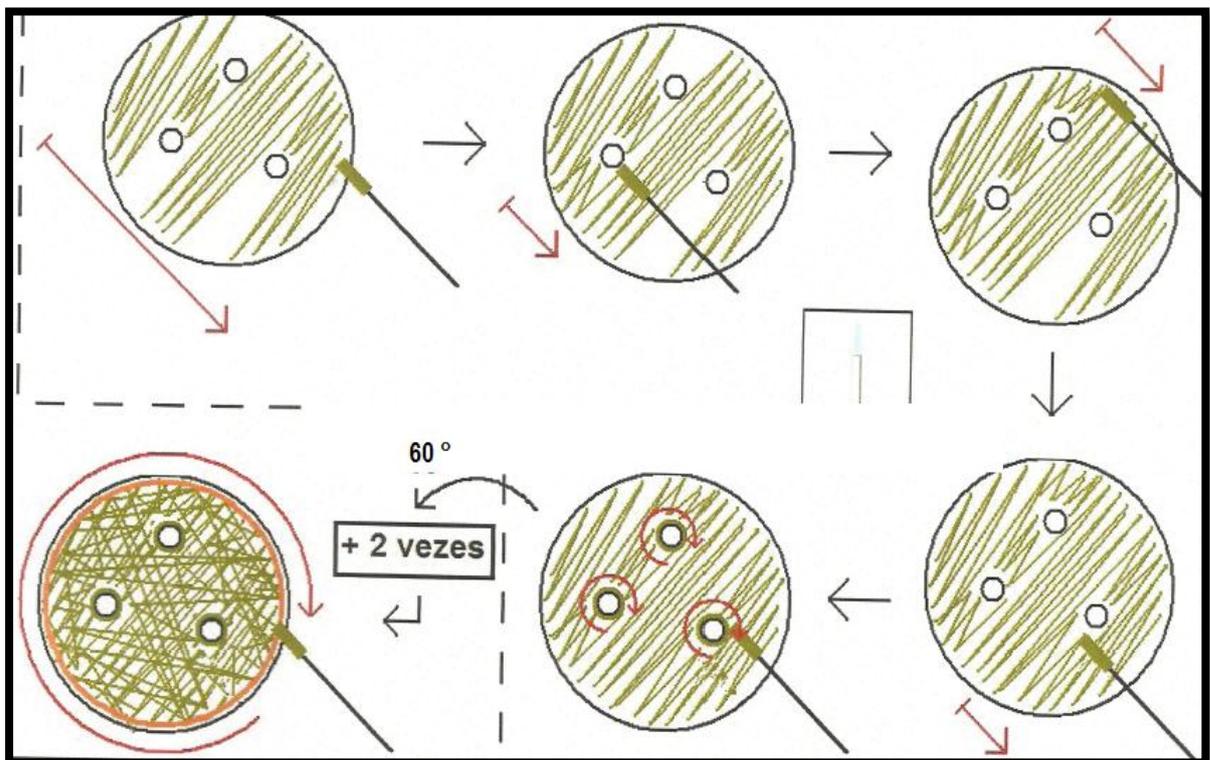


Figura 10 – Inoculação das placas para os ensaios de difusão em ágar com poços.

Fonte: FERRONATTO & SALMASO, 2010.

5.5.4 Aplicação das Amostras e dos Antibióticos nas Placas

Para a verificação da atividade antimicrobiana, foram aplicados nas placas inoculadas, um extrato bruto (100%), três diluições hidroalcoólicas do mesmo (75, 50 e 25%) e mais duas misturas do composto bruto com cada um dos antibióticos, 50/50% e 75/25%, respectivamente. Como controle positivo, usou-se os fármacos, cefalexina e amoxicilina, 50 e 25%, e um controle negativo, o etanol 40%. As concentrações dos antibióticos e extratos utilizados podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações dos antibióticos (amoxicilina e cefalexina) e dos extratos hidroalcoólicos (bagaço de uva bordô e chá preto) em cada poço.

Amostras	Concentração*
Etanol 40%	40 µL
Antibiótico 50%	30 µg
Antibiótico 25%	15 µg
Extrato 100%	5.000 µg
Extrato 75%	3.750 µg
Extrato 50%	2.500 µg
Extrato 25%	1.250 µg
Extrato 50% + Antibiótico 50%	2.500 µg + 15 µg
Extrato 75% + Antibiótico 25%	3.750 µg + 7,5 µg
Extrato 50% + Antibiótico 50%	2.500 µg + 15 µg
Extrato 75% + Antibiótico 25%	3.750 µg + 7,5 µg

*Concentração em µL ou µg de amostra para 100 µL de solução.

Em um ambiente estéril, foram depositados em cada poço (triplicata) 100 µL de uma das soluções ditas acima. Posteriormente, as placas foram incubadas por aproximadamente 18 horas em estufas, a 37 °C. Terminado este período, mediu-se as zonas de inibição do crescimento microbiano, em milímetros, com ajuda de um paquímetro.

5.5.5 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima (CIM / CBM)

A análise da concentração inibitória mínima, dos extratos e dos antibióticos, foi feita na bactéria que apresentou maior sensibilidade no estudo anterior. Foi realizada através do método da macrodiluição em caldo, com base no protocolo da *Nature Protocols: "Ágar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances"* (WIEGAND *et al.*, 2008). Para esta determinação, utilizou-se as concentrações dos antibióticos que estão representadas na Tabela 2, e dos extratos as retratadas na Tabela 3. A avaliação da inibição foi realizada após 16-20 horas de incubação dos tubos de ensaio, cultivados à 37°C.

Tabela 2 – Concentrações dos antibióticos e concentrações finais utilizadas no teste CIM.

Concentrações antibiótico (mg/L)	Volume de caldo nutriente (mL)	Concentração obtida (mg\L)	Concentração final no teste (mg/L)*
1280	9	128	64
128	1	64	32
128	3	32	16
128	7	16	8
16	1	8	4
16	3	4	2
16	7	2	1
2	1	1	0,5
2	3	0,5	0,25
2	7	0,25	0,125
0,25	1	0,125	0,0625
0,25	3	0,0625	0,03125

*Concentração final obtida após a adição de 1 mL da suspensão bacteriana em um tubo contendo 1 mL de cada antibiótico diluído em caldo nutriente.

Tabela 3 – Volume dos extratos hidroalcoólicos e concentrações finais utilizadas no teste CIM.

Volume de extrato hidroalcoólico (mL)¹	Volume de caldo nutriente (mL)	Concentração obtida (mg/L)	Concentração final no teste (mg/L)²
1	0	50.000	25.000
0,9	0,1	45.000	22.500
0,8	0,2	40.000	20.000
0,75	0,25	37.500	18.750
0,7	0,3	35.000	17.500
0,6	0,4	30.000	15.000
0,5	0,5	25.000	12.500
0,4	0,6	20.000	10.000
0,3	0,7	15.000	7.500
0,25	0,75	12.500	6.250
0,2	0,8	10.000	5.000
0,1	0,9	5.000	2.500

¹ Volume do extrato hidroalcoólico 100% (50.000 mg/L) a ser diluído em caldo nutriente.

² Concentração final obtida após a adição de 1 mL da suspensão bacteriana em um tubo contendo 1 mL de cada extrato hidroalcoólico diluído em caldo nutriente.

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada segundo a metodologia descrita pelo mesmo protocolo mencionado acima. Neste teste, usou-se as amostras que possuíam concentrações mais próximas daquela onde houve inibição da cepa bacteriana, verificada na análise da CIM. Amostras de 100 µL do conteúdo dos tubos do teste CIM, foram pipetadas em placas de Petri contendo ágar nutriente, através da técnica de espalhamento. Transcorridas 16-20 horas de incubação (37°C), foi verificado o crescimento ou a inibição bacteriana.

5.6 TESTES ESTATÍSTICOS

Para análise dos dados foram feitos testes estatísticos, teste de Tukey ($p < 0,05$), para comparação das médias e para verificação das diferenças significativas entre os experimentos de controle e os tratamentos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Coloração de Gram, Provas Bioquímicas e Meios Seletivos e/ou Diferenciais

Com o objetivo de controlar qualitativamente as bactérias para o estudo, foram realizadas para as cinco cepas estudadas a coloração de Gram e as provas bioquímicas. Com os dados fornecidos pelos testes (Quadro 6) foi possível verificar as características fisiológicas dos microrganismos e a maneira de atuação do metabolismo bacteriano.

Testes	Bactérias					
	Controle	<i>E. coli</i> ¹	<i>S. aureus</i> ²	<i>P. aeruginosa</i> ³	<i>S. pyogenes</i> ⁴	<i>E. faecalis</i> ⁵
Gram		-	+	-	+	+
Lactose	-	+	+	-	+	+
Glicose	Sem gás (-)	Com gás (+)	Sem gás (+)	Sem gás (-)	Sem gás (+)	Sem gás (+)
Vermelho de Metila	-	+	+	-	+	+
Indol	-	+	-	-	-	-
Citrato Simmons	-	-	-	+	-	-

Quadro 6 – Resultados dos testes de Gram e bioquímicos.

¹ ATCC 25922; ² ATCC 25923; ³ ATCC 27853; ⁴ ATCC 19615; ⁵ ATCC 29212.

A coloração de Gram é uma técnica utilizada para diferenciar bactérias, referindo-se à composição da parede celular. As Gram-positivas contêm uma camada grossa de peptidoglicano e ácido teicóico, e as Gram-negativas apenas uma fina base do primeiro composto sobre a qual se encontra outra camada, constituída por lipoproteínas, proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (RIBEIRO e SOARES, 2002). Ao final do processo prático, devido à sequência de etapas realizadas, com corantes e álcool, as células das bactérias Gram-positivas ficam coradas de violeta e das Gram-negativas se tornam rosas.

Atestou-se que três das espécies de bactérias utilizadas nos estudos são Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*) e que as outras duas são Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). A Figura 11 mostra as imagens captadas da coloração de Gram dessas bactérias, neste estudo.

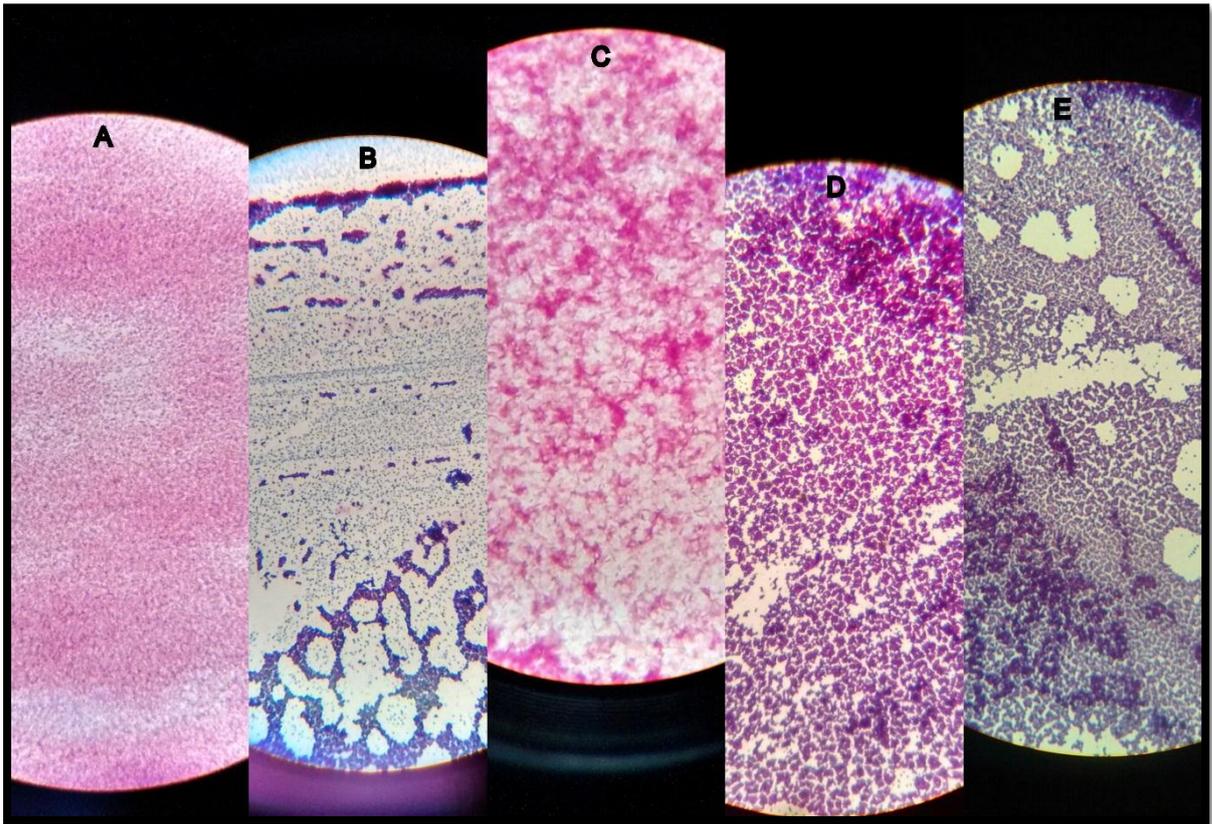


Figura 11 – Fotografias das bactérias estudadas, em microscópio óptico, após coloração de Gram, com aumento de mil vezes.

A: *E. coli* ATCC 25922; B: *S. aureus* ATCC 25923; C: *P. aeruginosa* ATCC 27853; D: *S. pyogenes* ATCC 19615; E: *E. faecalis* ATCC 29212.

Com relação às provas bioquímicas, o teste da lactose tem como princípio definir a capacidade de uma bactéria hidrolisar esta substância integrada num meio base com formação de ácido. Desta forma, o microrganismo que contenha a enzima lactase consegue fracionar a lactose em D-glicose e D-galactose, sendo que a fermentação desta libera ácidos. Já a bactéria que não contém a enzima citada, não libera ácidos e deteriora a peptona contida no meio, restando NH_3 . Com a presença

desta base e do indicador vermelho de fenol, ocorre a viragem deste para um pH alcalino (RIBEIRO e SOARES, 2002). Assim, na visualização do resultado, se o meio base estiver rosa (ou pouco alaranjado), não há ácidos; e se ele estiver amarelo, a acidez se faz presente.

Das bactérias estudadas, somente a *Pseudomonas aeruginosa* não libera ácidos a partir da degradação da lactose. Porque ela não possui lactase, o que gera um resultado negativo no teste (Figura 12). Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado (VETBACT).



Figura 12 –Resultados do teste da lactose.

A: *E. coli* ATCC 25922; B: *S. aureus* ATCC 25923; C: Controle; D: *P. aeruginosa* ATCC 27853; E: *S. pyogenes* ATCC 19615; F: *E. faecalis* ATCC 29212.

No teste da glicose os microrganismos que fazem a fermentação desse açúcar liberam ácidos. E alguns deles, além de gerarem ácidos, possuem a enzima formiase, degradam o ácido fórmico e produzem gás. O resultado é negativo se não houver fermentação, deixando a cor do meio rosa (ou alaranjada). Se for positivo o

meio ficará com a cor amarela, porque houve produção de ácidos, e se houver bolhas significa que houve produção de gases (RIBEIRO e SOARES, 2002).

Na Figura 13, observa-se que somente a *P. aeruginosa* não fermenta a glicose e apenas a *Escherichia coli* libera gases no processo. Estes resultados podem ser confirmados pelo site da VETBACT e pelo LAMISSION, sendo que este último valida o resultado negativo da *P. aeruginosa*.



Figura 13 – Resultados do teste da glicose.

A: Controle; B: *S. aureus* ATCC 25923; C: *E. coli* ATCC 25922; D: *P. aeruginosa* ATCC 27853; E: *S. pyogenes* ATCC 19615; F: *E. faecalis* ATCC 29212.

O teste de vermelho-de-metila avalia a capacidade do microrganismo produzir ácidos orgânicos moderadamente estáveis, através da fermentação da glicose, de maneira que vença o tamponamento do meio. Então, se a cor do meio ficar vermelha o resultado é positivo, indicando a produção de ácido com a fermentação da glicose, originado pH final baixo (4,5), superando o sistema tampão de fosfato. Contudo, num resultado negativo, a cor do meio permanece amarela, pois mesmo que os

microrganismos produzam ácidos, o pH é maior (6,0); porque eles seguem metabolizando os primeiros compostos da fermentação pela descarboxilação, que gera acetoína (RIBEIRO e SOARES, 2002).

Das bactérias estudadas, a *E. coli*, o *S. aureus*, o *S. pyogenes* e o *E. faecalis* são VM (+). Os dados estão apresentados na Figura 14, e são comprovados para a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* pela VETBACT; para o *S. aureus* por EL-HADEDY e EL-NOUR (2012); e para o *S. pyogenes* por FELSIA *et al.* (2011).

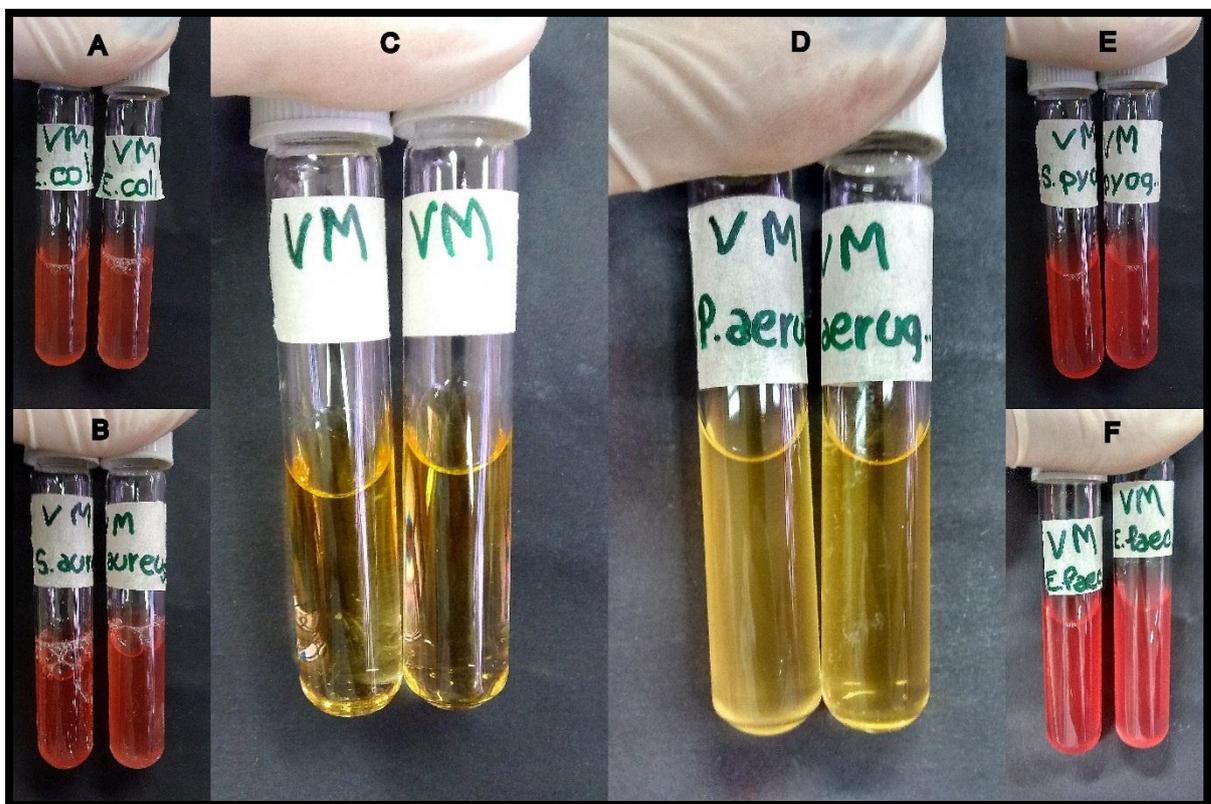


Figura 14 – Resultados do teste de vermelho-de-metila.

A: *E. coli* ATCC 25922; B: *S. aureus* ATCC 25923; C: Controle; D: *P. aeruginosa* ATCC 27853; E: *S. pyogenes* ATCC 19615; F: *E. faecalis* ATCC 29212.

