



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**Jéssica Santos Schirato Albuquerque**

**TRIAGEM FARMACOLÓGICA PRELIMINAR DE MOLÉCULAS  
SINTÉTICAS FRENTE À LINHAGENS GRAM NEGATIVAS  
MULTIRRESISTENTES**

**JOÃO PESSOA  
2017**

Jéssica Santos Schirato Albuquerque

**TRIAGEM FARMACOLÓGICA PRELIMINAR DE MOLÉCULAS  
SINTÉTICAS FRENTE À LINHAGENS DE GRAM NEGATIVAS  
MULTIRESISTENTES**

Trabalho de curso submetido à Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia. Sob a orientação do Professor Rafael de Almeida Travassos e Coorientação do Professor Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.

**Orientadores:**

**Rafael de Almeida Travassos**

**Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes**

**JOÃO PESSOA**

**2017**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A345t Albuquerque, Jéssica Santos Schirato.

Triagem farmacológica preliminar de moléculas sintéticas frente às linhagens de Gram negativas multiresistentes / Jéssica Santos Schirato Albuquerque. - João Pessoa, 2017.

58 f. : il.

Orientação: Rafael de Almeida Travassos, Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Bactérias Gram negativas. 2. Multirresistência microbiana. 3. Substâncias sintéticas. 4. Atividade antimicrobiana. I. Travassos, Rafael de Almeida. II. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



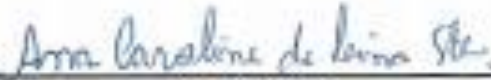
#### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e três dias do mês de novembro de 2017, às 08:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Rafael de Almeida Travassos e composta pelos avaliadores 1. Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (CBIOTEC/UFPB); 2. Ms. Ana Caroline de Lima Silva (PPgPNSB /UFPB), a discente Jéssica Santos Schirato Albuquerque, matrícula 11325120, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Triagem farmacológica preliminar de moléculas sintéticas frente a linhagens gram-negativas multirresistentes**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Rafael de Almeida Travassos, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Avaliador 1

  
\_\_\_\_\_  
Discente

  
\_\_\_\_\_  
Avaliador 2

João Pessoa/PB, 23 de novembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Andréa Flavia Santos Schirato Albuquerque** e **Walter Gomes de Albuquerque** por todo amor, esforço e exemplo durante toda a minha vida. Vocês são meus exemplos e minha motivação para dar o melhor de mim.

Aos meus irmãos **Juan Santos Schirato Albuquerque** e **Júlia Santos Schirato Albuquerque** por todo apoio, incentivo e companheirismo.

Aos meus avós **Paulo Gomes de Albuquerque**, **Ana Gomes de Albuquerque**, **Ises Santos Schirato** e **Elio Cesar Schirato** vocês foram fundamentais para o meu crescimento.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal da Paraíba**, por possibilitar minha formação profissional.

A todos os **professores do curso de Biotecnologia**, que foram de fundamental importância para minha formação acadêmica.

Ao meu orientador **Rafael de Almeida Travassos**, por todo apoio, dedicação e amizade ao longo dos quatro anos de curso. Tenho você como um exemplo.

Ao meu coorientador **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes**, por todo suporte, oportunidade e dedicação para a construção desse trabalho.

Ao **Prof. Luiz César Rodrigues** por ceder as substâncias utilizadas nesse trabalho.

Aos membros da banca **Prof<sup>a</sup> Adna Cristina Barbosa de Souza e Msc. Ana Caroline de Lima Silva**, pela disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

A **Sergio de Oliveira Santo Filho e Bianca Texeira Moraes de Oliveira** por todo companheirismo e por se disporem a me ajudar quando precisei.

A **Emanuele Cardoso Dias** por gentilmente me orientar nos primeiros experimentos realizados.

Ao **Laboratório de Farmacobiotechnologia (FARMABIO)** pelo acompanhamento, diálogos e amizade.

Ao **Laboratório Multiusuário** por me ceder o espaço para realização deste trabalho.

Ao **Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA)**, pelo auxílio durante os experimentos.

A **Deus**, que sempre esteve presente durante essa caminhada, me dando força e discernimento para realizar os meus sonhos.

A **minha família** por toda confiança, dedicação e apoio em mim investidos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

A **Cláudio Freire Madruga Filho** pelo apoio, companheirismo e paciência durante toda a graduação.

Aos meus amigos de graduação, em especial **Luanna Pinheiro de Albuquerque Freitas Bezerra, Luise Araújo de Albuquerque Simões, Gilanna Falcão Ferreira e Rafael Xavier Martins** por todos os momentos compartilhados e pela amizade que construímos. Vocês fizeram a diferença durante esses quatro anos.

A todos que pontualmente não citei, mas que de alguma maneira contribuíram com esta conquista.

Meu eterno agradecimento,

**Jéssica Santos Schirato Albuquerque.**

## RESUMO

A resistência de bactérias Gram negativas patogênicas é um problema crescente e representa sérios desafios para a terapia farmacológica. Os mecanismos de resistência utilizados por essas bactérias podem levar a falha terapêutica. Diante dessa premissa, há um aumento progressivo na busca de novas alternativas para o controle desses microrganismos. As plantas são fontes de diversos produtos com atividade terapêutica, entre elas a atividade antimicrobiana, e estas servem como base para a síntese de moléculas bioativas. Pensando nisso, o objetivo desse trabalho foi a utilização de quatro substâncias sintéticas de três classes diferentes (neolignanais, alcaloides quinazolínicos e alcaloides isoquinolínicos), a fim de avaliar um possível efeito antimicrobiano em sete linhagens de bactérias Gram-negativas multirresistentes. Para isso, foi analisada a concentração inibitória mínima em placa de 96 poços, com diluições seriadas das substâncias na presença dos microrganismos. Após a verificação da atividade, foi investigado o mecanismo de ação da C100 e C300 na presença de sorbitol, um protetor osmótico. Como resultado pôde-se observar que o 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina (MTHP) inibiu as linhagens *Pseudomonas aeruginosa* (RX01) e *Escherichia coli* (AV12) e a Licarina foi ativa à *Burkholderia cepacia* (RX02) e *Escherichia coli* (AV12), porém com elevada concentração inibitória mínima (CIM). O 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona (C100) mostrou atividade em *Pseudomonas aeruginosa* (RX01) e o 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one (C300) à *Burkholderia cepacia* (RX02) com concentração inibitória mínima (CIM) elevada, porém ambas mostraram-se mais efetivas nas linhagens *Escherichia coli* (AV12) e *Enterobacter aerogenes* (AV14). Com a investigação do mecanismo de ação destas, pôde ser observadas que ambas atuam na parede bacteriana de *Escherichia coli* (AV12) e *Enterobacter aerogenes* (AV14), levando à lise da mesma. Contudo, permitiu-se concluir que apenas o C100 e o C300 mostraram-se eficientes frente às linhagens AV12 e AV14, atuando na parede celular destas.