No teste de produção de indol se faz a determinação do potencial de uma bactéria produzir indol através da degradação de uma molécula de triptofano. No momento da leitura do teste, se adiciona gotas do reativo de Kovacs e este revela a presença de indol, caso o resultado seja positivo. O que ocorre, neste caso, é que o p-dimetil-amido-benzaldeído se une à molécula de indol, gerando uma substância

quinoidal de cor vermelha, manifestada pelo anel que se forma na massa alcoólica da superfície do meio. Esta reação de cor se faz por causa da reação dos grupos CH_2 do anel pirrólico (presente na molécula de indol) com o aldeído, que estando em meio ácido, dá origem a uma quinona (RIBEIRO e SOARES, 2002). No teste negativo, o anel formado apresenta a cor do reagente utilizado.

Nesta avaliação, verifica-se, através da Figura 15, que apenas a *Escherichia coli* degrada a molécula de triptofano, produzindo, portanto, indol. Os resultados são atestados pelos sites VETBACT, MICROBIOLOGY LABORATORIES, SIGMA-ALDRICH e pelos estudos feitos por EL-RADEDY e EL-NOUR (2012) e FELSIA *et al.* (2011).

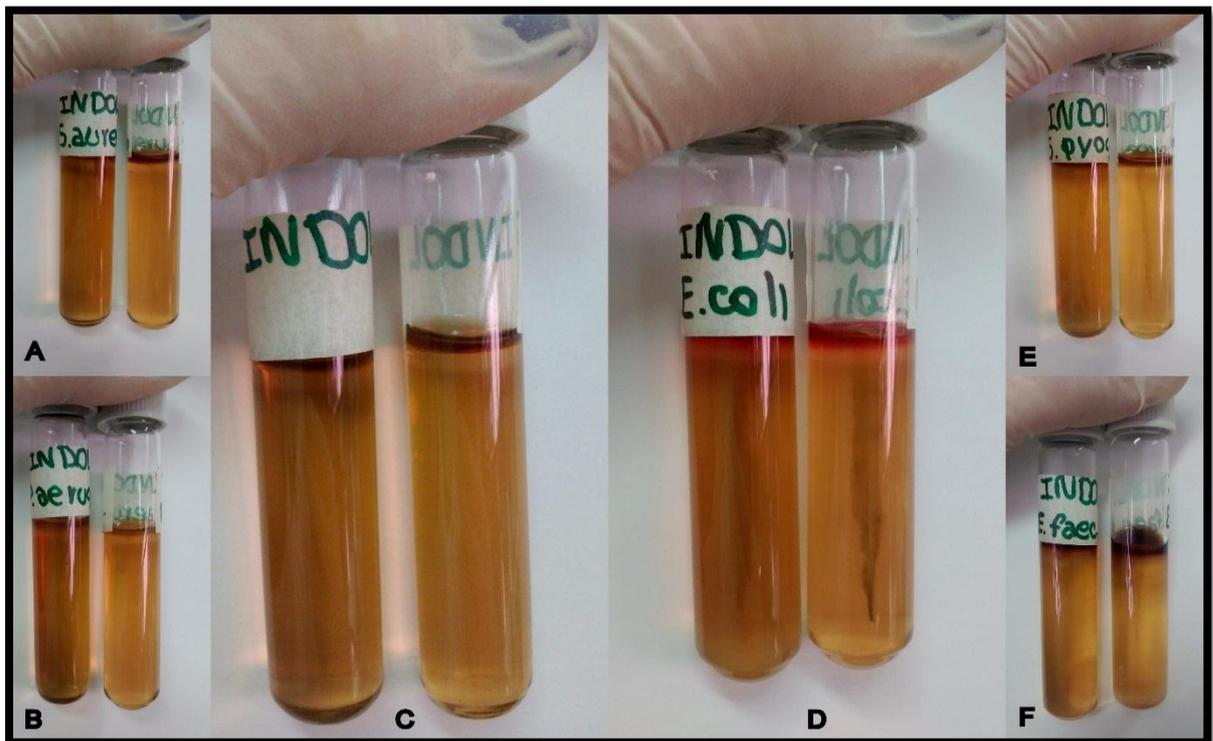


Figura 15 – Resultados do teste de produção de indol.

A: *S. aureus* ATCC 25923; B: *P. aeruginosa* ATCC 27853; C: Controle; D: *E. coli* ATCC 25922; E: *S. pyogenes* ATCC 19615; F: *E. faecalis* ATCC 29212.

No teste do citrato se analisa a capacidade de um microrganismo usar este composto como única opção de carbono para seu crescimento, causando alcalinização. Os microrganismos que metabolizam tal substrato, pelo ciclo de Krebs

ou pela fermentação, geram como produtos finais, num meio alcalino, acetato + formato. No meio de fermentação há sais de amônia inorgânica, além do citrato. E a bactéria capaz de utiliza-lo como exclusiva fonte de carbono, também usa os sais mencionados como fonte restrita de nitrogênio. O que faz com que estes se desdobrem em amoníaco, deixando o meio alcalino (RIBEIRO e SOARES, 2002).

A *P. aeruginosa* é a única bactéria estudada que utiliza o citrato como fonte de carbono (Figura 16). A mesma resolução, para as bactérias em estudo, foi afirmada pela VETBACT, LAMISSION e pela pesquisa feita por FELSIA *et al.* (2011).



Figura 16 – Resultados do teste do citrato.

A: Controle; B: *E. coli* ATCC 25922; C: *S. aureus* ATCC 25923; D: *S. pyogenes* ATCC 19615; E: *E. faecalis* ATCC 29212; F: *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Com relação aos meios de cultivo, para selecionar e diferenciar bactérias, foram escolhidos os seguintes: ágar MacConkey e ágar cetrimide. O primeiro, segundo a empresa BIOSYSTEMS, contendo 0,15% de sais biliares, cristal violeta e cloreto de sódio, é indicado para isolamento seletivo e diferenciação de coliformes e outros patógenos entéricos. É utilizado para reconhecimento e isolamento de microrganismos Gram-negativos, seja de amostras clínicas, de laticínios e alimentos,

de água, industriais ou farmacêuticas. Ele é seletivo pois sua concentração de sais biliares inibe organismos Gram-positivos.

Bactérias Gram-negativas frequentemente se desenvolvem bem no ágar MacConkey e se diferenciam pela capacidade em fermentar lactose. As fermentadoras desta substância crescem como colônias vermelhas ou rosadas e podem ser envolvidas por uma zona de precipitação ácida de bile. A cor vermelha aparece por causa da produção de ácido, devido à degradação da lactose, absorção do vermelho neutro, e conseqüentemente troca na coloração quando o pH do meio fica menor que 6,8. Linhagens não-fermentadoras do composto são transparentes, incolores, e normalmente não alteram a aparência do meio (BYOSYSTEMS).

Deste modo, a análise do crescimento das bactérias investigadas nesta pesquisa confirmou o que está exposto acima. Pois, como pode ser visto na Figura 17, no meio de cultivo em questão, só houve crescimento das bactérias: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que por sinal, são Gram-negativas. Sendo que a *E. coli*, por degradar a lactose, deixou o meio de cultivo rosa, e a *P. aeruginosa* ficou com colônias bem claras por não ser fermentadora da substância.

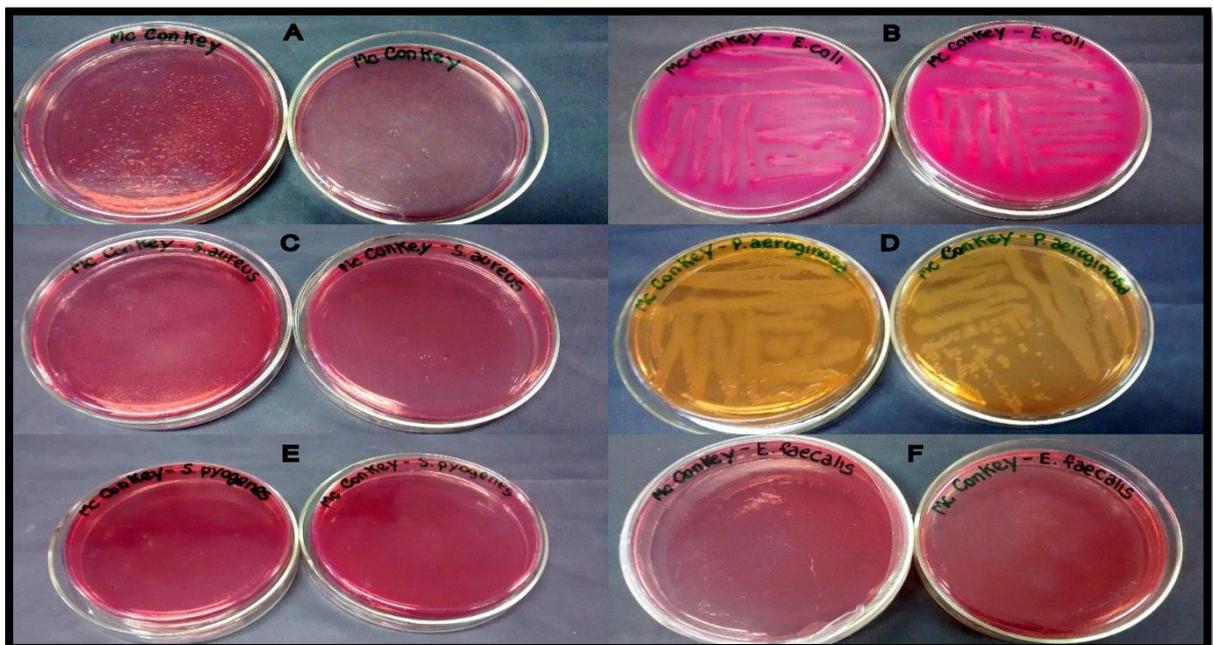


Figura 17 – Resultados do crescimento bacteriano em ágar MacConkey.

A: Controle; B: *E. coli* ATCC 25922; C: *S. aureus* ATCC 25923; D: *P. aeruginosa* ATCC 27853; E: *S. pyogenes* ATCC 19615; F: *E. faecalis* ATCC 29212.

Já o ágar cetrimide, conforme descrição do fabricante HIMEDIA, atua como um meio seletivo para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* de espécimes clínicos. Ele é um sal de amônio quaternário, que age como um detergente catiônico, reduzindo a tensão superficial no ponto de contato. Além disso, possui complexante, precipitante e efeitos desnaturantes nas proteínas de membrana bacterianas. Ele demonstra ações inibidoras em uma gama diversidade de microrganismos, incluindo *Pseudomonas*, com exceção da espécie *P. aeruginosa*. Sendo assim, conforme a Figura 18, fica claro que, das bactérias em estudo, apenas esta poderia crescer no ágar cetrimide.

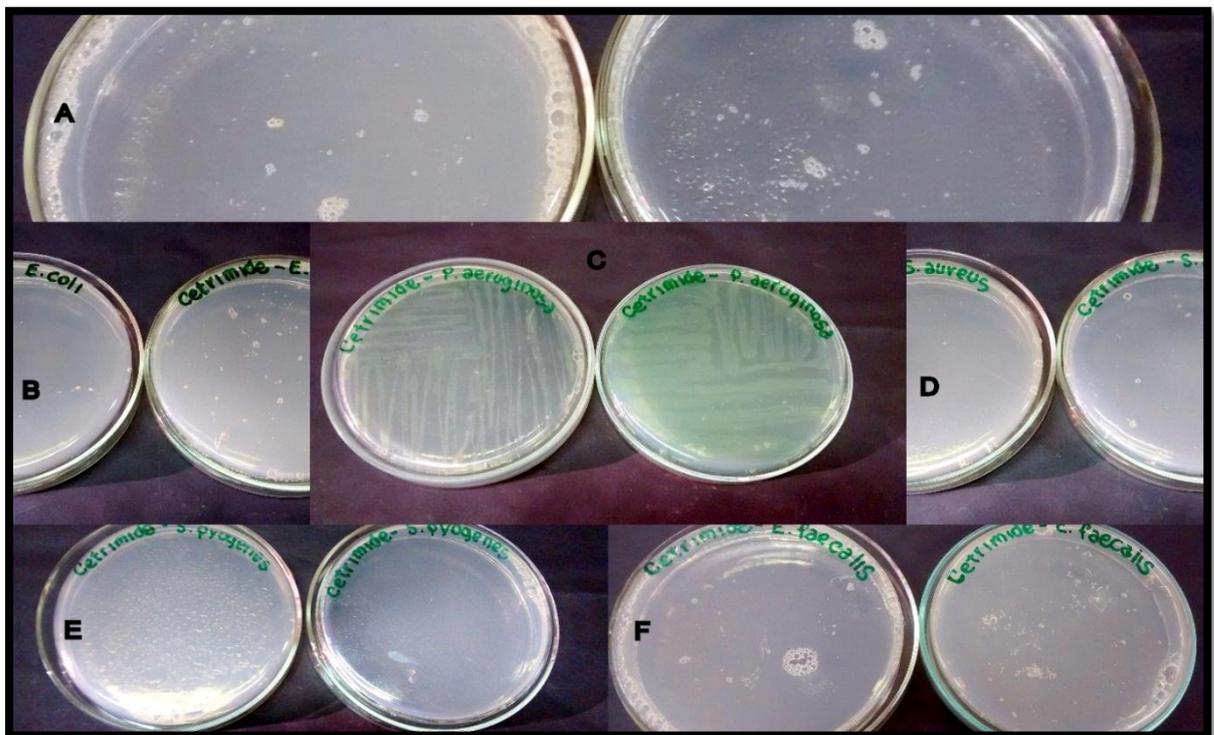


Figura 18 – Resultados do crescimento bacteriano em ágar cetrimide.

A: Controle; B: *E. coli* ATCC 25922; C: *P. aeruginosa* ATCC 27853; D: *S. aureus* ATCC 25923; E: *S. pyogenes* ATCC 19615; F: *E. faecalis* ATCC 29212.

Além das análises anteriores, também se fez uso do caldo enriquecido ReadyCult Coliforms, que segundo a PRÓ-ANÁLISE, é um meio seletivo para detecção conjunta de coliformes totais e *Escherichia coli*. A qualidade nutritiva das peptonas e do tampão de fosfato existentes nesse caldo de enriquecimento promovem

o crescimento rápido dos coliformes, enquanto o lauril fosfato impossibilita que a flora associada se desenvolva, principalmente, a Gram-positiva. A identificação de coliformes totais e *E.coli* é possível porque o substrato cromogênico X-GAL, que é incorporado ao meio, é quebrado por estes primeiros, e o substrato fluorogênico MUG, é bem intrínseco para esta bactéria. A presença dos coliformes e da *E. coli* é estabelecida pela mudança de coloração do meio, que passa a ser esverdeada ou azulada.

Neste trabalho, a qualidade de uma das bactérias estudadas, no caso a *E. coli*, foi certificada com base nas informações acima. Sendo que o resultado desta prática está explícito na Figura 19.

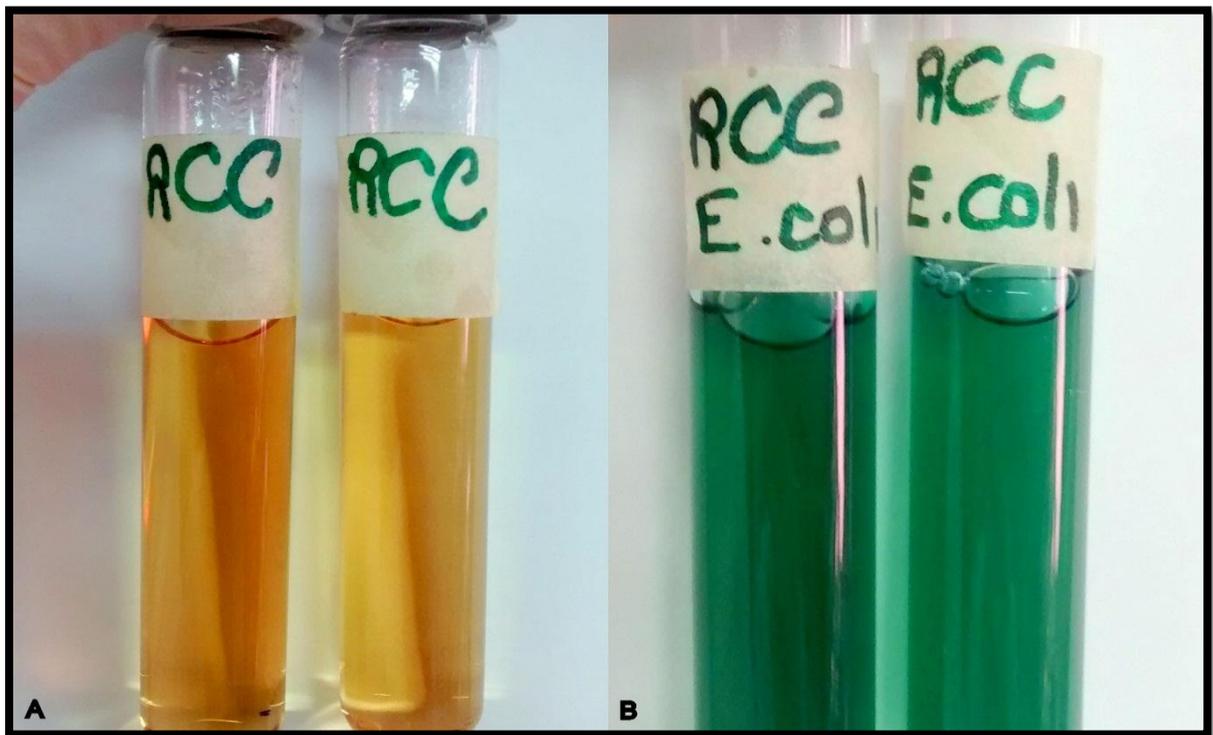


Figura 19 – Resultado do ReadyCult Coliforms.

A: Controle; B: *E. coli* ATCC 25922.

Outro caldo utilizado, porém para análise de *E. faecalis*, foi o Enterolert. Este meio, segundo a IDEXX, usa uma tecnologia de substrato definido (Defined Substrate Technology – DST), um indicador nutriente para detectar enterococos. Sendo que este

fluoresce quando metabolizado por tal gênero de bactérias. O resultado disto, realizado no estudo, pode ser observado na Figura 20.

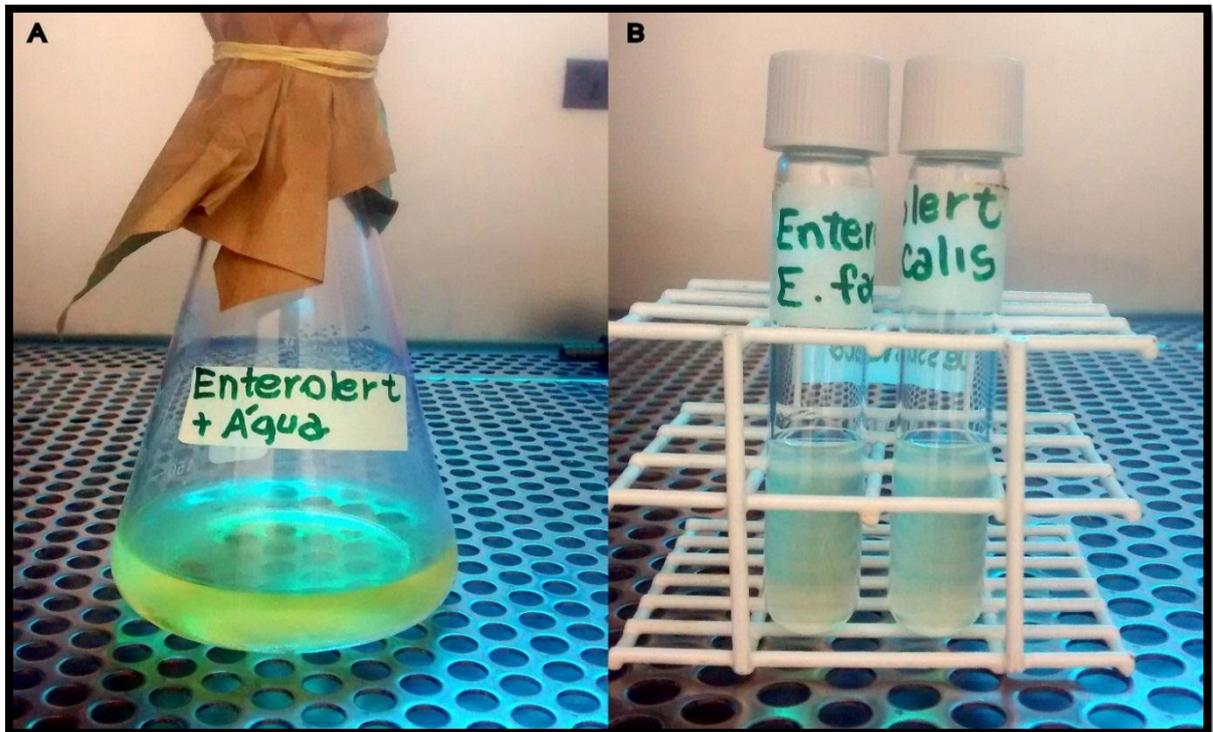


Figura 20 – Resultado do Enterolert.

A: Controle; B: *E. faecalis* ATCC 29212.

6.2 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

Para a realização da quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos hidroalcoólicos de bagaço da uva bordô e do chá preto fez-se a curva padrão de ácido gálico, obtendo-se o Gráfico 1.

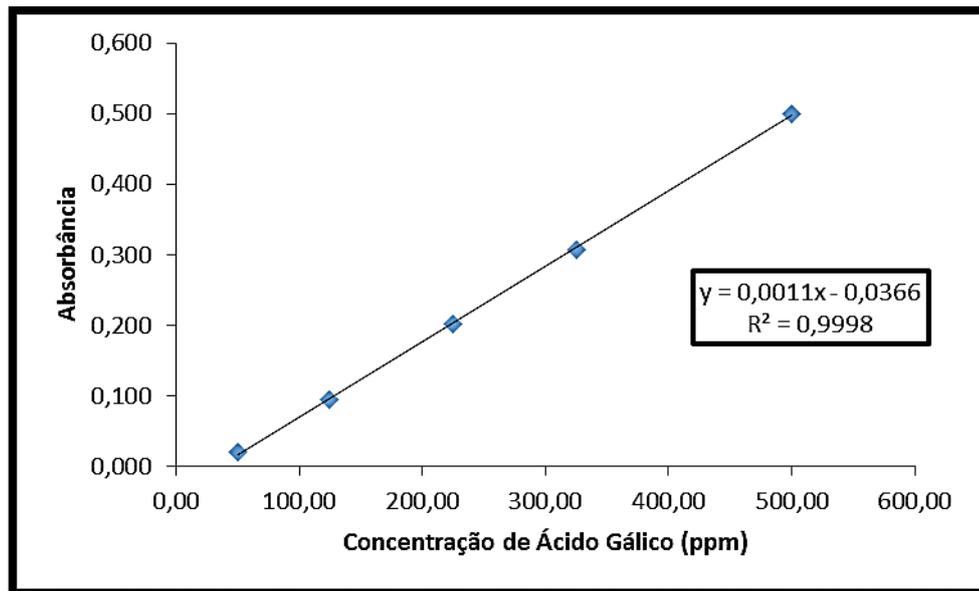


Gráfico 1 – Curva padrão de ácido gálico (n=3).

Com o ajuste linear dos dados de absorbância e concentração de ácido gálico obteve-se a equação da reta $y = 0,0011x - 0,0366$ e um valor de R^2 igual a 0,9998, o que indicou que a equação obtida poderia ser utilizada para a quantificação de fenólicos nas amostras dos extratos hidroalcoólicos.

Os resultados obtidos nas análises dos extratos de bagaço de uva e chá preto foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra seca. A quantidade de fenólicos totais no extrato hidroalcoólico de chá preto foi de 100 mg GAE/g e no extrato de bagaço da uva bordô foi de 36 mg GAE/g.

Na Tabela 4, é possível comparar os valores obtidos com dados da literatura, relacionados à quantidade de compostos fenólicos totais encontrados em amostras de chá preto e bagaço de uva. Pode-se ver que maiores valores destes compostos são encontrados em amostras de chá preto.

Deve se levar em consideração que o chá e a uva (bagaço) em questão possuem diferentes compostos fenólicos em sua composição, e que devido à isto, podem divergir na quantidade existente dos mesmos. Neste primeiro, por exemplo, sabe-se que há uma concentração grande de flavonoides, principalmente, relacionados às catequinas. Na produção do chá preto, estas são oxidadas enzimaticamente, resultando numa mistura complexa de polifenóis, composta por teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas (LIMA *et al.*, 2009).

Tabela 4 – Compostos fenólicos totais (mg de GAE/g) em amostras de chá preto e bagaço de uva.

Composto	Método	EAG/g	Fonte
Chá Preto	Extração com etanol 90%	89,86	OH <i>et al.</i> (2013)
	Infusão em água a 100 °C	144,3	RAMALHO <i>et al.</i> (2013)
Bagaço de Uva Bordô	Extração com metanol acidificado	63,31	ROCKENBACH (2008)
	Extração com etanol 70%	77,30	CZAMANSKI (2013)

Na uva, por outro lado, os flavonoides mais encontrados são os flavonóis, catequinas (flavan-3-ols) e antocianinas, sobretudo em uvas tintas. Os bagaços retêm os compostos polifenólicos depois da fabricação de sucos e vinhos, num volume de 60 – 70% de fenólicos nas sementes e de 20 – 30% nas cascas (SOUZA, 2013).

A variação obtida na composição fenólica intraespecífica e interespecíficas pode se dar por diversas formas, por distintas condições de extração, concentração e solvente empregado, tempo e temperatura. No caso da uva, pelo tipo e pelas condições de cultivo. Na questão do chá, pelas condições de produção utilizadas pela indústria, desigualdades na composição do vegetal (proporções de folhas), diferenças nas condições climáticas e ambientais, de condições fisiopatológicas da planta e de plantio (GHENOV, 2014).

6.3 Difusão em Ágar com Perfuração de Poços

Os resultados dos testes de difusão em ágar com perfuração de poços podem ser observados na tabela 5, onde estão relacionadas as concentrações dos antimicrobianos avaliados e a zona de inibição correspondente para cada bactéria.

Tabela 5 – Resultados da atividade antibacteriana dos controles e extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô e chá preto: média ± DP (n=3).

Controles	Zona de inibição (mm)*;				
	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27853	S. pyogenes ATCC 19615	E. faecalis ATCC 29212
Etanol 40%	—	—	—	—	—
Cefalexina 50%	19,33 ± 1,15 ^{ab**}	• ^a	— ^f	— ^e	— ^f
Cefalexina 25%	15 ± 0 ^e	37,17 ± 2,52 ^c	— ^f	— ^e	— ^f
Amoxicilina 50%	18,5 ± 0,87 ^b	43,6 ± 1,21 ^b	— ^f	31,25 ± 0,25 ^b	32 ± 1 ^{ab}
Amoxicilina 25%	17,17 ± 1,04 ^{cd}	42,27 ± 0,40 ^b	— ^f	30,75 ± 0,25 ^b	30,33 ± 1,61 ^c
Extratos	Zona de inibição (mm)*;				
	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	P. aeruginosa ATCC 27853	S. pyogenes ATCC 19615	E. faecalis ATCC 29212
Uva 100%	—	11,83 ± 1,15	13,92 ± 0,52	—	—
Uva 75%	—	10,33 ± 2,08	15,83 ± 2,32	—	—
Uva 50%	—	12,17 ± 1,04	18,83 ± 1,01	—	—
Uva 25%	—	•	—	—	—
Uva 50% + Cefalexina 50%	18,5 ± 0,87 ^b	33,83 ± 1,26 ^d	— ^f	— ^e	— ^f
Uva 75% + Cefalexina 25%	15,17 ± 0,29 ^e	29,17 ± 1,04 ^e	— ^f	— ^e	11,17 ± 1,04 ^e
Uva 50% + Amoxicilina 50%	19,67 ± 0,29 ^a	• ^a	17,5 ± 0,87 ^d	32,17 ± 0,76 ^a	33,17 ± 1,04 ^a
Uva 75% + Amoxicilina 25%	16,33 ± 0,29 ^{cd}	• ^a	19,92 ± 0,14 ^c	29,42 ± 0,14 ^d	31,67 ± 0,58 ^{bc}
Chá 100%	—	13 ± 0,5	19,08 ± 1,28	—	—
Chá 75%	—	12 ± 0	14,5 ± 1,5	—	—
Chá 50%	—	—	21,33 ± 3,09	—	—
Chá 25%	—	—	17,5 ± 1,30	—	—
Chá 50% + Cefalexina 50%	19,33 ± 0,58 ^{ab}	30,83 ± 0,29 ^e	42,08 ± 2,04 ^b	— ^e	— ^f
Chá 75% + Cefalexina 25%	15 ± 0 ^e	25,5 ± 0,44 ^f	19,58 ± 0,38 ^c	— ^e	— ^f
Chá 50% + Amoxicilina 50%	19,83 ± 0,29 ^a	43,18 ± 1,83 ^b	12,22 ± 1,09 ^e	30,17 ± 0,29 ^c	32,05 ± 0,5 ^{ab}
Chá 75% + Amoxicilina 25%	15,17 ± 0,29 ^{de}	41,93 ± 0,80 ^b	• ^a	29,33 ± 0,58 ^d	27,83 ± 1,53 ^d

*O diâmetro da zona de inibição inclui o do poço (8 mm). — Sem inibição; • Total inibição.

** Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística entre os resultados (p < 0,05).

Observa-se que o etanol 40% foi um bom agente de controle negativo, pois permitiu o crescimento de todas as bactérias estudadas, o que pode ser observado nas Figuras 21-25. Agora, com relação aos controles positivos, nem todos propiciaram

um bom efeito sob o desenvolvimento bacteriano. No caso da *P. aeruginosa*, por exemplo, nenhum dos antibióticos, nas concentrações avaliadas (de 30 e 15 µg), conseguiu impedir sua propagação. A Figura 21 exhibe esta alta resistência da bactéria.

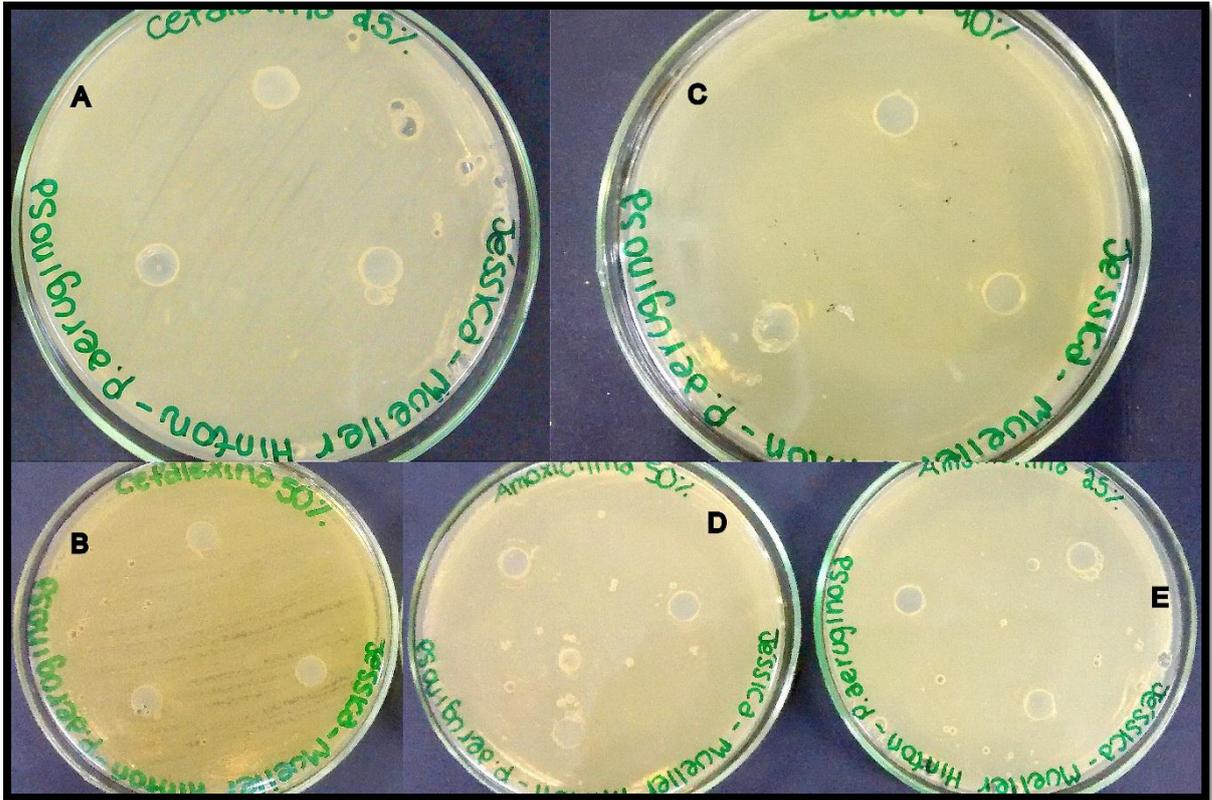


Figura 21 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos sob *Pseudomonas aeruginosa*. A: Cefalexina 25%; B: Cefalexina 50%; C: Etanol 40%; D: Amoxicilina 50%; E: Amoxicilina 25%.

Analisando-se a tabela 5, percebe-se também que a cefalexina não inibiu o crescimento *in vitro* do *Streptococcus pyogenes* e do *Enterococcus faecalis*. Contudo, estes microrganismos se mostraram sensíveis à ação de amoxicilina. Estes dados podem ser verificados nas Figuras 22 (*S. pyogenes*) e 23 (*E. faecalis*).

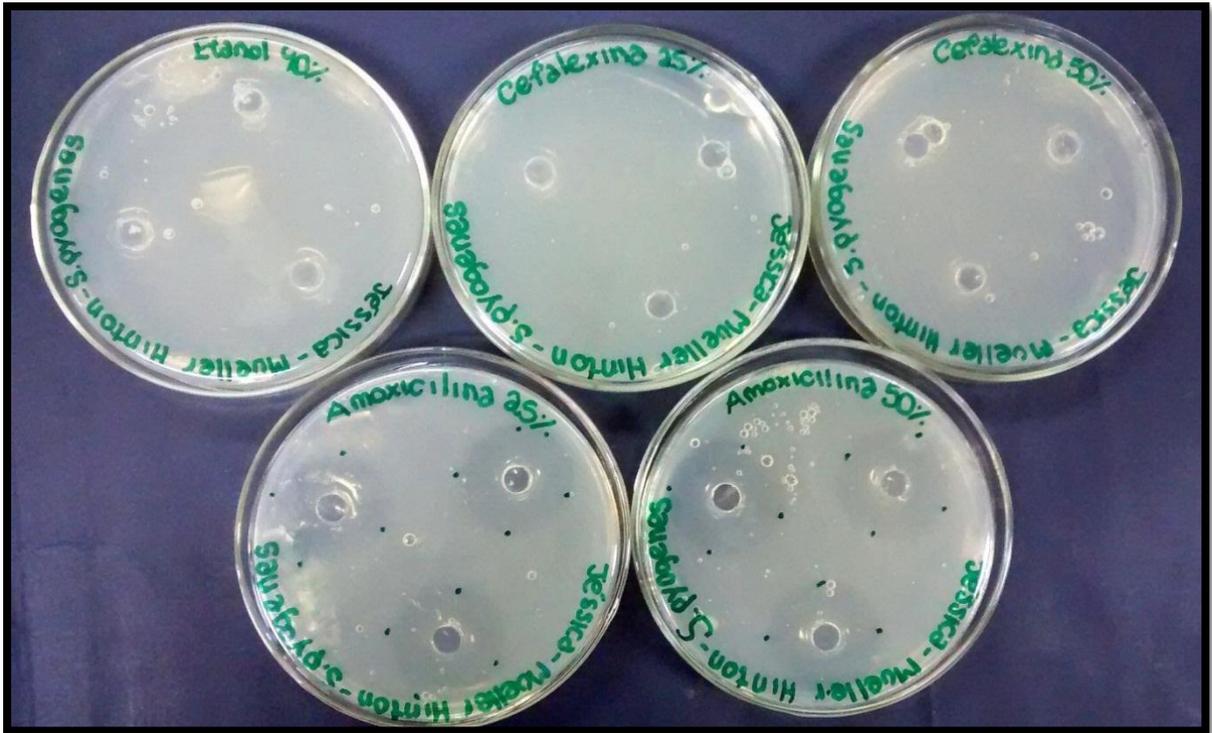


Figura 22 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob *Streptococcus pyogenes*.

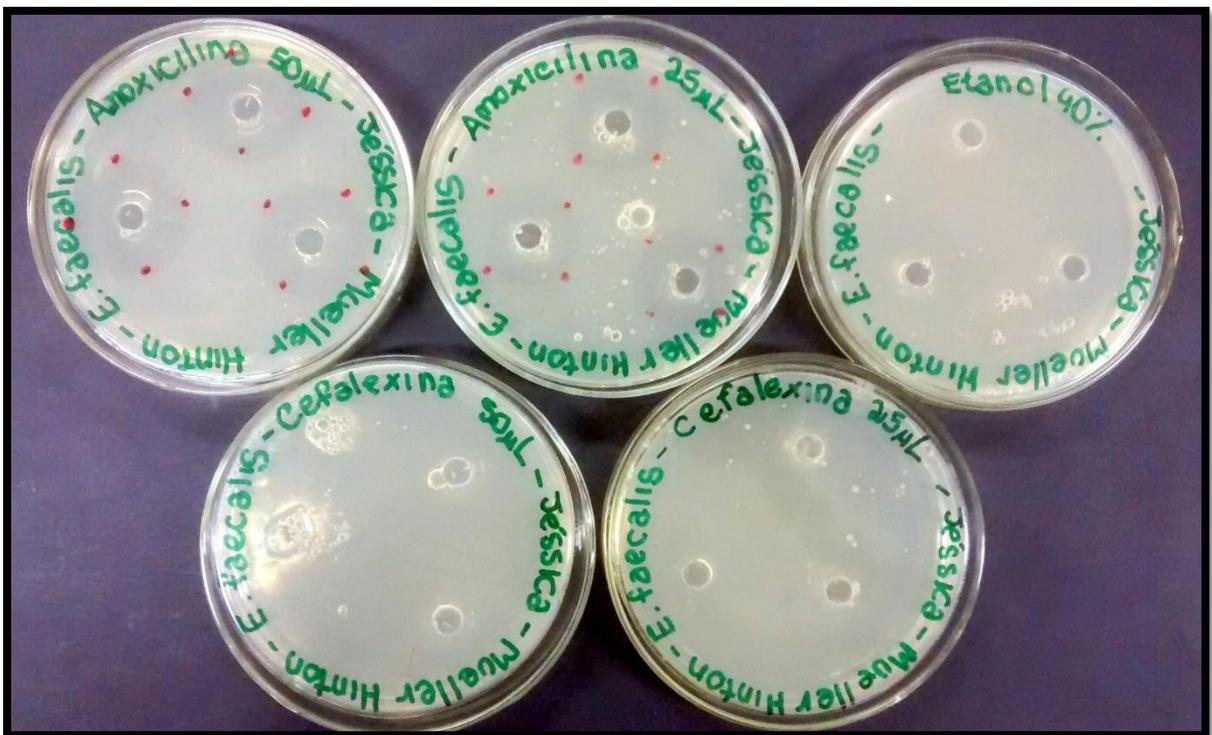


Figura 23 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob *Enterococcus faecalis*.

Nota: 50 µL = 50% e 25 µL = 25%.

Com relação às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foi verificado que os dois antibióticos inibiram o crescimento. Com uma inibição maior na segunda bactéria mencionada, que manifesta ser bastante sensível aos fármacos utilizados. As Figuras 24 (para *E. coli*) e 25 (para *S. aureus*) mostram os halos de inibição ocasionados pelo etanol 40%, pela cefalexina e amoxicilina.