Palavras-chave: Bactérias Gram negativas; multirresistência microbiana; substâncias sintéticas; atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

Resistance of Gram-negative pathogenic bacteria is a growing problem and poses serious challenges to pharmacological therapy. The mechanisms of resistance used by these bacteria can lead to therapeutic failure. Given this premise, there is a progressive increase in the search for new alternatives for the control of these microorganisms. Plants are sources of several products with therapeutic activity, including antimicrobial activity, and these serve as a basis for the synthesis of bioactive molecules. The objective of this work was to use four synthetic substances from three different classes (neolignans, quinazolinic alkaloids and isoquinolinic alkaloids) in order to evaluate a possible antimicrobial effect in seven strains of multiresistant Gram-negative bacteria. For this, the minimum inhibitory concentration in 96 well plates was analyzed with serial dilutions of the substances in the presence of the microorganisms. After verification of the activity, the mechanism of action of C100 and C300 was investigated in the presence of sorbitol, an osmotic protector. As a result, it was observed that 1- (3-methoxy-4-hydroxyphenyl) -7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (MTHP) inhibited *Pseudomonas aeruginosa* (RX01) and *Escherichia coli* (AV12) and Licarina was active on *Burkholderia cepacia* (RX02) and *Escherichia coli* (AV12), but with a high minimum inhibitory concentration (MIC). 2- (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) -3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin-4 (1H) -one (C100) showed activity in *Pseudomonas aeruginosa* (RX01) and 2- (4-hydroxy -3-phenylhoxypheyl) -3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin-4 (1H) -one (C300) to *Burkholderia cepacia* (RX02) with high inhibitory concentration (MIC), but both showed to be more effective in the strains *Escherichia coli* (AV12) and *Enterobacter aerogenes* (AV14). With the investigation of the mechanism of action of these, it could be observed that both act on the bacterial wall of *Escherichia coli* (AV12) and *Enterobacter aerogenes* (AV14), leading to its lysis. However, it was concluded that only the C100 and C300 were efficient against the AV12 and AV14 strains, acting on the cell wall of these strains.

Keywords: Gram negative bacteria; bacterial multiresistance; synthetic substances; antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia da parede de bactérias Gram-negativas .....	15
Figura 2 - Mecanismos de resistência.....	24
Figura 3 - C100 (2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)- ona) .....	30
Figura 4 - C300 (2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin- 4(1H)-one).....	30
Figura 5 - Síntese do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4,- tetrahydroisoquinolina (MTHP).....	31
Figura 6 - Licarina .....	32
Figura 7 - Esquema da microplaca utilizada na diluição dos antibióticos. ....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AmpC** - Monofosfato cíclico de adenosina

**ATP** - Adenosina trifosfato

**BCC** – Complexo *Burkholderia cepacia*

**BGNF** – Bactérias Gram negativas não fermentadoras

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CN** – Caldo nutriente

**CNF** – Fator necrosante citotóxico

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**ESBL** – Betalactamases de espectro ampliado

**FC** – Fibrose cística

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**UFC** – Unidade formadora de colônia

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem das linhagens .....	35
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima do MTHP .....	39
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima da Licarina .....	40
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima do C100 .....	40
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima do C300 .....	41
Tabela 6 - Avaliação do efeito do dimetilsulfóxido nas linhagens bacterianas .....	42
Tabela 7 - Investigação do mecanismo de ação do C100 sobre a integridade da parede .....	42
Tabela 8 - Investigação do mecanismo de ação do C300 sobre a integridade da parede .....	43

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. Bactérias Gram-negativas: importância clínica.....	14
1.1.1. Gram-negativas não fermentadoras (BGNNF) .....	15
1.1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
1.1.1.2. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	17
1.1.1.3. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	18
1.1.2. <i>Enterobactérias</i> .....	19
1.1.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	21
1.1.2.2. <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	22
1.1.2.3. <i>Citrobacter freundii</i> .....	22
1.2. Mecanismos de resistência e multirresistência.....	23
1.2.1. Modificação enzimática do antibiótico .....	24
1.2.2. Bombas de efluxo .....	25
1.2.3. Alteração na permeabilidade da membrana externa .....	26
1.2.4. Alteração do sítio de ação .....	26
1.3. Produtos naturais como base para síntese orgânica de moléculas bioativas	27
1.3.1. Alcaloides .....	28
1.3.1.1. Alcaloide quinazolínico.....	29
1.3.1.2. Alcaloide isoquinolínico.....	30
1.3.2. Neolignanas.....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1. Objetivo geral .....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33