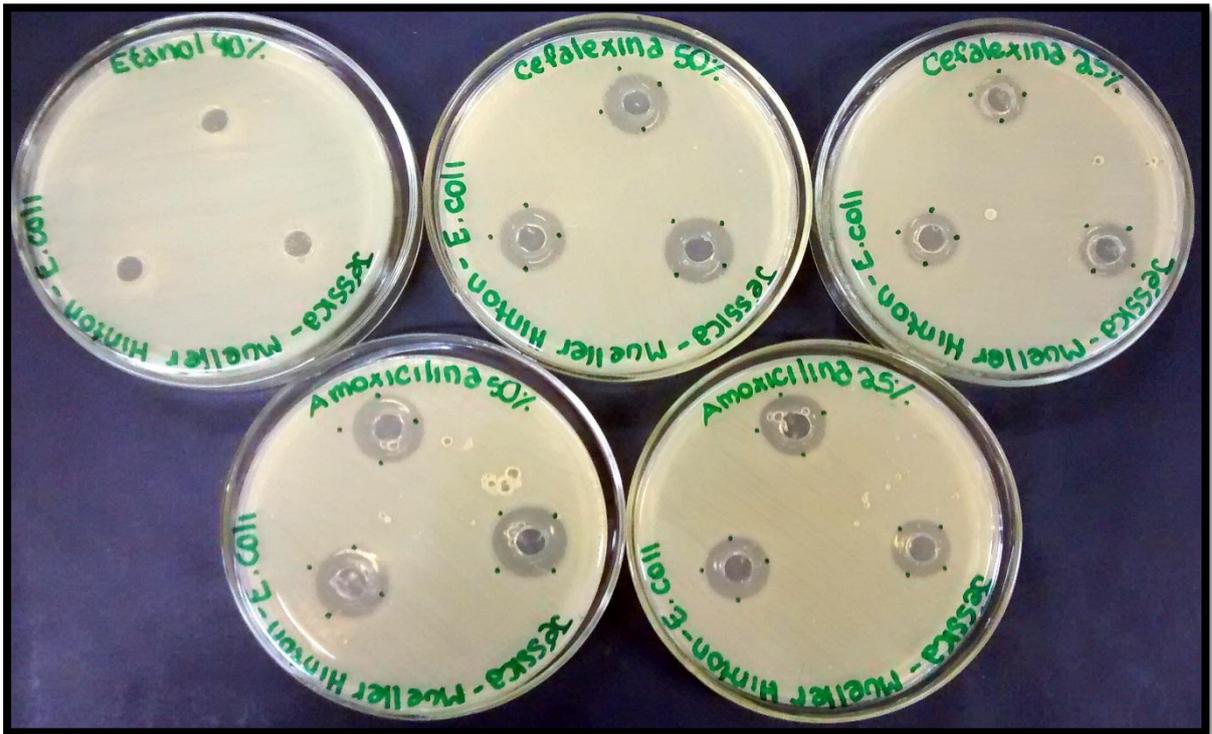


Figura 24 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob *Escherichia coli*.

Os resultados obtidos relacionados aos controles positivos estão de acordo com os dados mencionados na bula da cefalexina, produzida pela MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA (2014), e na da amoxicilina, fabricada pela EMS S/A (2015).

Na bula da cefalexina consta as informações dos microrganismos dos quais ele não impede o crescimento, dentre eles, todas as espécies de *Pseudomonas*; além disso, é apontado que a maioria das cepas de enterococos são resistentes à cefalexina. Ademais, na bula deste medicamento é possível saber em que diâmetro do halo de inibição, os microrganismos são sensíveis ou não à ele. Quando o comprimento for ≥ 18 mm, o organismo é suscetível ao antibiótico; quando estiver

entre 15 e 17 mm, é intermediário, e quando estiver ≤ 14 mm, o microrganismo é resistente. Portanto, das bactérias estudadas, a que apresentou sensibilidade à cefalexina foi o *S. aureus* e a *E. coli*, sendo que esta só para a concentração de 30 μ g.

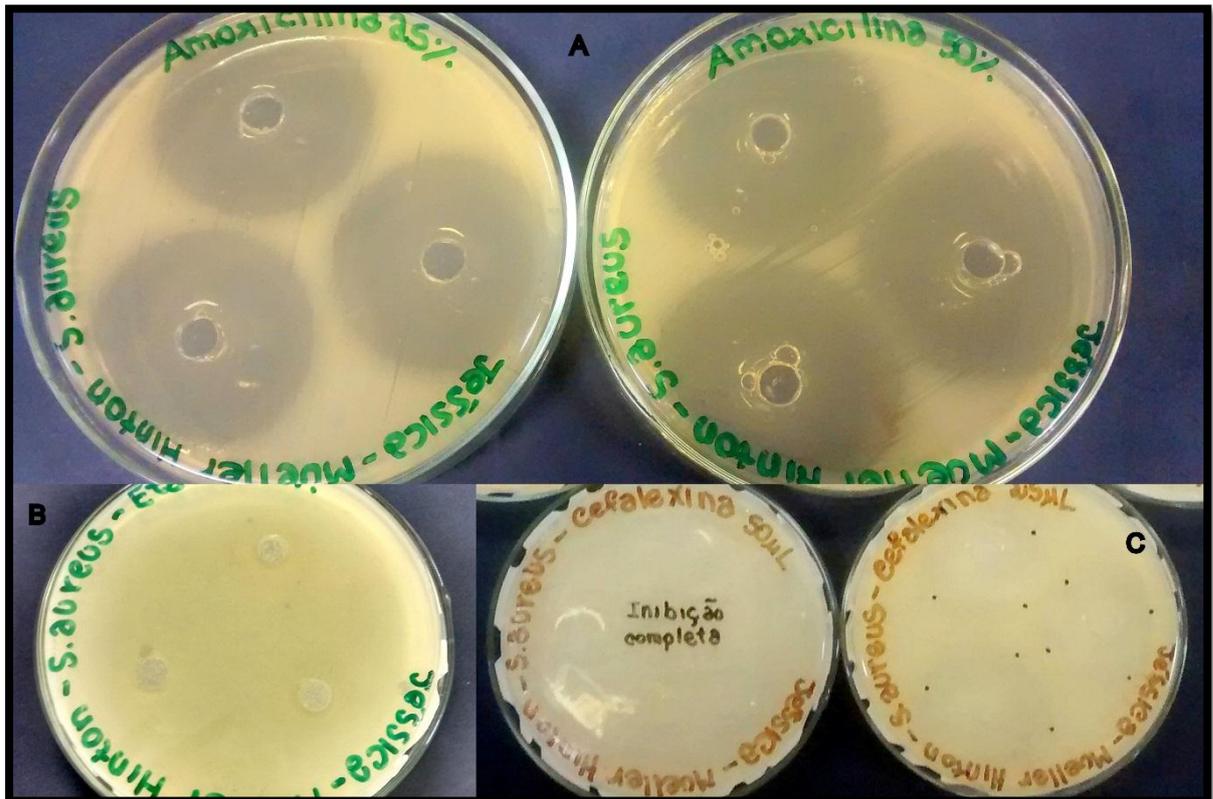


Figura 25 – Halos de inibição dos controles negativos e positivos, sob *Staphylococcus aureus*. A: Amoxicilina 25% (esquerda) e amoxicilina 50% (direita); B: etanol 40%; C: Cefalexina 50% (esquerda) e cefalexina 25% (direita).

A bula da amoxicilina confirma os resultados obtidos no teste, pois o antibiótico é indicado para o tratamento de todas as infecções causadas pelas bactérias utilizadas neste estudo, com exceção da cepa de *Pseudomonas*. Isto devido ao fato desta produzir betalactamases, degradando, assim, o fármaco (EMS S/A, 2015). Com relação à interpretação dos halos de inibição provocados pela amoxicilina, segundo a *National Commitee for Clinical Laboratory Standart* (NCCLS, 2006), enterobactérias são resistentes ao medicamento se a zona de inibição delas for ≤ 13 mm e são sensíveis se o diâmetro do halo for ≥ 17 mm. Já para *Staphylococcus sp.*

se o comprimento é ≤ 28 mm, o microrganismo é resistente, se ≥ 29 mm, tende a ser sensível. Com isso, todas as bactérias analisadas, salvo *P. aeruginosa*, apresentam sensibilidade à amoxicilina.

6.3.1 Extratos Hidroalcoólicos do Bagaço de Uva Bordô

A respeito da avaliação antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva (Tabela 5), observou-se que os extratos diluídos e o bruto não inibiram o crescimento das seguintes bactérias: *E. coli* (Figura 26), *S. pyogenes* (Figura 27) e *E. faecalis* (Figura 28).

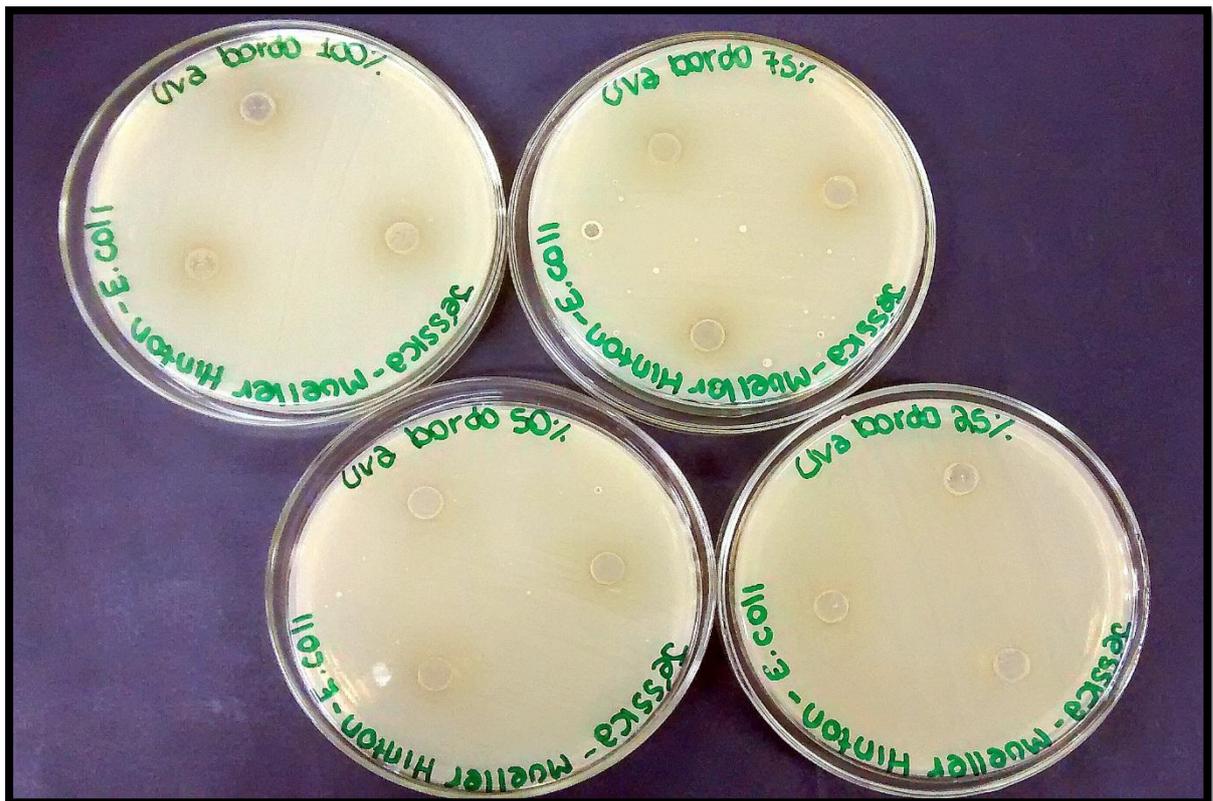


Figura 26 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob *Escherichia coli*.

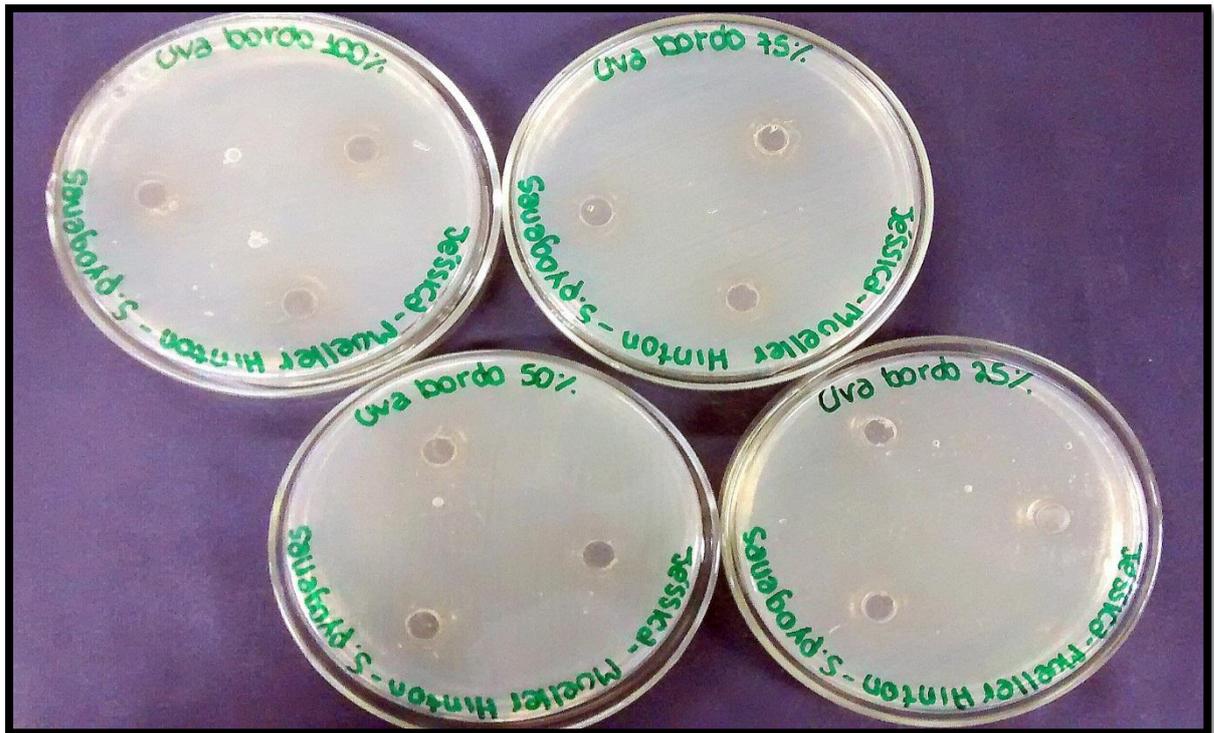


Figura 27 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob *Streptococcus pyogenes*.

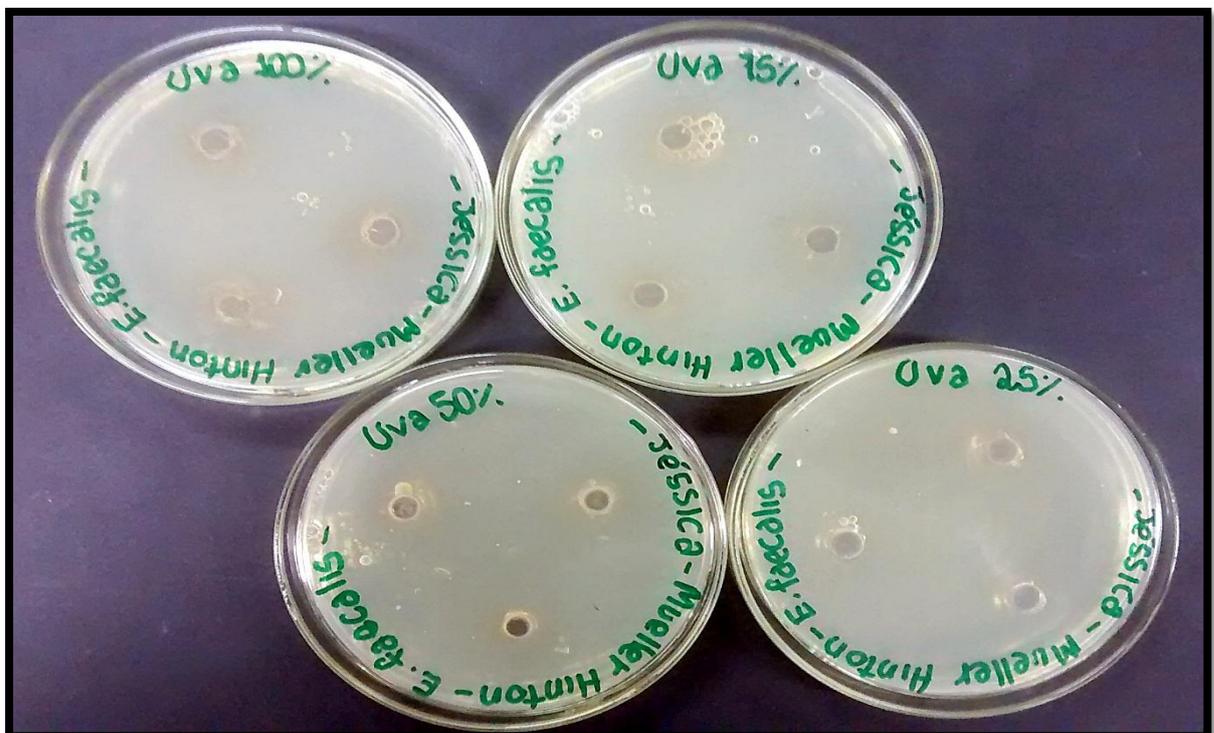


Figura 28 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob *Enterococcus faecalis*.

O que também se observa na tabela 5 é que, para estas três bactérias, os extratos do bagaço de uva em combinação com os antibióticos, não causaram uma diferença significativa nos valores, quando comparados aos halos de inibição dos medicamentos isolados. Isto com exceção da mistura de uva + amoxicilina 50%, para *E. coli*; de uva com amoxicilina, para *S. pyogenes*; e de uva + cefalexina 25%, para *E. faecalis*. Porém, mesmo para estes casos, a diferença de valores não foi tão grande. Ou seja, em sua grande maioria, somente houve inibição na propagação bacteriana por causa do efeito provocado pelo fármaco. Isto pode ser vislumbrado pela Figura 29 (*E. coli*), Figura 30 (*S. pyogenes*) e Figura 31 (*E. faecalis*).

Os valores maiores encontrados na combinação de extrato de uva e amoxicilina (50/50%), nas duas primeiras bactérias citadas, e do mesmo extrato com cefalexina (75/25%), para a última bactéria, ocorreu devido a um efeito sinérgico entre as duas substâncias.



Figura 29 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob *Escherichia coli*.

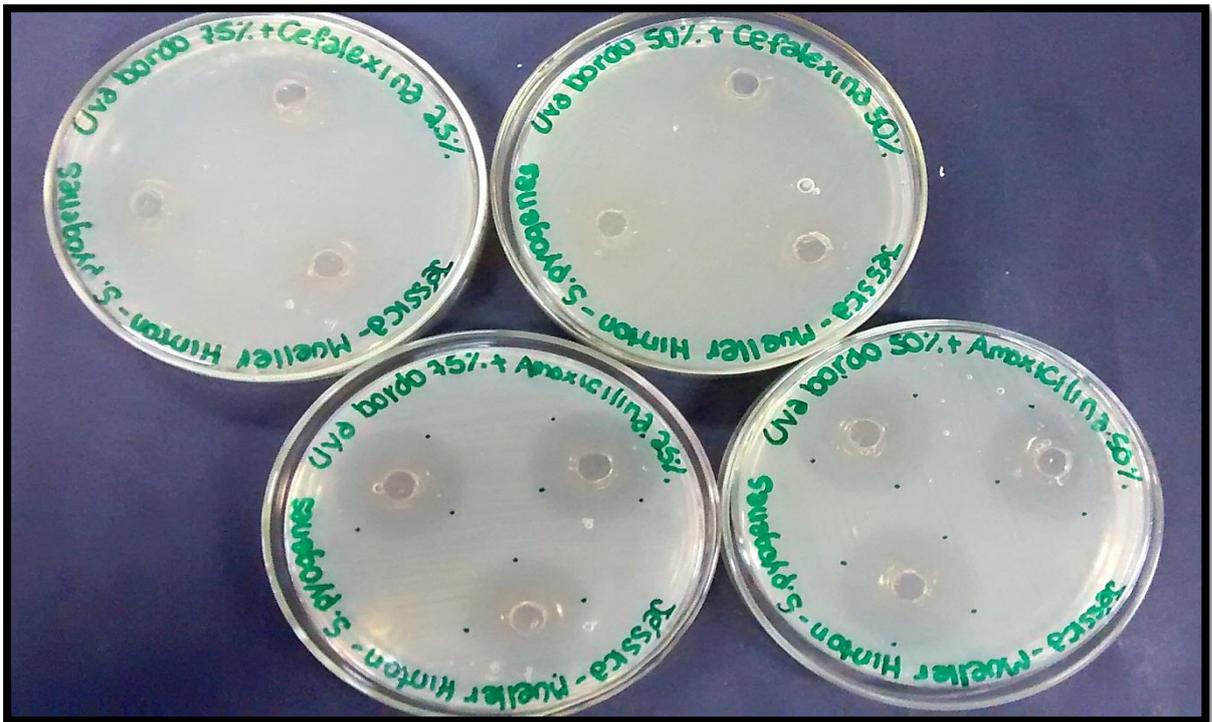


Figura 30 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob *Streptococcus pyogenes*.

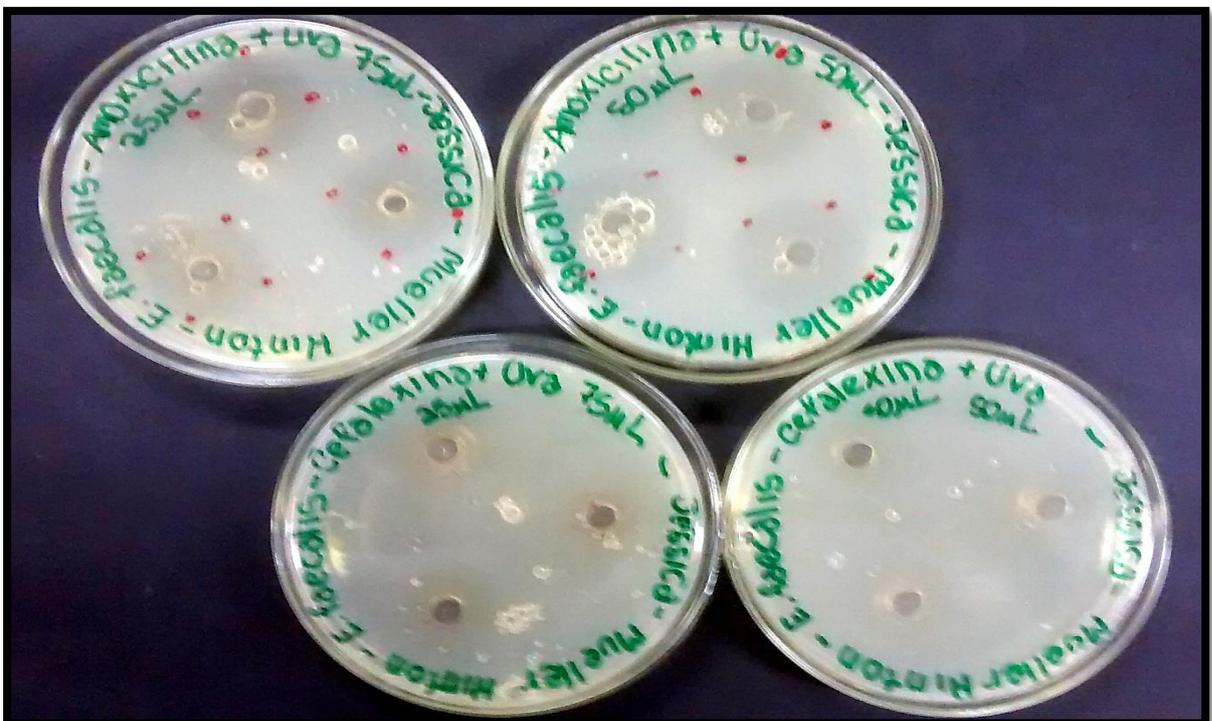


Figura 31 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob *Enterococcus faecalis*.

Nota: 75 μ L = 75%, 50 μ L = 50% e 25 μ L = 25%.

Quanto à *Pseudomonas aeruginosa*, analisando-se a Tabela 5, é visto que os extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva (100, 75 e 50%) tiveram uma boa ação contra o crescimento da bactéria. O que pode ser observado pela Figura 32.

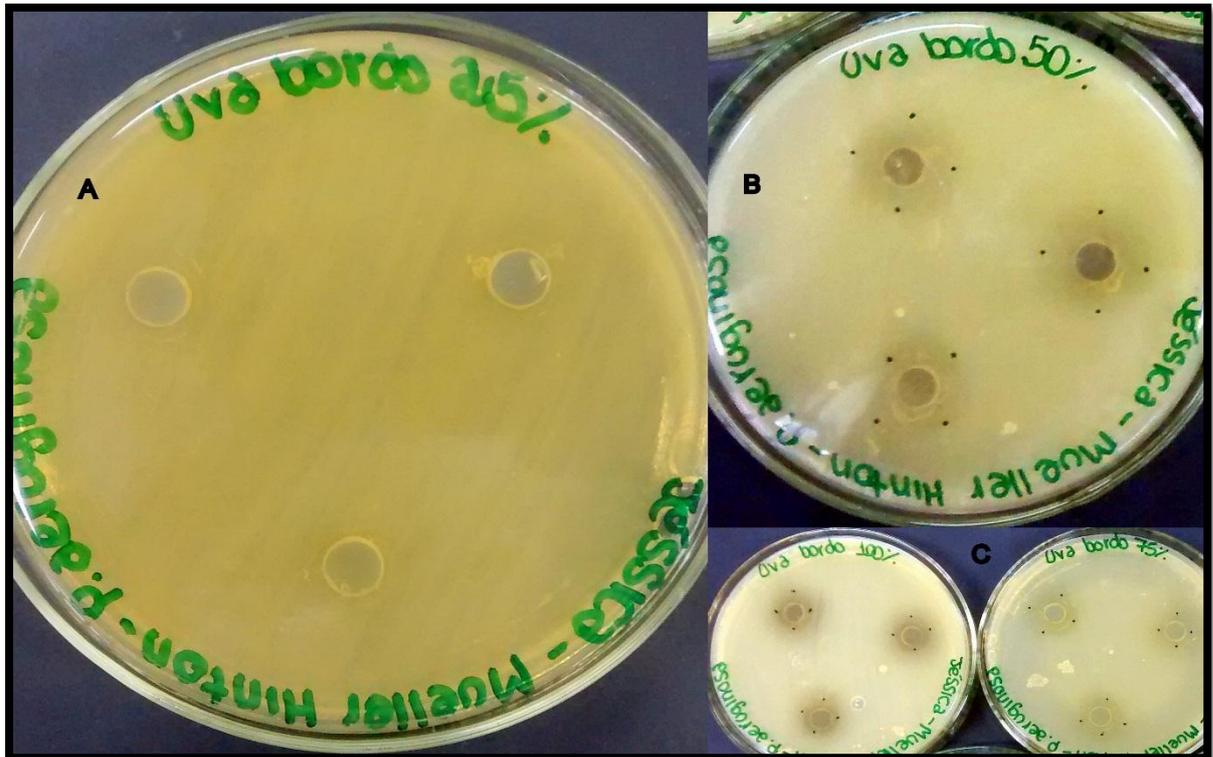


Figura 32 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob *Pseudomonas aeruginosa*.

A: Bagaço de uva bordô 25%; B: Bagaço de uva bordô 50%; C: Bagaço de uva bordô 100% (esquerda) e 75% (direita).

Foi observado também que esses mesmos extratos junto com o antibiótico cefalexina, não causam inibição no crescimento da *Pseudomonas*. Entretanto, a combinação deles com as concentrações testadas de amoxicilina (75/25% e 50/50%) gerou um efeito positivo contra o desenvolvimento microbiano, fato não encontrado na utilização deste último fármaco sozinho. O resultado dessas interações pode ser visto na Figura 33.

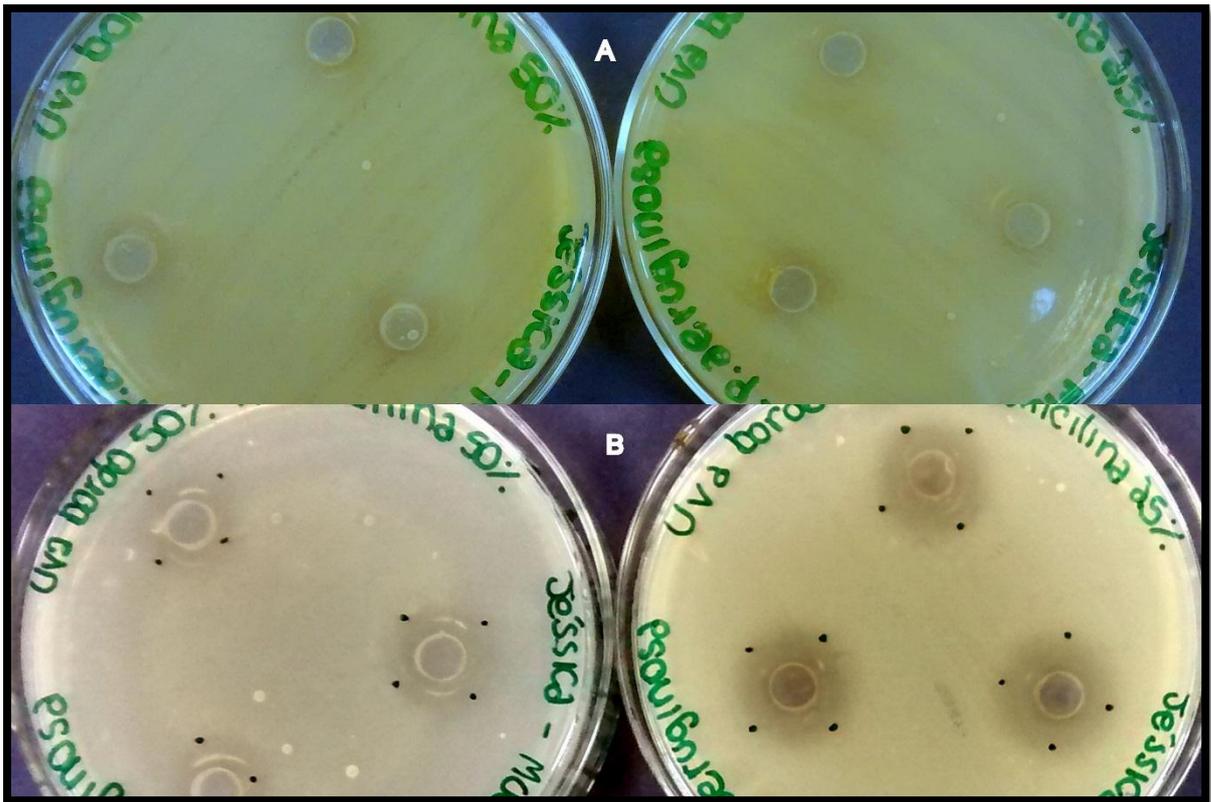


Figura 33 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob *Pseudomonas aeruginosa*.

A: Bagaço de uva bordô + cefalexina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita); B: Bagaço de uva bordô + amoxicilina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita).

No *Staphylococcus aureus*, os extratos do bagaço de uva, bruto e diluídos, tiveram ação antibacteriana menor do que a existente na *P. aeruginosa*, exceto na concentração correspondente à 25%, onde houve inibição total do primeiro microrganismo (Figura 34).

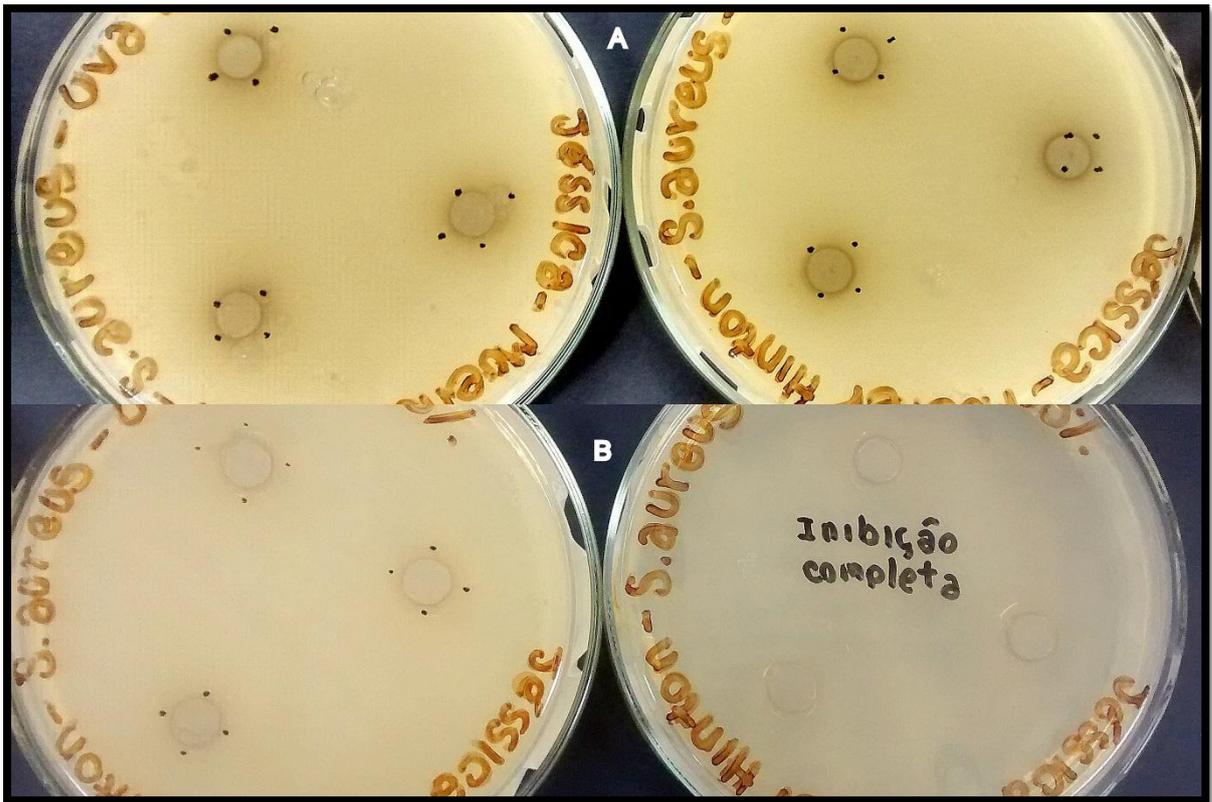


Figura 34 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô, sob *Staphylococcus aureus*.

A: Bagaço de uva bordô, 100% (esquerda) e 75% (direita); B: Bagaço de uva bordô, 50% (esquerda) e 25% (direita).

Acerca da combinação extrato + amoxicilina, pelos valores dos halos de inibição obtidos, encontrados na Tabela 5, é possível ver que houve um maior potencial antibacteriano destes compostos misturados, sobre o *S. aureus*, do que quando isolados, inibindo 100% da propagação bacteriana. E se tratando da cefalexina em conjunto com o extrato, a inibição não foi mais elevada quando em comparação com o antibiótico, porém, ainda assim houve bloqueio no crescimento (Figura 35).

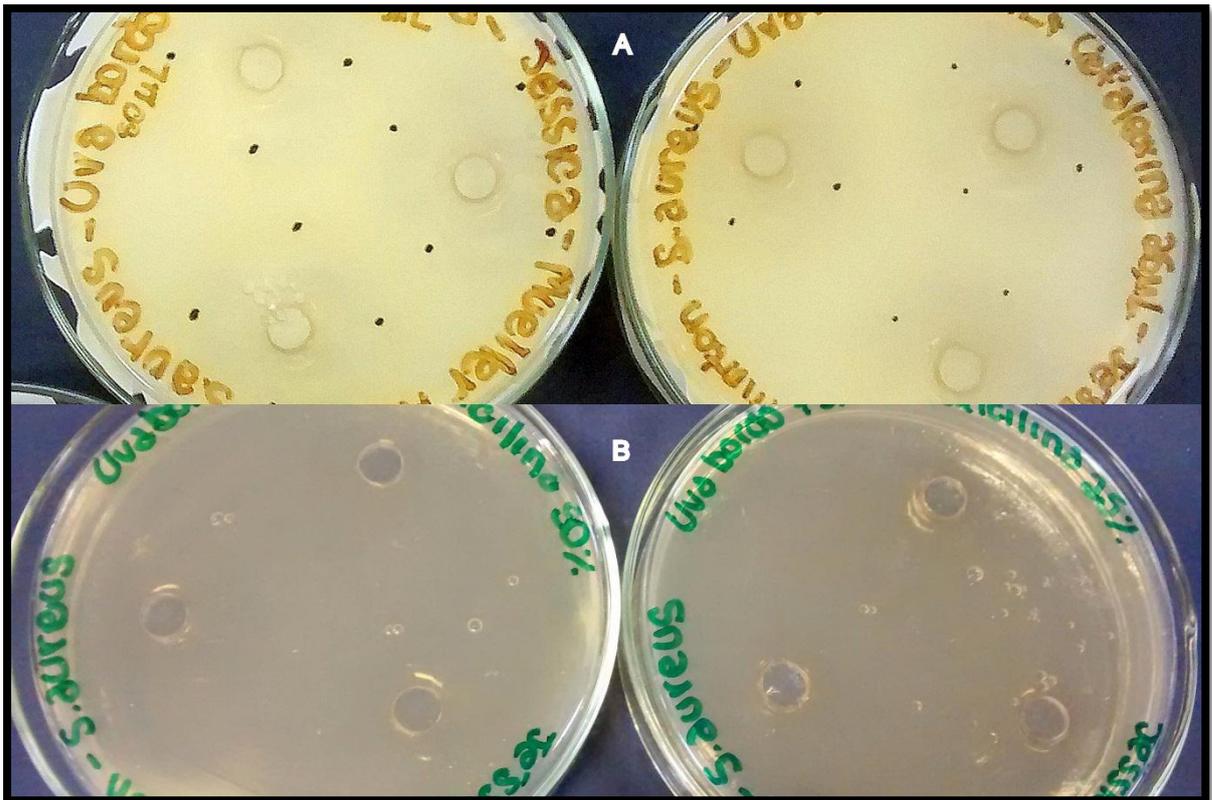


Figura 35 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô em combinação com os antibióticos, sob *Staphylococcus aureus*.

A: Bagaço de uva bordô + cefalexina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita); B: Bagaço de uva bordô + amoxicilina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita).

6.3.2 Extratos Hidroalcoólicos do Chá Preto

Em referência ao potencial antibacteriano dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, com base na Tabela 5, verifica-se que, da mesma forma que os extratos do bagaço de uva, eles não conseguiram impedir o progresso bacteriano das espécies: *Escherichia coli* (Figura 36), *Staphylococcus aureus* (Figura 37) e *Enterococcus faecalis* (Figura 38). Mostrando, assim, que as cepas estudadas destes microrganismos são resistentes à ambos extratos isolados.

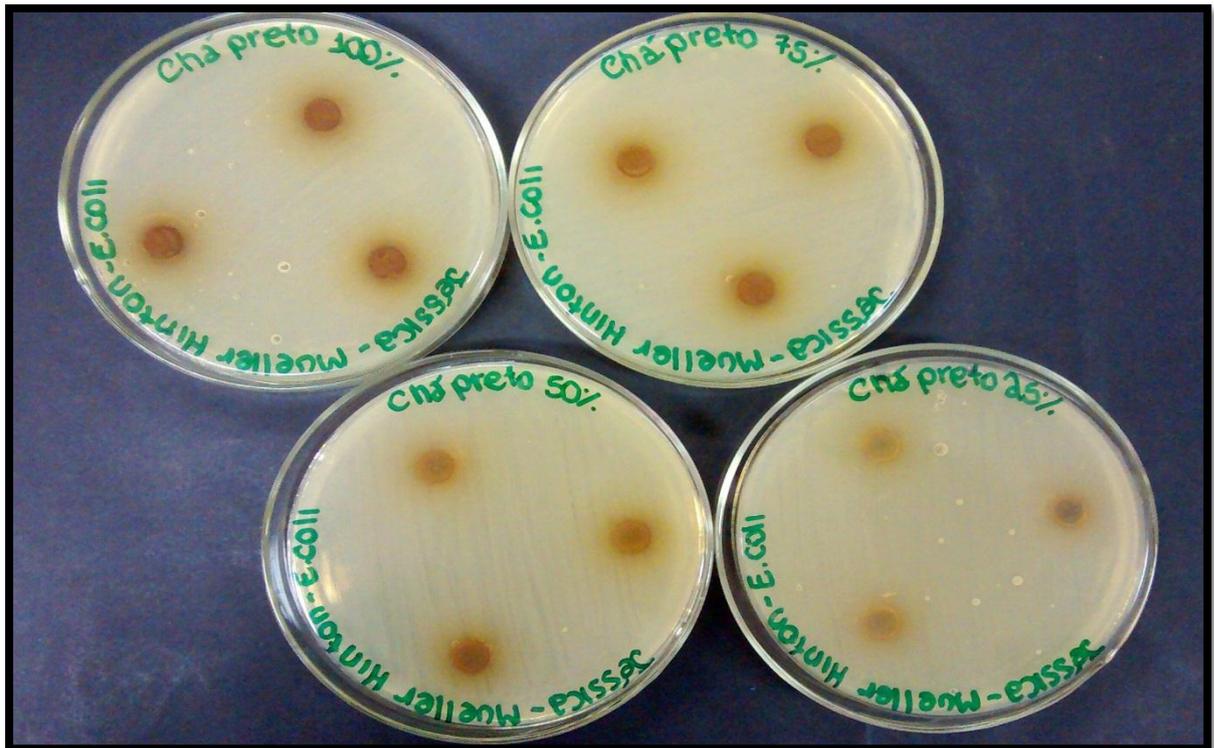


Figura 36 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob *Escherichia coli*.