.....	34
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>34</b>
3.1. Produto teste .....	34
3.2. Microrganismos .....	34
3.3. Concentração inibitória mínima .....	35
3.1. Avaliação do efeito do dimetilsulfóxido nas linhagens bacterianas .....	36
3.2. Investigação do mecanismo de ação das substâncias na parede celular bacteriana.....	37
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. Concentração inibitória mínima .....	39
4.1.1. Concentração inibitória mínima MTHP .....	39
4.1.2. Concentração inibitória mínima da Licarina.....	39
4.1.3. Concentração inibitória mínima do C100.....	40
4.1.4. Concentração inibitória mínima do C300.....	41
4.2. Avaliação do efeito do dimetilsulfóxido nas linhagens bacterianas .....	41
4.3. Investigação do mecanismo de ação das substâncias sobre a integridade da parede celular bacteriana .....	42
4.3.1. Investigação do mecanismo de ação do C100 .....	42
4.3.2. Investigação do mecanismo de ação do C300 .....	43
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

## INTRODUÇÃO

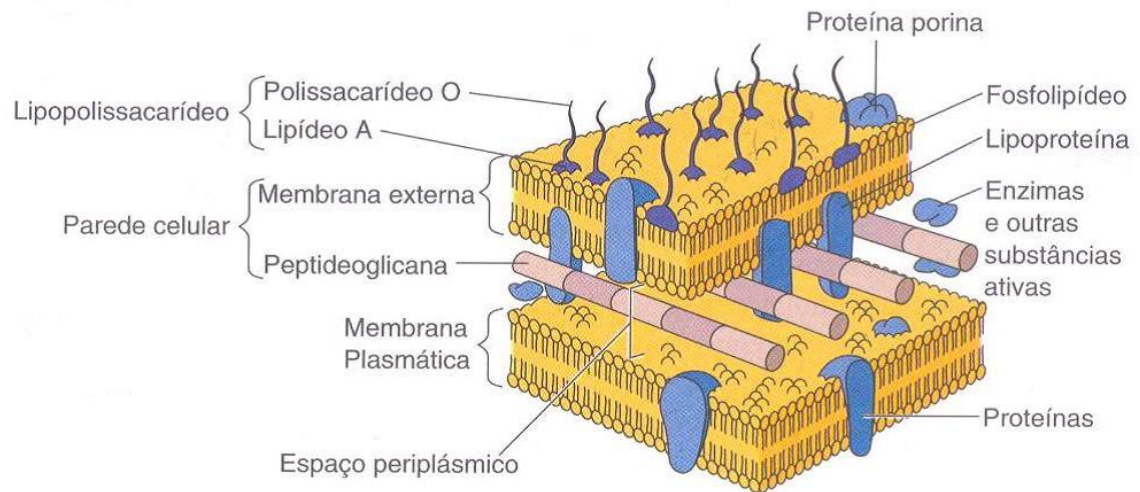
### 1.1. Bactérias Gram-negativas: importância clínica

A parede celular das Gram-negativas apresenta estrutura e composição da membrana mais complexa, possuindo camada de peptidoglicano mais fina (~10 nm). A superfície externa da célula possui uma membrana consistindo de proteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolípidos (Figura 1) (CHAVES, 2004). Uma característica atípica da membrana externa é a distribuição assimétrica dos lipídeos, a face externa contém os LPS, enquanto a face interna contém a maioria dos fosfolípidos (ABU-LAIL e CAMESANO, 2003).

Os LPS contêm mais carga por unidade de área que os fosfolípidos e a maioria desta carga é aniônica em pH neutro, devido à exposição de grupos carboxil e fosforil que podem ser ionizados. Já foi relatado que a redução nos níveis de oxigênio do meio induz modificação estrutural no LPS de algumas bactérias, resultando em aumento da hidrofobicidade da célula. Isto indica que a bactéria é capaz de alterar as características da superfície celular, como a hidrofobicidade, em função das mudanças no ambiente externo (PALMER et al., 2007).

As bactérias Gram-negativas incluem também o espaço periplásmico que é o espaço entre a membrana citoplasmática interna e a membrana externa. Pode constituir até 40% do volume celular total em espécies Gram-negativas (KAYSER et al., 2004).

O espaço contém uma rede solta de cadeias de peptídeo, bem como um gel contendo enzimas hidrolíticas e degradativas. Outras enzimas no gel estão envolvidas em várias vias bioquímicas, incluindo síntese de peptidoglicanos, transporte de elétrons e alteração de substâncias tóxicas para a célula. Em algumas espécies, o gel também contém beta-lactamase, uma enzima responsável pela degradação da penicilina. Fato de importância clínica quando se considera a resistência a antibióticos (KAYSER et al., 2004).

**Figura 1 - Morfologia da parede de bactérias Gram-negativas**

Fonte: Maria Eduarda Kostecki (2013).

### 1.1.1. Gram-negativas não fermentadoras (BGNNF)

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) constituem um grupo extremamente diverso, são estritamente aeróbios, não esporulados e se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia por meio de fermentação, degradando-os pela via oxidativa (MENEZES et al., 2004).

Os BGNNF são urbanos, e podem causar uma grande variedade de infecções (DIJKSOORN et al., 2007; LIPUMA et al., 2007), representando aproximadamente 15% de todos os bacilos Gram-negativos cultivados a partir de espécies clínicas (BLONDEL-HILL et al., 2007; LIPUMA et al., 2007).

Estudos clínicos demonstraram um aumento no grau de infecções por BGNNF em instituições hospitalares a partir da década de 1970, tendo como principais representantes *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*. (BERGOGNE- BÉRÉZIN, 1996; CEZÁRIO et al., 2009; FALAGAS, 2006). Essas infecções têm origem endógena ou exógena, dependendo de diversos fatores, como o uso de substâncias imunossupressoras, utilização abusiva de agentes antimicrobianos de amplo espectro, procedimentos cirúrgicos prolongados e instrumentação mecânica inadequada (FIGUEIREDO-MENEZES et al., 2005).



Os BGNNF podem diferir em seu potencial patogênico e transmissibilidade, e muitos são resistentes às múltiplas drogas (SCHEREKENBERGER et al., 2007). Por este motivo, a identificação correta do organismo em nível de espécie é importante para o gerenciamento adequado do paciente (ENOCH et al., 2007).

O desenvolvimento e a persistência da resistência aos antimicrobianos nas bactérias é um problema contínuo que tem sido objeto de pesquisas (HIGGINS et al., 2001). Desta forma, existe uma necessidade urgente de novos antimicrobianos para resolver o problema causado por esses organismos (ENOCH et al., 2007).

Em contrapartida, a resistência desses organismos a biocidas é um problema emergente que há pouco tempo veio a atrair maior interesse. A aptidão das bactérias Gram-negativas em resistir a esses agentes é muitas vezes intrínseca, em que a impermeabilidade celular ou um sistema de efluxo impede concentrações suficientemente elevadas de o biocida atingir locais alvo dentro da célula (MC DONNELL, RUSSELL, 2004). Esta também pode ser mediada por mutação ou aquisição de elementos genéticos, como plasmídeos, integrons ou transposons (RUSSELL et al., 1997).

Algumas BGNNF, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Aeromonas spp.*, *Chryseobacterium spp.*, *Ochrobactrum anthropi*, *Comamonas acidivorans* e *Sphingobacterium spiritivorum*, foram consideradas historicamente como contaminantes ambientais ou organismos de baixa patogenicidade e, portanto, não clinicamente significativas (HIGGINS et al., 2001). No entanto, seu surgimento como causas significativas de bacteremia hospitalar, tem sido observado mais recentemente, particularmente no que diz respeito a pacientes imunocomprometidos (BERGOGNE-BÉREZIN et al., 1987; WILLIAMSON et al., 1999).

#### **1.1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* é um bacilo aeróbio facultativo Gram-negativo e encontra no solo seu *habitat* de preferência, podendo também ser encontrado em água doce e fresca. Possuem habilidade de adaptar-se a uma grande variedade de condições físico-químicas, pode carrear plasmídeos e genes que lhe conferem multirresistência a antimicrobianos e capacidade catabólica frente a diversos compostos (MAIA et al., 2009).

Linhagens de *P. aeruginosa* estão amplamente distribuídas no meio ambiente, fazem parte das principais causas de infecções hospitalares, sendo responsável por 10% de todas as infecções adquiridas nos hospitais (ALOUSH, 2006). A infecção é geralmente oportunista e associada a dispositivos invasivos, ventilação mecânica, queimaduras, feridas, cirurgia ou por infecção cruzada de outros colonizados (ENOCH et al., 2007).

A *P. aeruginosa* tem um grande arsenal de fatores de virulência, permitindo combater as defesas do hospedeiro. Estes incluem flagelos, *pili*, produção de alginato, fenótipos mucóides, lipopolissacarídeos, fatores oxidativos e toxinas (PIER, RAMPHAL, 2005). Esse fator de virulência pode ser regulado por meio de *quórum-sensing*, isto é, um mecanismo regulador de genes geralmente definido como regulação dependente da densidade populacional celular e é mediado através de moléculas de sinal extracelular (HEURLIER et al., 2006; JOINT et al., 2007).

Atualmente se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, perdendo apenas para o *Staphylococcus aureus*. Relatos de redução da susceptibilidade da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo publicados no Brasil (ANDRADE et al., 2001) e em outros países destacando-se a diminuição de sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação como os carbapenêmicos e as cefalosporinas anti-pseudomonas (NICOLETTI et al., 2006).

O surgimento e disseminação gradual de metalo-  $\beta$ -lactamases, com a sua capacidade de hidrolisar todas as  $\beta$ -lactamas, comprometeu ainda mais a atividade de muitos agentes tradicionalmente utilizados para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* (WALSH, 2005). Outra característica marcante e preocupante desta espécie, é a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos (McGOWAN, 2006).

#### **1.1.1.2. *Burkholderia cepacia***

O complexo de *B. cepacia* (Bcc) é um grupo de bacilos Gram-negativos, não esporulados, que compreende pelo menos nove espécies. Identificado originalmente como um agente patogênico de plantas na década de 1950, as bactérias Bcc são encontradas em todo o ambiente (BURKHOLDER, 1950).

Em contraste com os traços patogênicos que levaram à sua identificação original, as Bcc geralmente participam de interações ecologicamente benéficas com plantas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Estas também têm considerável diversidade genética e capacidade metabólica, o que lhes permite degradar poluentes importantes, como tricloroetileno (LESSIE et al., 1996).

As espécies Bcc tiveram inúmeros nomes, incluindo *P. cepacia*, *P. multivorans* e *P. kingii* (GOVAN et al., 1996). Em 1992, sete espécies foram movidas do gênero *Pseudomonas* e transferidas para o novo gênero *Burkholderia* devido a base de sequências de rRNA, valores de homologia de DNA-DNA, composição de lipídeos, ácidos graxos celulares e características fenotípicas. Isso estabeleceu um curso determinante de pesquisa sobre a taxonomia e epidemiologia desses organismos. (YABUUCHI et al, 1996).

Nos últimos 20 anos, as Bcc emergiram como agentes patogênicos oportunistas altamente problemáticos em pacientes com fibrose cística (FC) e indivíduos imunocomprometidos e o número de infecções causadas pela Bcc aumentou nesses grupos de pacientes (ISLES et al., 1996; GOLDMAN, 1986). Semelhante a outros agentes patogênicos oportunistas como *P. aeruginosa*, as Bcc normalmente não infectam indivíduos saudáveis, mas apenas aqueles que são imunocomprometidos. Os pacientes com FC são particularmente suscetíveis a infecções pulmonares pela Bcc (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005).

No entanto, em contraste com outros agentes patogênicos oportunistas, as bactérias Bcc normalmente não são transportadas como organismos comensais e, portanto, a infecção é adquirida no ambiente hospitalar (nosocomialmente) ou pelo ambiente selvagem. Vários relatórios citaram desinfetantes, soluções intravenosas e dispositivos médicos contaminados como fontes de surtos de Bcc hospitalares (HUTCHINSON et al., 1996; OIE, KAMIYA, 1996).