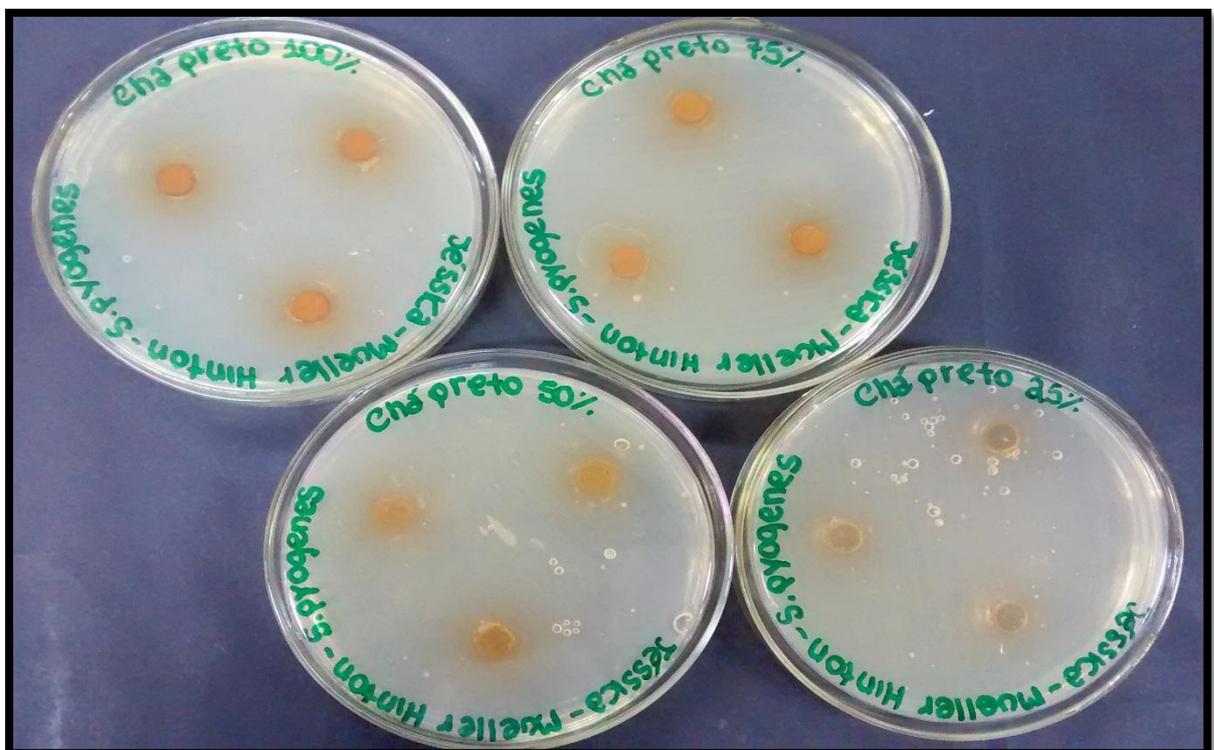


Figura 37 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob *Streptococcus pyogenes*.



Figura 38 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob *Enterococcus faecalis*.

No caso da *E. coli*, se tratando da interação extrato + antibiótico, constata-se que o extrato de chá preto com cefalexina não variou significativamente no valor do diâmetro do halo de inibição, comparado à este medicamento isolado ou a combinação feita com o extrato do bagaço de uva. Isto pode ser olhado pela Figura 39. Já para a amoxicilina houve pouca variação.

Para o *S. pyogenes* e *E. faecalis*, nota-se que a mistura do chá preto com a cefalexina não inibiu o crescimento de ambas bactérias, Figura 40 e 41, respectivamente. Contudo, o misto de extrato com amoxicilina resultou num bom impedimento de expansão das mesmas. Sendo que os valores dos halos não variaram muito, em comparação com o fármaco sozinho ou da mescla deste com o extrato do bagaço de uva, pois ficaram aproximadamente entre 29 e 34 mm.



Figura 39 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob *Escherichia coli*.

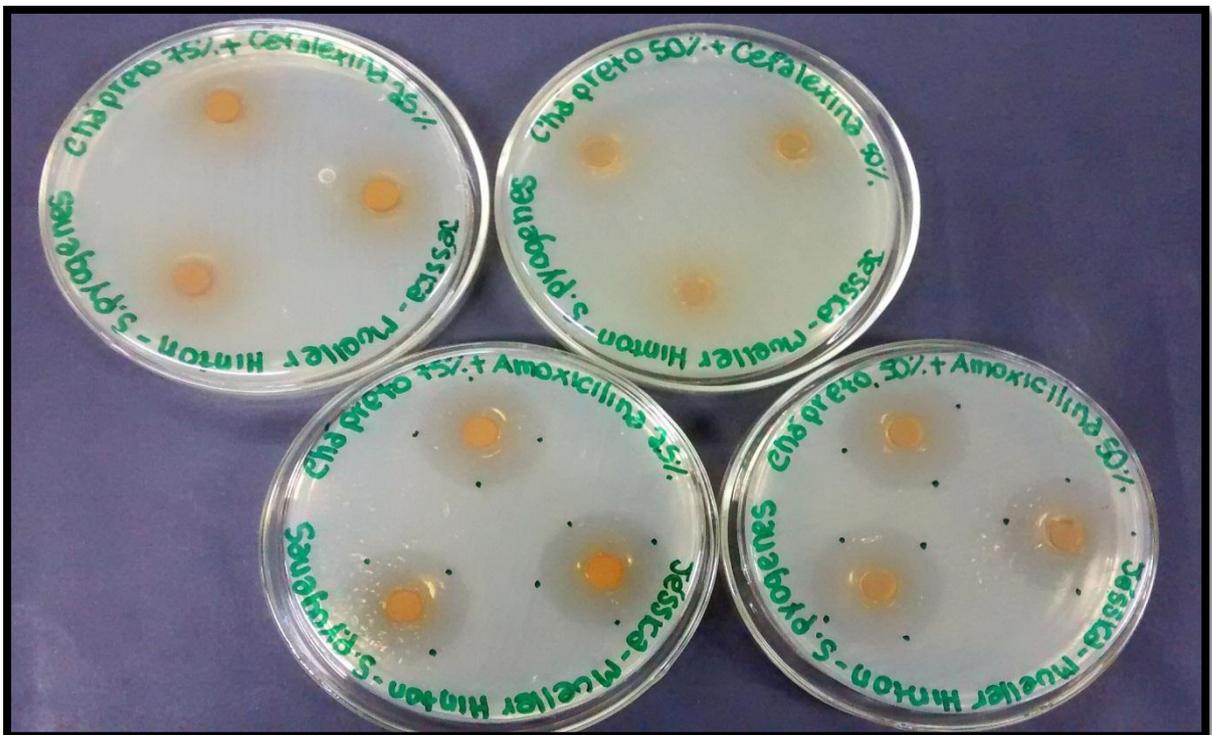


Figura 40 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob *Streptococcus pyogenes*.

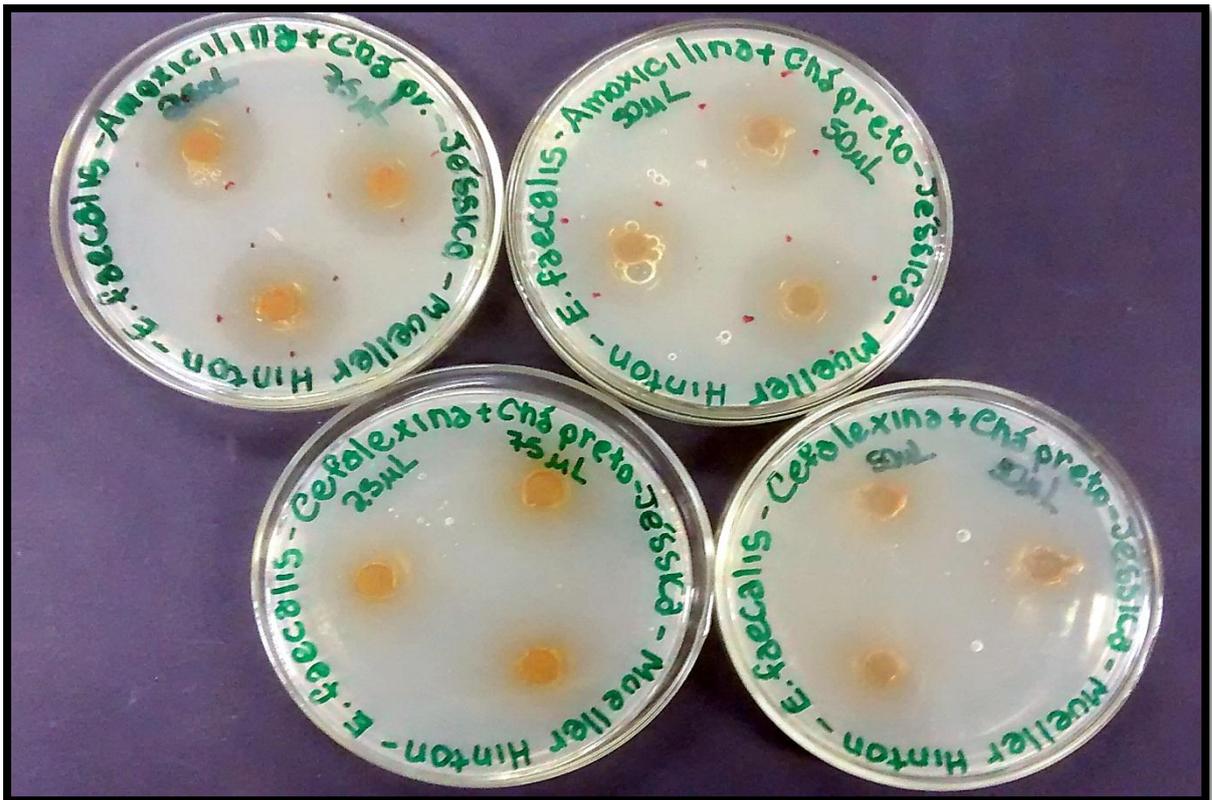


Figura 41 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob *Enterococcus faecalis*.

Nota: 75 µL = 75%, 50 µL = 50% e 25 µL = 25%.

Reparando-se na Tabela 5, colocada na sessão 6.2, e na Figura 42, pode se ver que a *Pseudomonas aeruginosa* mostrou ser sensível aos extratos hidroalcoólicos de chá preto, tendo valores dos diâmetros de inibição entre 14 e 21 mm, aproximadamente. Que à exceção do extrato 75%, foram maiores se comparados aos mesmos extratos do bagaço de uva.

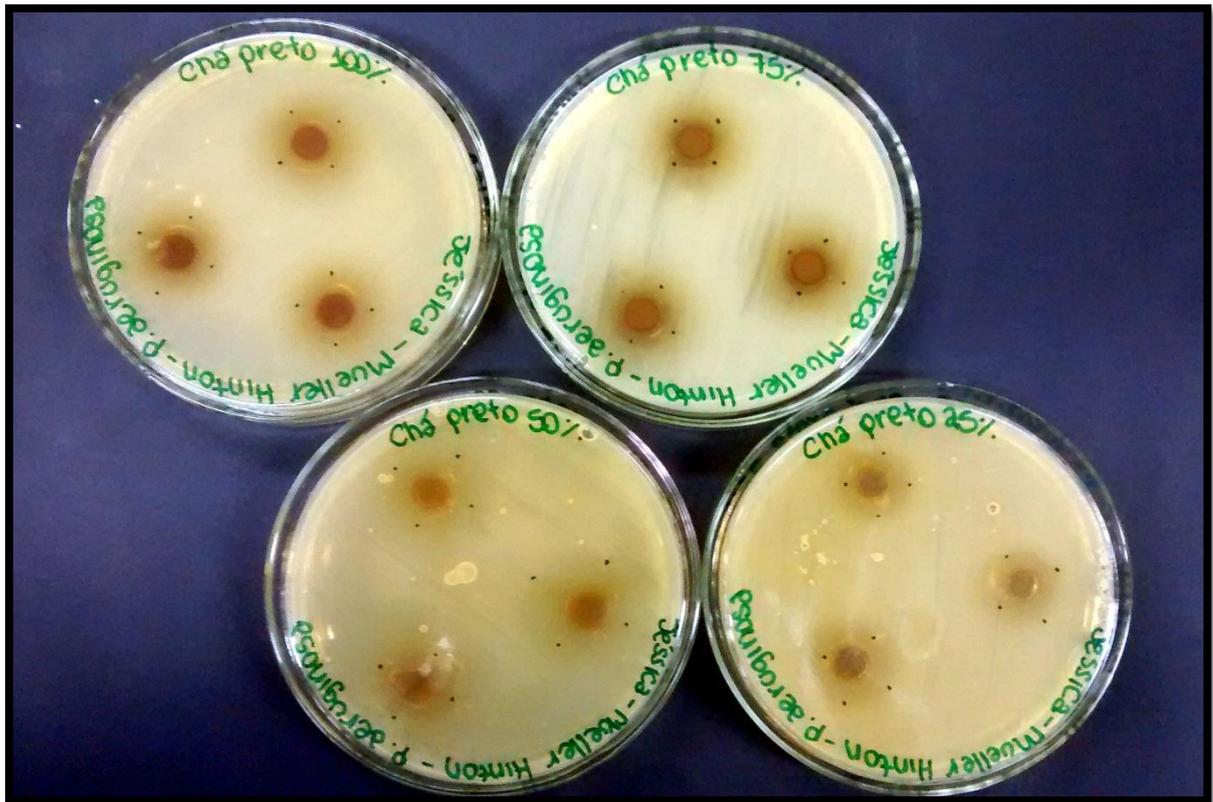


Figura 42 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob *P. aeruginosa*.

Interessante verificar que houve um alto efeito sinérgico entre o extrato de chá preto com os antibióticos, excluindo-se a mistura deste com a amoxicilina, na proporção de 50/50%, para a *P. aeruginosa*. Ressalta-se que somente o extrato em conjunto com a cefalexina conseguiu impossibilitar o desenvolvimento da bactéria, o que não havia sido constatado para tais compostos isolados. Identifica-se também que o misto do extrato com a amoxicilina inibiu em 100% o crescimento bacteriano. O resultado dos halos de inibição deste microrganismo no que se refere a interação extrato + fármaco está na Figura 43.

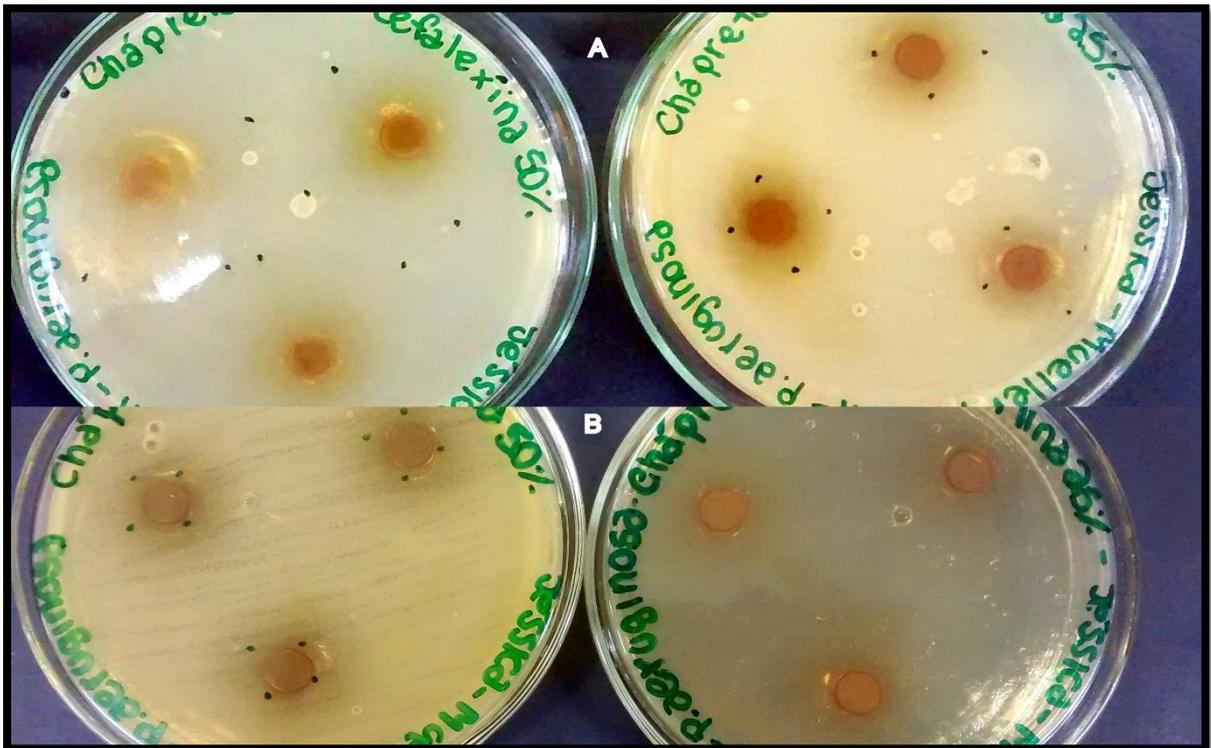


Figura 43 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob *Pseudomonas aeruginosa*.

A: Chá preto + cefalexina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita); B: Chá preto + amoxicilina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita).

No que concerne ao *Staphylococcus aureus*, conferiu-se que somente os extratos hidroalcoólicos do chá preto, na concentração correspondente de 100 e 75%, obtiveram algum efeito antibacteriano nesta bactéria. Isto pode ser visto na Figura 44. Porém, as mesclas feitas com os antibióticos resultaram numa maior inibição (Figura 45). Sendo que, os valores das zonas de inibição alcançados para extrato + amoxicilina, não foram estatisticamente diferentes dos encontrados para o antibiótico isolado. O que significa que tal efeito inibidor pôde ser adquirido apenas pela ação deste.