O interesse na aplicação biotecnológica de Bcc na agricultura e na indústria também aumentou nos últimos anos. Embora potencialmente benéfico esse uso comercial generalizado dessas bactérias também suscitou preocupações de que os riscos de infecção para indivíduos vulneráveis possam ser aumentados (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005).

### **1.1.1.3. *Aeromonas hydrophila***

O gênero *Aeromonas* foi proposto por Kluyver & van Niel (1936) para acomodar bactérias em forma de haste possuindo as propriedades gerais do grupo entérico, mas móveis por meio de flagelos polares. No Manual Bergey de 1974, a definição original foi alterada para incluir as seguintes propriedades salientes: bactérias Gram-negativas, flageladas polares, anaeróbios facultativos, fermentação de carboidratos com formação de ácido ou ácido e gás, oxidase positiva, reduzindo nitratos para nitritos, insensível ao composto vibrilostático 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (OI129), teor de guanina-citosina do DNA, 57 a 63% molar.

Linhagens de *A. hydrophila* foram isoladas de produtos alimentares, do solo, de água corrente ou parada (EWING et al., 1961). É patogênica para animais marinhos e de água doce, e experimentalmente para ratos e coelhos (BLAIR et al., 1970).

A ocorrência de infecções de feridas por *A. hydrophila* em hospedeiros saudáveis após lesão associada à água só ocasionalmente foi notado e foi enfatizado pela primeira vez em uma série de adultos contendo dois casos de infecção mista associada a acidentes de natação (GILARDI et al., 1970). O microrganismo tem sido associado a pacientes com abscessos, pneumonia por aspiração, celulite, diarreia, peritonite, septicemia, infecção do trato urinário e como invasor oportunista em hospedeiros imunossupressos (EWING et al., 1961; BLAIR et al., 1970; PEARSON et al., 1972).

Durante os últimos anos, tem havido crescente interesse quanto ao possível papel das espécies do gênero *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*) como causa de gastroenterite humana. As investigações clínicas e laboratoriais sugeriram que a espécie é um patógeno entérico significativo (BURKE et al., 1983). A maioria dos estudos em fontes responsáveis pela gastroenterite de *A. hydrophila* concentrou-se na sua transmissão em abastecimento de água (RIPPEY, 1979).

Anos depois, foi sugerido alternativamente que as espécies poderiam representar um importante patógeno transmitido por alimentos e surgiu a hipótese de que os alimentos poderiam ser importantes na disseminação do microrganismo. Embora *A. hydrophila* tenha sido identificada como parte da microbiota contaminante de vários alimentos, geralmente faltam dados quantitativos sobre sua incidência e a extensão nos alimentos (BUCHANAN, 1984).

### 1.1.2. Enterobactérias

As enterobactérias representam grupos de bactérias Gram-negativas, fermentadoras de glicose e oxidase negativas que inclui espécies como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. (SANTOS, 2006).

Em seus habitats naturais, as enterobactérias estão constantemente sob ataque de uma grande variedade de estresses ambientais. Uma das condições hostis mais frequentemente encontradas é o estresse ácido. Algumas bactérias como a *E. coli*, *Salmonella typhimurium* ou *Shigella flexneri* enquanto transitam através do trato gastrointestinal devem resistir ao pH extremamente baixo no estômago, bem como os ácidos gordurosos voláteis presentes no intestino e fezes. Patógenos intracelulares facultativos, como *Salmonella* sp., também toleram episódios de pH baixo nos fagolisossomas de macrófagos (SHAWN et al., 1997).

Mesmo ao sair de um hospedeiro, os organismos entéricos podem enfrentar o estresse ácido sob a forma de resíduos industriais ou em matéria orgânica em decomposição. Assim, a capacidade de detectar e responder a mudanças potencialmente letais no pH ambiental é crucial para a sobrevivência das Enterobactérias (SHAWN et al., 1997).

As enterobactérias também possuem mecanismos genéticos que as tornam facilmente resistentes aos antimicrobianos. A denominação de betalactamases é utilizada para nomear as enzimas ativas contra os antibióticos betalactâmicos (SANDERS, 1997). Com a introdução de novos betalactâmicos foram observadas mudanças nessas enzimas, que se tornaram enterobactérias resistentes às novas drogas como as cefalosporinas de largo espectro, monobactâmicos, carbapenema e combinação destas drogas. Espécies com estas características foram denominadas de betalactamases de espectro ampliado (ESBLs) (PITOUT et al., 1997).

As ESBLs são armazenadas no espaço periplasmático de bactérias Gram negativas e são codificadas por genes localizados no DNA (ácido desoxirribonucléico) cromossômico ou extra cromossômico, nos plasmídeos e/ou transposons (SANDERS et al., 1993; JONES et al., 2000). As ESBLs são inibidas pela presença do ácido clavulânico, subactam e tazobactam, que quando associados aos antibióticos betalactâmicos, ligam-se às betalactamases e determinam sua inativação. Essa característica é utilizada em laboratório em técnicas de difusão em discos para identificar bactérias produtoras de ESBLs (SANTOS, 2006).

### 1.1.2.1. *Escherichia coli*

A espécie bacteriana denominada *E. coli* é um bastonete Gram-negativo, não esporulado, oxidase negativa, móvel por flagelos peritríquios ou não móvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, pertencente à família Enterobacteriaceae.

Fontes de carbono como acetato e glicose são usadas para crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. A glicose é fermentada a ácidos: láctico, acético e fórmico, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. Acetoína ou acetil metil carbinol não são formados. Conseqüentemente, *E. coli* produz betagalactosidase e indol mas não forma sulfito de hidrogênio ou hidrolisa a uréia (KRIEG et al., 1984).

As linhagens de *E. coli* são importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos. Encontram-se nas fezes e em geral têm ampla distribuição, embora em pequenas quantidades, nos ambientes onde se encontram os alimentos. Como microrganismo indicador, a presença de *E. coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para atestar a possibilidade de contaminação fecal e presença de outros microrganismos enteropatogênicos (FRANCO, 2002).

A patogenicidade da *E. coli* está relacionada à sua capacidade de colonizar o epitélio intestinal. A colonização é mediada por fatores denominados fímbrias, estruturas proteicas consideradas antígenos de superfície e de grande atividade antigênica, sendo um importante fator de avaliação para diagnóstico e identificação de cepas patogênicas (NATARO; KAPER, 1998).

Diversos fatores de virulência detectados em amostras patogênicas de *E. coli* podem ser causas de infecções do trato urinário, diarreias, sepses e meningite em animais e humanos, entre eles: toxinas, adesinas, invasinas, presença de cápsula, capacidade de resistir ao poder bactericida do soro e captação de ferro. Dentre estes fatores, assume destaque a produção do fator necrosante citotóxico, que tem sido associado a uma grande variedade de infecções no homem e nos animais. Este fator é subdividido em CNF1 e CNF2, e é considerado importante mecanismo de virulência de *E. coli* (SUSSMAN, 1997). Em geral, a ocorrência de CNF em *E. coli* de

origem animal e/ou humana está relacionada à produção de alfa-hemolisina (GYLES, 1992).

Uma das estratégias mais adotadas para ajudar a prevenir e controlar as diversas infecções, entre elas as enterites, tem sido a terapia antimicrobiana. Entretanto, a falta de critérios para o uso adequado e seguro dos antimicrobianos associa-se à presença de resíduos antimicrobianos em produtos de origem animal, à seleção de bactérias resistentes e a sérios riscos à saúde pública (BACCARO et al., 2002).

### **1.1.2.2. *Enterobacter aerogenes***

*E. aerogenes* emergiu como um importante patógeno hospitalar desde 1992 (ARPIN et al., 1996, DAVIN et al., 1996). Esta bactéria gram-negativa é causa de infecções nosocomiais do trato respiratório por bactérias gram-negativas, após *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (JARVES e MARTONE, 1992). Membros do gênero *Enterobacter*, como a maioria dos membros da família *Enterobacteriaceae*, podem ser responsáveis por infecções oportunistas em pacientes debilitados (GASTON, 1988; de CHAMPS, et al. 1991).

Antibióticos particularmente estáveis contra as enzimas bacterianas inativantes foram produzidos por químicos medicinais, como os carbapenems ou as cefalosporinas de largo espectro. No caso dos membros da família *Enterobacteriaceae*, a resistência a novos compostos de betalactâmicos pode ser frequentemente associada a alterações da permeabilidade do invólucro (BUSH et al., 1985). Para atingir seu alvo, os antibióticos betalactâmicos usam engenhosamente poros específicos (NIKAIDO, 1994), que são as principais vias transversais da membrana externa, servindo para proteger as bactérias dos compostos tóxicos (NIKAIDO, 1989).

### **1.1.2.3. *Citrobacter freundii***

*C. freundii* é um membro aeróbico da família *Enterobacteriaceae*, é encontrada comumente em água, solo, alimentos e ocasionalmente no trato gastrointestinal de animais de sangue quente (GOMES et al., 2012).

Embora as linhagens de *Citrobacter* sp. que colonizam o trato gastrointestinal humano sejam tradicionalmente consideradas como de baixa virulência (PEPPERELL et al., 2002). Elas podem ser a fonte de vários tipos de infecções, como trato urinário, respiratório, intra-abdominal, ferida, osso, corrente sanguínea, e infecções do sistema nervoso central (ALTMANN et al., 1976; HODGES et al., 1978; LIPSKY et al. 1978; MOHANTY et al., 2007). As infecções por *C. freundii* geralmente são identificadas em pacientes debilitados e hospitalizados, com múltiplas comorbidades, que estão em maior risco de adquirir um patógeno no ambiente hospitalar (LIPSKY et al., 1978).

A escolha racional da terapia antimicrobiana para infecções por *C. freundii* pode ser problemática, uma vez que estas espécies codificam os genes cromossômicos e indutíveis de amp-beta-lactamase, que podem ser expressos constitutivamente em níveis elevados devido a alterações mutacionais, conferindo resistência a múltiplos antibióticos (LAVIGNE et al., 2007).

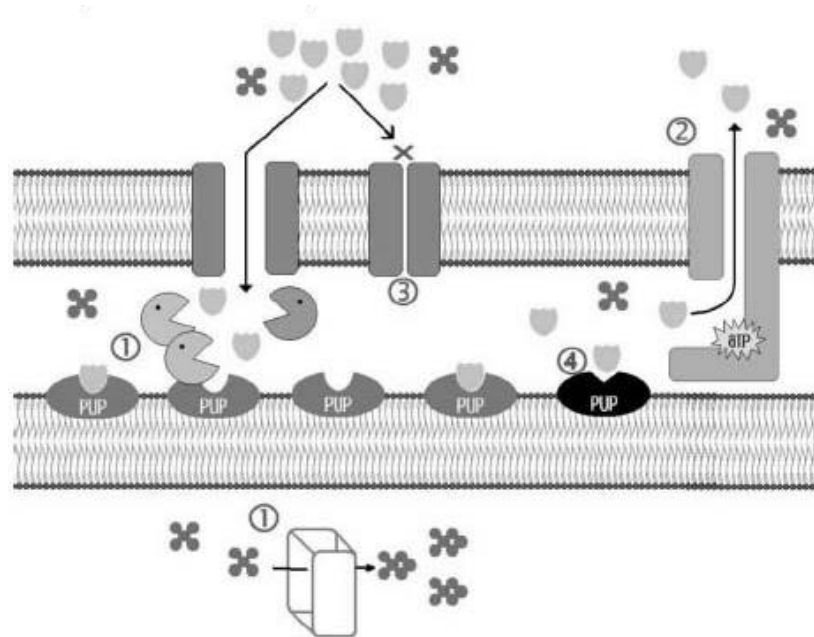
Ainda assim, é pouco conhecido sobre seus mecanismos patogênicos, incluindo o potencial envolvimento da habilidade invasiva, além da produção em algumas linhagens de uma enterotoxina estável ao calor (GUARINO et al., 1989).