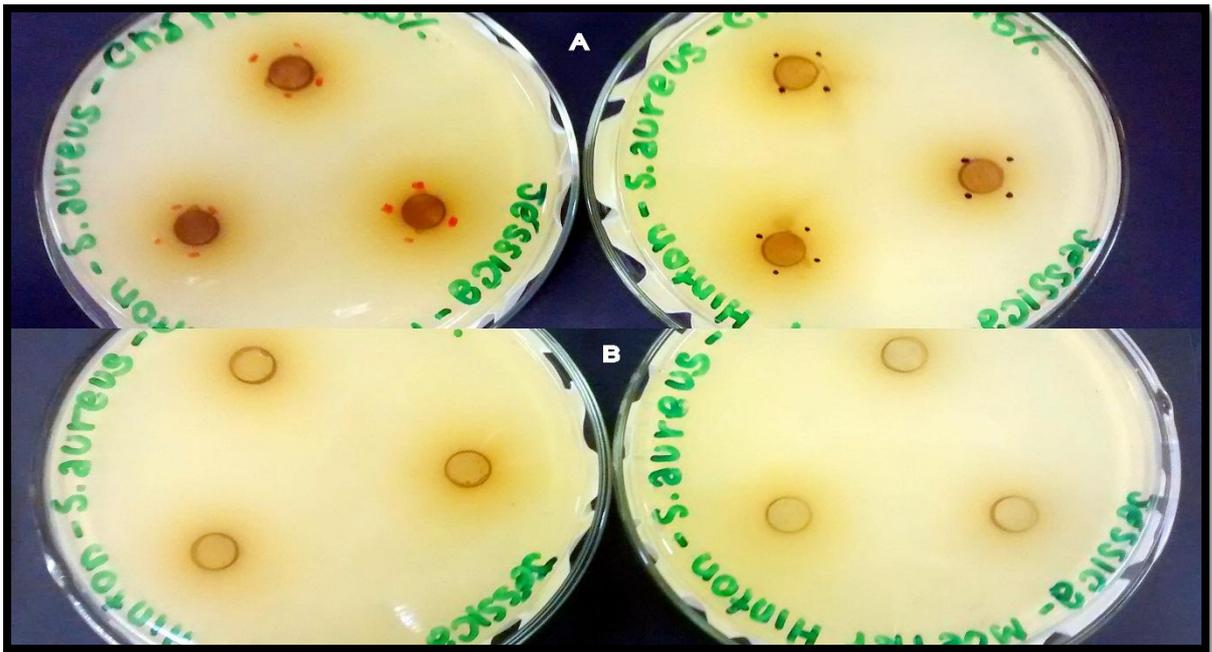


Figura 44 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos do chá preto, sob *Staphylococcus aureus*.

A: Chá preto 100% (esquerda) e 75% (direita); B: Chá preto 50% (esquerda) e 25% (direita).

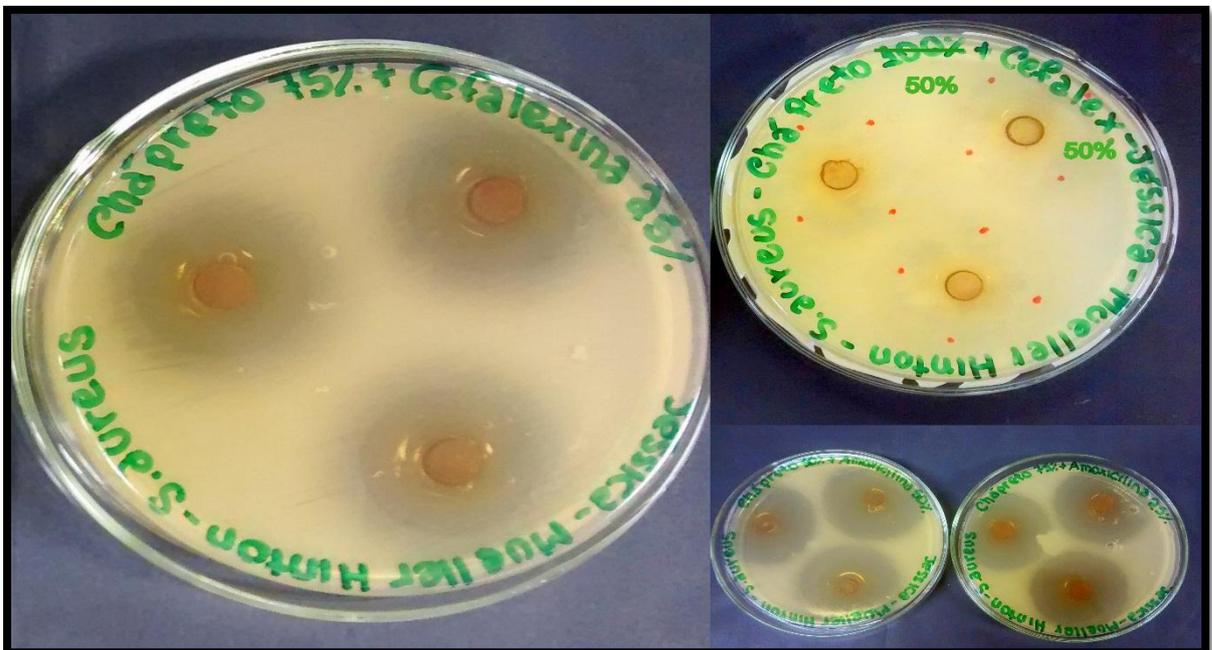


Figura 45 – Halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos de chá preto em combinação com os antibióticos, sob *Staphylococcus aureus*.

A: Chá preto + cefalexina, 75/25%; B: Chá preto + cefalexina, 50/50%; C: Chá preto + amoxicilina, 50/50% (esquerda) e 75/25% (direita).

6.3.3 Discussão

Através da técnica de difusão em ágar com perfuração de poços, observou-se que, em alguns casos, a combinação de extratos hidroalcoólicos e de antibióticos teve uma ação antibacteriana maior quando comparadas às inibições causadas pelas substâncias isoladas. Como no caso da mistura extrato de chá preto + cefalexina frente à *P. aeruginosa*.

Essa interação benéfica que aumentou a eficiência de um composto bioativo pode ser denominada de potenciação. Efeitos sinérgicos e aditivos são subconjuntos desta e são verificados quando ela é experimentalmente caracterizada e quantificada.

Dentre as vantagens da junção de um composto bioativo com antibióticos estão: melhores resultados de absorção, solubilidade, estabilidade e segurança; o que faz a sinergia minimizar possíveis efeitos secundários adversos. Essa nova capacitação pode apresentar um efeito sinérgico ao bloquear um ou mais alvos no processo metabólico (GHENOV, 2014).

No presente trabalho, um resultado que chama atenção é que os valores dos halos de inibição encontrados para o *Staphylococcus aureus*, dos extratos hidroalcoólicos em mescla com amoxicilina, não variaram significativamente, segundo os testes estatísticos ou foram maiores do que os obtidos pelos compostos separados. Ou seja, é possível diminuir efeitos secundários não desejáveis dos antibióticos sobre a saúde humana e vegetal, pela substituição de substâncias sintéticas, nem que seja em parte, por compostos antibacterianos muito específicos e atóxicos (GHENOV, 2014).

As diferenças encontradas nas zonas de inibição entre os extratos do bagaço de uva e do chá preto estão relacionados não só às estruturas físicas das bactérias, mas também a composição química destes.

Os compostos fenólicos existentes no resíduo da uva bordô exercem atividade antimicrobiana por lesarem as membranas plasmáticas lipídicas e, conseqüentemente, resultarem num vazamento de conteúdo celular. Uma particularidade vantajosa deles é que enquanto desinfetantes, ficam ativos na presença de compostos orgânicos, são imutáveis e seguem por longos períodos depois da aplicação. Vale lembrar que a ação bactericida dos compostos fenólicos se deve aos flavonoides e aos ácidos fenólicos (CZAMANSKI, 2013).

As atividades antimicrobianas de sementes de uva, bagaços, partes da fruta e produtos de vinificação vêm sendo estudadas. CHAN (2002), por exemplo, analisou o potencial antimicrobiano de reverastrol contra bactérias causadores de doenças, como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. MARDIGAN *et al* (2009) obtiveram para *S. aureus*, através de extratos etanólicos do bagaço de uva Isabel, halos de inibição entre 7,75 e 12,5 mm de diâmetro. Concordando então, com os mesmos valores encontrados, neste estudo, para esta bactéria.

Referente ao chá preto, os compostos polifenólicos são responsáveis pelo benefícios pra saúde. O conteúdo destes no chá é concedido pelos flavonoides, mais precisamente, às catequinas. Estas, dependendo da condição agregada e de sua estrutura, atuam em espécies distintas de bactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.) pela produção de peróxido de hidrogênio, mudança de permeabilidade da membrana microbiana e pelas ligações de hidrogênio dos seus grupos hidroxila com bicamadas lipídicas das membranas celulares.

O potencial antimicrobiano de chá preto, como já mencionado na revisão bibliográfica deste trabalho, foi estudado por muitos autores. Inclusive, teste de difusão em ágar com perfuração de poços, com o extrato desta bebida, foi realizado por GHENOV (2014). Esta autora avaliou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da substância frente à *E. coli* e *S. aureus*, encontrando zonas de inibição de 4,5 mm e 2,5 mm, respectivamente, descontando os valores dos poços. Divergindo um pouco dos valores encontrados nesta pesquisa, já que o extrato do chá preto 100% não teve ação antibacteriana para *E. coli* e para o *S. aureus* inibiu em 5 mm (já subtraído 8 mm do poço).

6.4 Concentração Inibitória e Bactericida Mínima

Por concentração inibitória mínima (CIM) pode-se entender que é a menor concentração onde há inibição do crescimento bacteriano visível. Geralmente, ela é expressa em CIM₅₀, que é a concentração que inibe 50% das bactérias. Ela não é uma medida de eficácia, é apenas uma análise *in vitro* da atividade de um

medicamento ou desinfetante e da susceptibilidade bacteriana. Quanto menor o valor de CIM, maior a sensibilidade do microrganismo àquela droga (PAPICH, 2013). O mesmo vale para a CBM (concentração bactericida mínima), que é a concentração mínima na qual ocorre morte bacteriana.

Estes testes foram feitos apenas com *Staphylococcus aureus*, pois na avaliação por difusão em ágar com perfuração de poços, esta bactéria apresentou sensibilidade à quase todos os controles e extratos hidroalcoólicos utilizados. Os resultados destes testes estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração Inibitória e Bactericida Mínima (n=2).

Amostras	CIM	CBM
Amoxicilina	0,25 mg/L	0,25 mg/L
Cefalexina	1 mg/L	1 mg/L
Bagaço de uva Bordô	6.250 mg/L [°]	7.500 mg/L*
Chá preto	7.500 mg/L*	7.500 mg/L*

*Concentração correspondente a 15% da amostra;

[°]Concentração correspondente a 12,5% da amostra.

Os resultados das análises de CIM e CBM para os antibióticos podem ser vistos nas Figuras 46 – 49. E os referentes à tais concentrações para os extratos hidroalcoólicos, nas Figuras 50-53. Para o teste de CBM, só foram utilizadas as concentrações próximas de onde houve a inibição no ensaio de CIM.

A partir da análise da tabela e das figuras verifica-se que, com exceção da CIM do bagaço de uva, os extratos hidroalcoólicos obtiveram mesma concentração inibitória e bactericida mínima, sendo estas de 7.500 mg/L (ou 15%). Já para os antibióticos, essas concentrações foram menores, de 1 mg/L para a cefalexina e de 0,25 mg/L para amoxicilina, o que já era esperado, visto que estes compostos são, de fato, produzidos para serem antibacterianos em quantidades baixas.

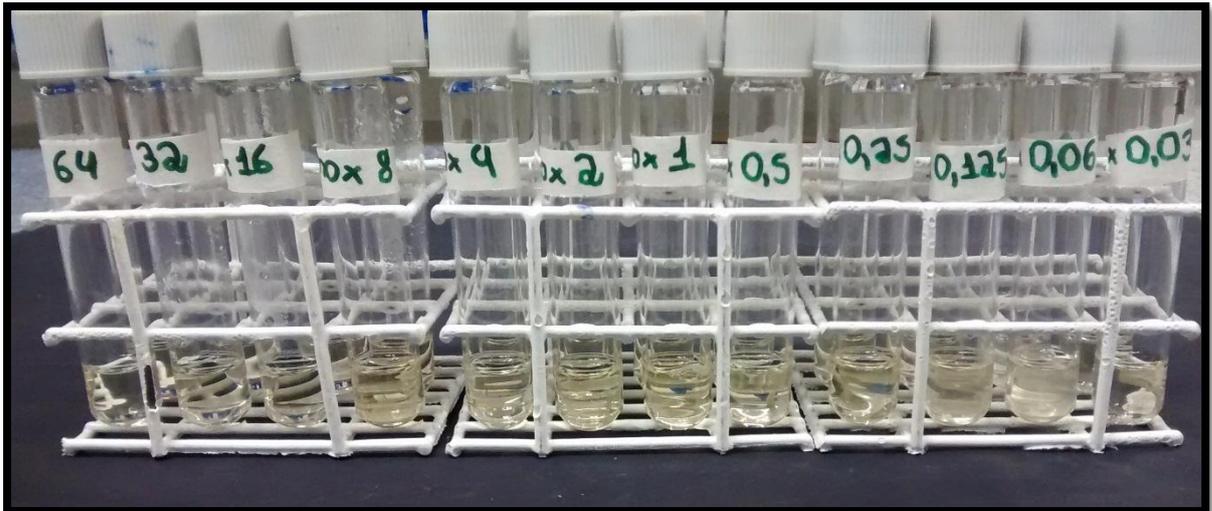


Figura 46 – Resultado das concentrações de amoxicilina (0,03 a 64 mg/L), no teste CIM.

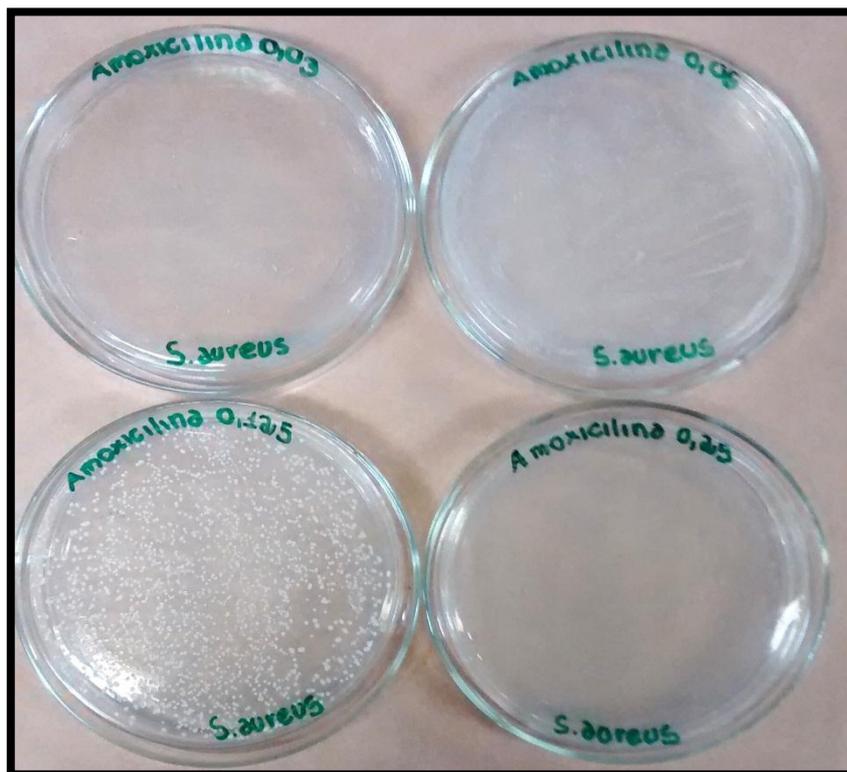


Figura 47 – Resultado das concentrações de amoxicilina (0,03 a 0,25 mg/L), no teste CBM.

Em relação aos antibióticos, parece que a CIM para a amoxicilina, de acordo com a Figura 46, é 0,25 mg/L, visto que as duas concentrações anteriores de 0,125 e 0,06 mg/L estão turvas e, portanto, possuem crescimento bacteriano. Um fato que

chama atenção é que a concentração de 0,03 mg/L não demonstra ter bactérias em desenvolvimento, porém isto pode ser proveniente de um erro analítico. Situação que ocorre também para a concentração bactericida mínima (Figura 47).

Os valores encontrados de CIM, para a amoxicilina, neste trabalho, estão em conformidade com o relatado pelos laboratórios BAGÓ, que afirmam que as concentrações inibitórias mínimas do antibiótico oscilam entre 0,01 e 5 µg por mL. Sendo que em alguns estudos feitos, para cepas de *S. aureus* suscetíveis à penicilina, este valor foi inferior a 0,1 µg/mL.

Referente à cefalexina, observa-se pela Figura 48, que a turvação para na concentração de 1 mg/L do antibiótico, por conseguinte é nesta, onde há inibição do crescimento da bactéria. Este valor encontrado é maior que o identificado pela indústria farmacêutica MEDLEY, que na bula do antibiótico descreve que a CIM deste varia entre 0,15 e 5 µg/mL.

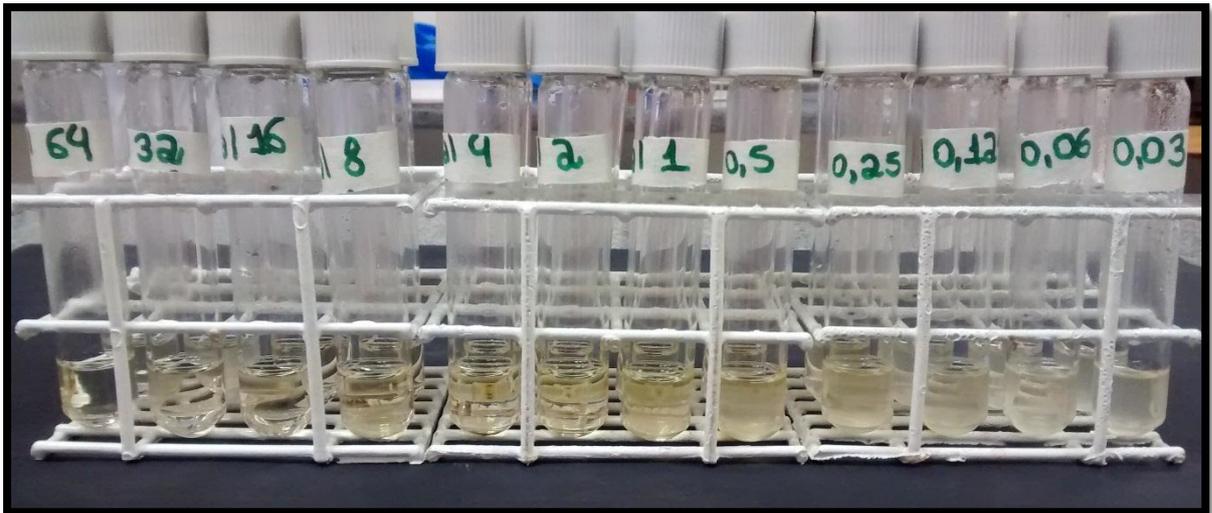


Figura 48 – Resultado das concentrações de cefalexina (0,03 a 64 mg/L), no teste CIM.

A concentração bactericida mínima encontrada para a cefalexina foi a mesma obtida pela CIM; e pode ser olhada na Figura 49.



Figura 49 – Resultado das concentrações de cefalexina (0,25 a 2 mg/L), no teste CBM.

Para os extratos, verificou-se que não houve diferenças nas concentrações inibitórias e bactericidas mínimas sob a bactéria analisada, encontrando-se o valor de 7.500 mg/L, exceto para a CIM daquele proveniente do bagaço de uva, que foi verificado na concentração de 6.250 mg/L. Estes resultados estão apresentados nas próximas Figuras (50-53). Ressaltando-se que os valores de CIM foram encontrados com base na observação de turvação dos extratos a olho nu.

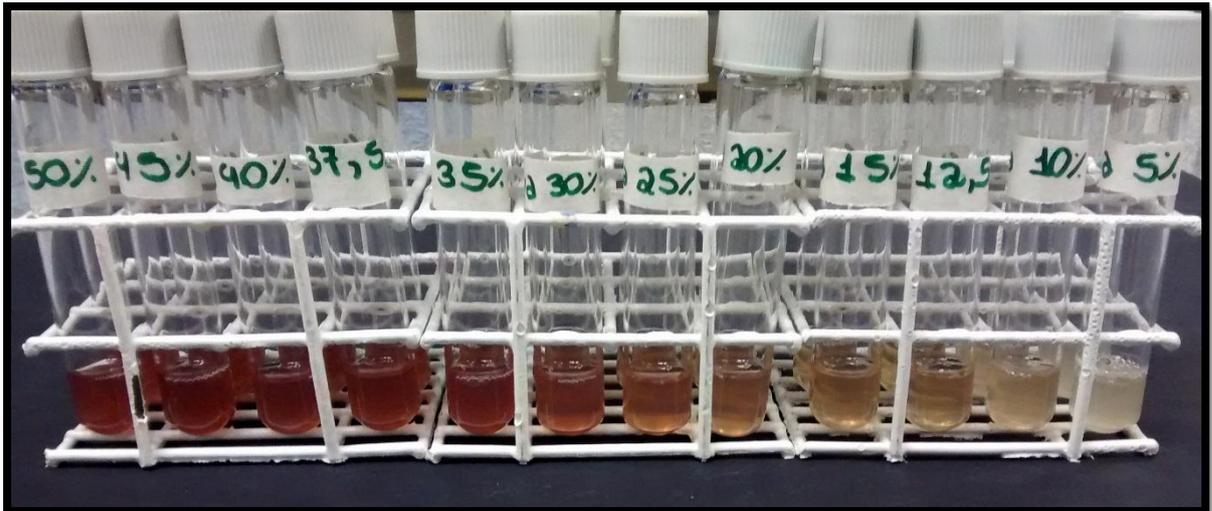


Figura 50 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô (2.500 a 25.000 mg/L), no teste CIM.