## **1.2. Mecanismos de resistência e multirresistência**

A resistência de bactérias Gram-negativas aumenta com o passar dos anos, representando sérios desafios para o tratamento de infecções tanto adquiridas na comunidade como nos hospitais (TAFUR et al., 2008).

Sabe-se que as bactérias Gram-negativas possuem um arsenal de mecanismos de resistência à disposição e que a seleção desses mecanismos pode levar à falha terapêutica. Estes se dividem em quatro mecanismos principais, como mostra a Figura 2: a modificação enzimática do antibiótico, as bombas de expulsão, a alteração na permeabilidade da membrana externa e a alteração do sítio de ação (TAFUR et al., 2008).



**Figura 2 - Mecanismos de resistência**

1- Enzimas modificadoras; 2- Bomba de efluxo; 3- Alteração da permeabilidade da membrana externa; 4- Proteínas unidoras de penicilina.

Fonte: Tafur et al., 2008.

### 1.2.1. Modificação enzimática do antibiótico

As bactérias expressam enzimas capazes de criar mudanças na estrutura dos antibióticos causando perda de suas funcionalidades (LIVERMORE, 1991). A modificação enzimática do antibiótico é o mecanismo de resistência mais prevalente em bactérias, sendo a produção de beta-lactamases a majoritária (TAFUR et al., 2008).

A estrutura molecular dos antibióticos betalactâmicos é comum, onde todos compartilham de um anel betalactâmico, que é responsável em grande parte por sua ação antimicrobiana. As betalactamases são onipresentes de bactérias Gram-negativas e representam uma maneira importante de re-resistência, são enzimas capazes de quebrar o anel betalactâmico, inativando o antibiótico. Os genes que codificam estas enzimas podem ser encontrados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos, o que permite a sua transferência fácil entre diferentes bactérias, o que representa um grande desafio para o controle de infecções (TAFUR et al., 2008).

As betalactamases tipo AmpC são enzimas que foram encontradas para serem codificadas por cromossomos em uma variedade de bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa* e *C. freundii*. As betalactamases tipo AmpC geralmente

hidrolizam a cefalosporinas de espectro reduzido, cefalosporinas portins de terceira geração, aztreonam e inibidores de betalactamase (PHILIPPON et al., 2002; JACOBY, MUNAZ-PRINCE, 2005).

Em condições normais, as bactérias com AmpC cromossômico são capazes de produzir esta enzima, porém em pequenas quantidades, o que não altera significativamente a sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração. No entanto, podem ocorrer mutações espontâneas (a uma taxa de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$ ) nos genes que regulam a produção de AmpC, o que leva à produção constitutiva desta enzima em quantidade suficiente para hidrolisar os antibióticos acima mencionados (HANSON, SANDERS, 1999; LIVERMORE, 2005).

Durante a década de 1980 houve um aumento na incidência das bactérias Gram-negativas resistentes a betalactâmicos nas unidades de cuidados intensivos neonatal, especialmente em países em desenvolvimento (JAIN et al., 2003), possivelmente relacionado à maior utilização das cefalosporinas de terceira e quarta gerações, à necessidade frequente de procedimentos invasivos e à não adoção de medidas específicas de controle de infecção hospitalar (KIM et al., 2002). As bactérias produtoras de betalactamase mais relatadas na literatura são a *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* (KIM et al., 2002).

### **1.2.2. Bombas de efluxo**

São responsáveis pela resistência contra antimicrobianos, não apenas em bactérias, mas também em outros patógenos comuns (TAFUR et al., 2008). Esse mecanismo é frequentemente utilizado por bactérias Gram-negativas, estas operam retirando o antibiótico do espaço periplasmático e expulsando-o, evitando assim que ele atinja seu local de ação (VILA et al., 2007).

Eles são encontrados na membrana externa da célula e expulsam um grande número de moléculas para fora das bactérias, incluindo metabólitos, detergentes, solventes orgânicos e antibióticos. Para isso, eles usam a hidrólise do ATP ou um mecanismo de contra transporte iônico como um substrato de energia. O principal papel desse mecanismo é manter as concentrações baixas de substâncias tóxicas na célula (TAFUR et al., 2008).

As bombas de efluxo podem ser específicas para um medicamento ou inespecífico. Se a expressão de uma bomba inespecífica for aumentada, pode ser

gerada a resistência cruzada para múltiplas classes de medicamentos usando um único mecanismo (DEPARDIEU et al., 2007). Normalmente, as bombas de saída causam pequenos aumentos na CIM, porém, quando vários mecanismos de resistência aparecem simultaneamente, ocorre resistência clinicamente evidente (TAFUR et al., 2008).

### **1.2.3. Alteração na permeabilidade da membrana externa**

As bactérias podem gerar mudanças da bicamada lipídica, fazendo com que a permeabilidade da membrana seja alterada, principalmente, por mudanças nas porinas. Estas são proteínas que formam canais de água inseridos na membrana externa que regulam a entrada de alguns elementos, incluindo antibióticos. As mudanças em sua conformação podem impedir a passagem desses agentes para o espaço periplasmático (VILA et al., 2007).

Os antibióticos betalactâmicos devem penetrar através desses canais. Quando uma porina é alterada devido a mutações, as CIMs para o antibiótico aumentam. As porinas podem ser específicas ou inespecíficas, dependendo da sua seletividade para as moléculas que passam (KOHLENER et al., 1999; QUALE et al., 2006).