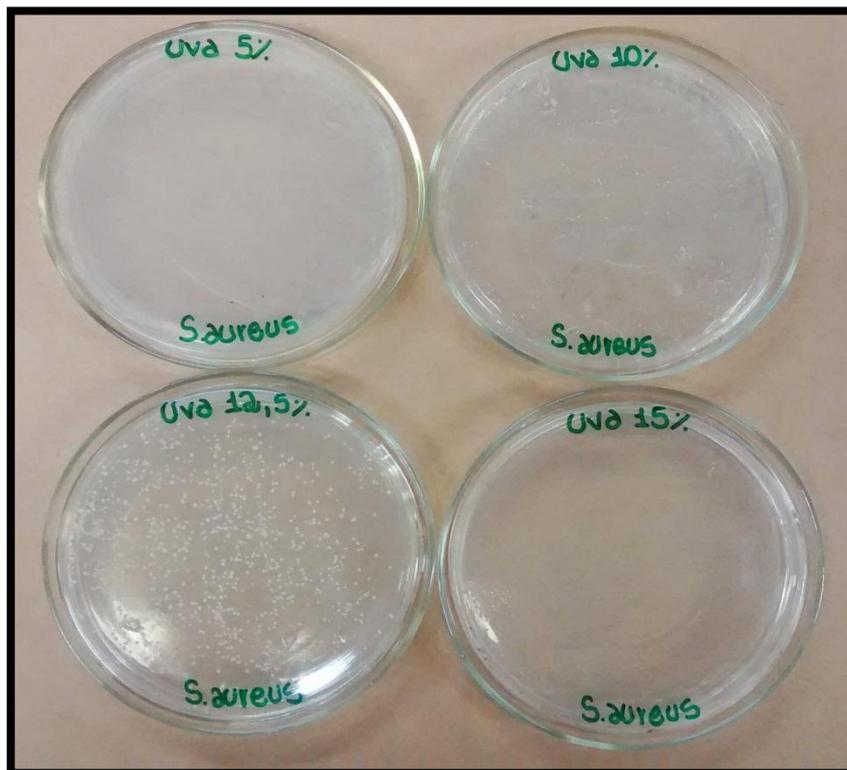


Figura 51 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô (2.500 a 7.500 mg/L), no teste CBM.

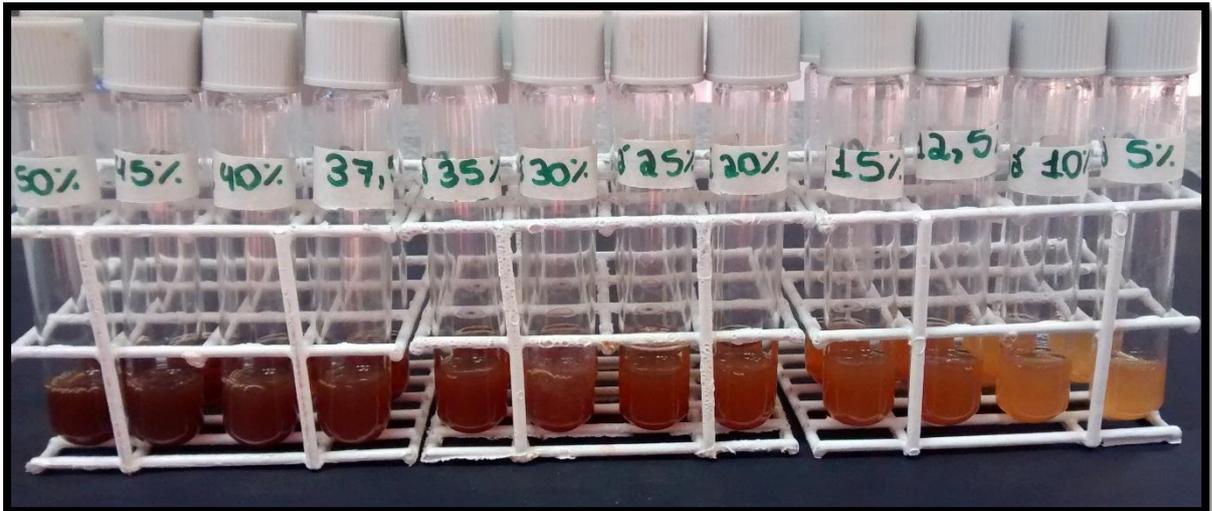


Figura 52 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do chá preto (2.500 a 25.000 mg/L), no teste CIM.



Figura 53 – Resultado das concentrações de extratos hidroalcoólicos do chá preto (2.500 a 7.500 mg/L), no teste CBM.

Comparando-se com alguns estudos feitos com diferentes tipos de vegetais, através da análise da Tabela 7, é possível notar que valores de CIM e CBM

encontrados neste trabalho foram menores. Ou seja, os extratos aqui utilizados tiveram um potencial antimicrobiano melhor sob o *S. aureus*.

Tabela 7 – Estudos antibacterianos realizados com vegetais, frente ao *Staphylococcus aureus*.

Vegetal	Espécie	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	Fonte
Flor de abril	<i>Dillenia indica</i>	47,9	71,85	ZAULI <i>et al.</i> (2004)
Manjeriço exótico	<i>Ocimum basilicum</i>	36	36	FREIRE <i>et al.</i> (2014)
Árvore amazônica	<i>Rapanea parvifolia</i>	250	450	SUFFREDINI <i>et al.</i> (2007)

7 CONCLUSÃO

Este trabalho confirmou a presença e quantificou os compostos fenólicos totais existentes nos extratos hidroalcoólicos do bagaço de uva bordô e do chá preto; constatando que a maior parte destes compostos bioativos está nesse último extrato.

Os resultados obtidos do teste antibacteriano pela metodologia de ágar com perfuração de poços demonstraram que algumas das bactérias patogênicas estudadas, especialmente o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*, mostraram ser sensíveis a ação de antimicrobianos naturais. Observou-se que, para algumas concentrações de mistura extrato + antibiótico, houve sinergia dos compostos, resultando numa inibição bacteriológica maior.

Com relação às outras espécies bacterianas estudadas, não se pode deixar de analisar os efeitos dos compostos naturais sobre elas, visto que há vários fatores influenciando na composição dos vegetais analisados. Portanto, outros métodos podem ser empregados, visando maiores valores de inibição do crescimento bacteriano.

No que diz respeito ao teste de MIC e MBC, verificou-se também que, para o *S. aureus*, pequenas concentrações de extratos, da ordem de 6.250 e 7.500 mg/L, já inibem o desenvolvimento do mesmo. Além disso, ao longo do trabalho, foi visto que, na interação das substâncias naturais com as sintéticas, em relação ao potencial antibacteriano, estas podem ser reduzidas em quantidades, provocando igual ou maior efeito. E que, portanto, tais substâncias utilizadas podem colaborar para a manutenção da qualidade ambiental e de saúde.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Para estudos futuros, é sugerido que se isole, identifique e analise os compostos bioativos responsáveis pela ação antimicrobiana de compostos naturais. Para que as empresas responsáveis pela produção de medicamentos novos possam preparar uma nova fórmula que contenha tais compostos, colaborando com o uso mais controlado e eficiente de antimicrobianos sintéticos.

REFERÊNCIAS

- ABC.es / SOCIEDAD. **¿Qué es *Escherichia coli*? Todos los detalles sobre la bacteria de los pepinos.** Disponível em: <<http://www.abc.es/20110531/sociedad/abci-escherichia-coli-pepinos-201105301450.html>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.
- ABREU, F. G. de.; BRANDÃO, J. L. B. **Impactos e desafios futuros no monitoramento dos contaminantes emergentes.** In: XX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, 2013.
- ALMEIDA, A. M. de S. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- ALVES, A. M. **Caracterização física e química, compostos bioativos e capacidade antioxidante de frutas nativas do cerrado.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- ALVES, A. R. de F. **Doenças alimentares de origem bacteriana.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2012.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resistência microbiana – mecanismos e impactos clínicos.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 25 de mai. 2015.
- ARAÚJO, A. L. M. de. **Polpa de Jambolão (*Syzygium cumini*) desidratada por liofilização e secagem em leite de jorro: caracterização físico-química e funcional e impacto da secagem.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- BAGÓ. **Trifamox ibl.** Disponível em: <<http://www.bago.com.br/web/media/Bula%20Trifamox%20IBL%20po%20para%20susp%20-%20250%20e%20500mg.pdf>>. Acesso em: 20 de jun. 2015.
- BARCELÓ, L. D.; ALDA, M. J. L. de. **Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes.** In: PANEL CIENTÍFICO-TÉCNICO DE SEGUIMIENTO DE LA POLÍTICA DE AGUAS. Disponível em: <<http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.
- BILLA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- BIOSYSTEMS. **Agar MacConkey.** Disponível em: <<http://www.biosystems.com.br/produto/1446/o-agar-macconkey-com-0-15-de-sais-biliares-cristal-violeta-e-nacl-e>>. Acesso em: 19 de jun. 2015.

BOSCARIOL, R. **Resistência bacteriana: avaliação do conhecimento em profissionais farmacêuticos no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2013.

BRESOLIN, B. M. Z.; DALL’STELLA, J. K.; SILVA, S. E. F. da. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mão de manipuladores de alimentos em Curitiba/ Paraná /Brasil. **Revista Estudos de Biologia**, v. 27, n. 59, abr.- jun., 2005.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12^a edição. Porto Alegre: AMGH, 2012. 2079 p.

CAIAFFA, M. C. *et al.* Estudo biofarmacotécnico de cápsulas de amoxicilina. Análise comparativa de produtos industrializados e magistrais. Cinética de dissolução. **Revista Lecta**, v. 20, n. 1, p. 77-90, jan.- jun., 2002.

CARNEIRO, L. C. Avaliação de *Escherichia coli* em manipuladores de alimentos na cidade de Morrinhos – GO. **Vita et Sanitas**, v. 2, n. 2, 2008.

CASELLA, R. J.; PAULA, C. E. R. de.; ALMEIDA, V. G. K. Determinação espectrofotométrica de cefalexina em formulações farmacêuticas explorando a sua reação de transferência de carga com a quinalizarina. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 914-919, 2010.

CATANEO, C. B. *et al.* Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.1, p. 93-102, jan.- mar., 2008.

CHAN, E. W. C. *et al.* Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. **Pharmacognosy Research**, v. 3, n. 4, p. 266-272, 2011.

CHAN, M. M. Y. Antimicrobial Effect of Resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n.2, p. 99-104, 2002.

CHING, W. S. **Antioxidative and antimicrobial activities of black tea**. Dissertação (Bachelor of Science) – Universiti Malaysia Sabah, 2007.

CORDEIRO, M. M. **Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas no Hospital Municipal de Ipatinga-MG**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

CZAMANSKI, R. T. **Prospecção de atividade antibacteriana em resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas à saúde e à produção animal, bem como a agroindústria familiar**. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

EL-HADEDY, D.; EL-NOUR, S. A. Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 10, p. 129-135, 2012.

EMS S/A. **Amoxicilina**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2129172015&pIdAnexo=2503850>. Acesso em: 25 de mai. 2015.

ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES. **Enterococcus faecalis**. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/119/11/ehp.119-a489b.g001.png>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.

FELSIA, X. F.; VIJAYAKUMAR, R.; KALPANA, S. Production and partial purification of streptokinase from *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 3, p. 289-291, 2011.

FERREIRA, J. C. R. **Remoção de micropoluentes emergentes em efluentes sanitários através de carvão ativado**. 2011. 160 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FERREIRA, L. L. **Estrutura Clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FERREIRA, T. G.; LEITE, M. F. **Streptococcus pyogenes: um caso de colite com evolução para síndrome do choque tóxico**. Monografia (Residência Médica em Pediatria Geral) – Hospital Materno Infantil de Brasília, Brasília, 2013.

FIGUEIREIDO, E. A. P. de. *et al.* ***Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE**. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, n. 19, v. 4, p. 421-427, 2007.

FLAYYIH, M. T.; YOUSIF, H. S.; SUBHI, I. M. Antimicrobial effects of black tea (*Camellia sinensis*) on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from eye infection. **Iraqi Journal of Science**, v. 54, n. 2, p. 255-265, 2013.

FREIRE, I. C. M. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, 2014.

FUENTEFRIA, D. B. *et al.* ***Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial**. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, set.- out., 2008.

FUNMILAYO, O. O.; KAMALDEEN, A.; BUHARI, A. M. Phytochemical screening and antimicrobial properties of a common brand of black tea (*Camellia sinensis*) marketed in Nigerian environmental. **Advanced Pharmaceutical bulletin**, v. 2, n.2, p. 259-263, 2012.

GENOVESE, M. I. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, abr. - jun., 2007.

GHENOV, F. **Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de chá preto (*Camellia sinensis*) e dos cogumelos Shitake (*Pleurotus ostreatus*) e Shimeji (*Lentinula edodes*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GLOBAL MEDICAL DISCOVERY. ***Pseudomonas aeruginosa***. Disponível em: <<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/novel-vitro-co-culture-system-allows-concurrent-analysis-mature-biofilm-planktonic-bacteria-with-human-lung-epithelia/attachment/pseudomonas-aeruginosa/>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.

HAMINIUK, C. W. *et al.* Chemical antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1529-1537, 2011. HIMEDIA. **Cetrimide agar base**. Disponível em: <<http://himedialabs.com/TD/M024.pdf>>. Acesso em: 19 de jun. 2015.

HOLT *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9^a edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático das produção agrícola – Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201301.pdf>. Acesso em: 02 de dez. 2014.

IDE, A. H. **Ocorrência e avaliação da remoção de produtos farmacêuticos por duas estações de tratamento de esgotos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica com ênfase em Química Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

IDEXX. **Enterolert**. Disponível em: <<https://www.idexx.com/water/products/enterolert.html>>. Acesso em: 19 de jun. 2015.

JARDIM JR, E. G. *et al.* Antimicrobial activity of plants infusions on oral fusobacteria and their adherence to human erythrocytes. **Arch Health Invest**, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2013.

KATALINIK, V. *et al.* Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. Varieties. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 1, p. 45-60, 2012.

KATO, C. G.; TONHI, C. D.; CLEMENTE, E. Antocianinas de uvas (*Vitis vinifera* L.) produzidas em sistema convencional. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, p. 809-821, 2012.

KAYAOGLU, G.; ORSTARVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KOLPIN, D. W. *et al.* Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

KOROLKOVAS, A. FRANÇA, F. F. de A. C. de. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 21ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 724 p.

KVITKO, C. H. C. **Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LAMBIE, N. *et al.* Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers sul postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. **Avian diseases**, v. 44, n. 1, p. 155-160, 2000.

LAMMISSION. **Microbiology 20 biochemical unknown – spring 2009**. Disponível em: <<http://www.lamission.edu/lifesciences/Steven/Biochemical%20Unknown%20guidelines.pdf>>. Acesso em: 19 de jun. 2015.

LIMA, J. D. *et al.* Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1270-1278, 2009.

LIMA, V. L. A. G. de.; MÉLO, E. de A. Nota prévia: teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 187-190, jul.- dez., 2004.

LIPTON CHÁ & SAÚDE. **O que se sabe sobre o chá?** Disponível em: <http://www.lipton.pt/cha_saude/documents/chasaude_estudos_sabesobrecha.pdf>. Acesso em: 02 de dez. 2014.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 385-393, 2011.

LOOKFORDIAGNOSIS.COM. **Fenol**. Disponível em: <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Fenol&lang=3>. Acesso em: 15 de jun. 2015.

MACIEL, A. *et al.* Portadores assintomáticos de infecções por *Streptococcus pyogenes* em duas escolas públicas na cidade do Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 2, abr.- jun., 2003.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de brock**. 12ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MANDAL, S. *et al.* Inhibitory and killing activities of black tea (*Camellia sinensis*) extract against *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Ogawa isolates. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 115-121, 2011.

MARDIGAN, L. P. *et al.* **Estudos preliminares com extrato de uva Isabel sobre bactéria de interesse em alimento.** Cesumar - Centro Universitário de Maringá, VI EPCC, 2009.

MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA. **Cefalexina monoidratada.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7616782014&pldAnexo=2209721>. Acesso em: 25 de mai. 2015.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MICROBEWORLD. ***Staphylococcus aureus.*** Disponível em: <<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=11181>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.

MICROBIOLOGÍA! (OUTSIDE). **Antimicrobianos.** Disponível em: <<http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/pared.php?Mostrar=penicilinas>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.

MICROBIOLOGY LABORATORIES. **Typical results for biochemical tests.** Disponível em: <<http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=book&type=user&func=displayarticle&aid=123>> Acesso em: 19 de jun. 2015.

MORAIS, S. M. de. *et al.* Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, jan.-mar., 2009.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Approved standard – Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.

OH, J. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Journal of Food Control**, v. 31, p. 403-409, 2013.

OLIVEIRA, D. A. *et al.* Antimicrobial activity and composition profile of grapes (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 423-432, 2012.

ÖZKAN, G. *et al.* Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1807-1811, 2004.

PALERMO NETO, J.; SPINOZA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Roca, 2005. 366 p.

PAPICH, M. G. Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. **Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, p. 1079-1089, 2013.

PRÓ-ANÁLISE. **ReadyCult Coliforms 100 (emb. c/ 20 flaconetes) Merck**. Disponível em: <http://www.pro-analise.com.br/produtos/1987/readycult_coliforms_100_emb_c_20_flaconetes_merck>. Acesso em: 19 de jun. 2015.

QUEIROZ, E. de R. **Frações de lichia: caracterização química e avaliação de compostos bioativos**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

RAMALHO, S. A. *et al.* Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. **Journal of Food Research International**, v. 51, p.155-161, 2013.

REIS FILHO, R. W. *et al.* Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Revista Ambiente & Água**, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.

REN, L. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, n. 2, p. 41-51, 2014.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual: bactérias e fungos**. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 112 p.

ROCHA, M. S. **Compostos bioativos e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

ROCHA, T. M. **Fatores de virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinífera* L. e *Vitis labrusca* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SANTANA, J. da S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano no Distrito Federal**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SANTOS, A. L. dos. *et al.* *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SERAFIM, M. L. R. da C. **Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras provenientes do aterro controlado da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2013.

SIGMA-ALDRICH. ***Pseudomonas media* and tests.** Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/pseudomonas-media.html>> Acesso em: 19 de jun. 2015.

SILVA, R. F. da. **Avaliação da presença de contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto do estado de Pernambuco e sua degradação por POA.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 216-219, 2010.

SOUZA, R. de C. R. de. **Contaminantes emergentes: detecção de histamina em solução aquosa e degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos da fração solúvel do petróleo utilizando processos oxidativos avançados.** Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SOUZA, V. B. de. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva bordô (*Vitis labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

STREPTOCOCCUS PYOGENES. ***Streptococcus pyogenes*** – Symptoms and Treatment. Disponível em: <<http://streptococcuspyogenes.org/>>. Acesso em: 03 de dez. 2014.

STUART, C. H. *et al.* ***Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment.** **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93-98, 2006.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. R. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 127-129, 2007.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 760 p.

VARGAS, A. C. de. *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan.- fev., 2004.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL – ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Journal Food Chemistry**, v. 111, p. 816-823, 2008.

VETBACT. **Biochemical tests**. Disponível em: <<http://www.vetbact.org/vetbact/?biochemtest=1>>. Acesso em: 19 de jun. 2015.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance – Global Report on Surveillance**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf>. Acesso em: 02 de dez. 2014.

XU, C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 116, p. 1557-1565, 2010.

ZAVASCKI, A. P. **Fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem em pacientes hospitalizados**. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

ZAULI, R. C. *et al.* **Atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de *Dillenia indica* L. (Flor de abril)**. III SEMIC, Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS, 2004.