### **1.2.4. Alteração do sítio de ação**

As bactérias podem alterar o local onde o antibiótico se liga e pode interromper uma função vital das bactérias. Este mecanismo é usado principalmente por bactérias Gram-positivas, que geram mudanças estruturais nos locais de ação de antibióticos betalactâmicos no nível de proteínas de ligação à penicilina, porém se observa que em Gram-negativas esta estratégia é menos frequente (CAVACO et al., 2008; TAFUR et al., 2008).

Os locais de ação podem ser encontrados em diferentes componentes bacterianos que envolvem atividades celulares vitais. As proteínas de ligação à penicilina são responsáveis pela transpeptidação, um processo fundamental para a estabilidade da parede celular. Alterações estruturais secundárias à mutações podem diminuir a afinidade dos betalactâmicos pelas proteínas de ligação à penicilina, permitindo que as bactérias continuem com sua parede intacta e sobrevivam (TAFUR et al., 2008).

### **1.3. Produtos naturais como base para síntese orgânica de moléculas bioativas**

O estudo intensivo sobre as plantas serviu para investigação dos seus produtos e suas atividades. Através dele teve-se também o desenvolvimento da química orgânica e, conseqüentemente, o advento da farmacologia, devido o isolamento dos metabólitos e descrição estrutural a partir das análises. Dos estudos iniciais foi possível estabelecer alguns princípios ativos que são utilizados como base até hoje. (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Com o aparecimento de antibióticos feitos a partir de fermentação microbiana junto com a produção de medicamentos por via sintética pela indústria farmacêutica, proporcionados pelo desenvolvimento de tecnologias no século XX, houve o decaimento no interesse por uso de plantas medicinais e o conseqüente investimento em fármacos de origem vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

No contexto das pesquisas de novos produtos com potencial antifúngico, aqueles oriundos de plantas, podem possibilitar o isolamento de substâncias conhecidas ou inéditas, e até o seu uso como modelos para moléculas sintéticas (DI SALVO, 1974). Trabalhos realizados com extrato bruto ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais têm demonstrado o potencial destas no controle de fitopatógenos, tanto por ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitores (STANGARLIN et al., 1999).

Quanto à ação antibacteriana, alguns óleos essenciais são capazes de controlar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Como típicos compostos lipofílicos, os óleos essenciais atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática. A atividade citotóxica parece estar ligada ao rompimento das estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, das paredes celulares dessas bactérias (PRASHAR et al., 2003).

O emprego indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos favorece a seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a

esses compostos, tornando o uso de produtos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (CRISAN, 1995).

Diversos produtos que apresentam ação antimicrobiana eficiente têm sido descritos na literatura. Dentre eles o óleo essencial de *Melaleuca*, que contém mais de 100 compostos bioativos, sendo o principal composto antimicrobiano o terpeno-4-ol, que induz danos estruturais na membrana e parede celular, comprometendo a manutenção da integridade das células de bactérias e fungos (HALCON, MILKUS, 2004). Relatos de CARSON et al. (1995), FAOAGALI et al. (1998) e HADA et al. (2003) comprovam sua ação bacteriostática sobre *E. coli*, *S. aureus*, enquanto HAMMER et al., (2000 e 2003) avaliaram sua ação sobre *Cândida albicans*.

Segundo OLIVEIRA FILHO (2010) a própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas *Apis melliferas* pela transformação de diferentes exudatos secretados pelas árvores, folhas e flores. Utilizam esta substância para proteção da colméia contra proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias e também para selar aberturas e eliminar insetos invasores.

### 1.3.1. Alcaloides

Os alcaloides correspondem a uma classe de substâncias químicas (metabólitos secundários) com distribuição abundante na natureza, derivadas de diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, plantas e outros. Além de se apresentarem com estruturas variadas e importantes atividades farmacológicas (BHADRA, KUMAR 2011).

A origem do termo “alcaloide” é proveniente do árabe álcali que significa básico. O conceito para tal classe é de difícil estabelecimento, devido o grupo heterogêneo que a compõe. A definição mais aceita é a sugerida em 1983, por Pelletier, onde diz que “um alcaloide é um composto cíclico orgânico que contém nitrogênio no seu estado de oxidação negativo e de distribuição limitada em organismos vivos” (PELLETIER, 1983 apud ROBERTS; WINK, 1998).

Dentro deste meio de moléculas há subdivisões que classificam melhor determinados grupos pelo tipo de biossíntese que foi gerado, como os alcaloides indólicos, provenientes do triptofano, alcaloides tropânicos provenientes da ornitina e os isoquinolínicos, provenientes da fenilalanina e tirosina (ROBERTS; WINK, 1998).

### 1.3.1.1. Alcaloide quinazolínico

A quinazolina é um composto formado por dois anéis aromáticos simples fundidos de seis membros - anel de benzeno e pirimidina (Figura 3 e 4). É um composto colorido amarelo, encontrado geralmente em forma cristalina. Devido às suas distintas atividades farmacológicas, nos últimos 10-20 anos, esta estrutura tem vindo a ser amplamente explorada tendo sido já determinadas diversas atividades biológicas de derivados da quinazolina, que incluem atividade anti-inflamatória, antibacteriana, analgésica, anti-viral, anti-citotoxina, anti-hipertensa, anti-obesidade, anti-psicótica, anti-convulsante, antitubercular e outras ( SELVAM et al., 2011 WANG et al., 2013).

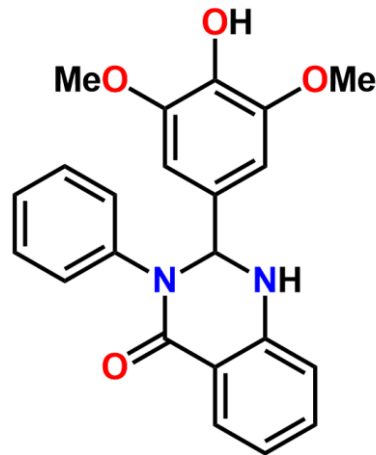
A resistência bacteriana às drogas existentes é um problema crescente no mundo. Pesquisas consideráveis foram realizadas na síntese de novos derivados de quinazolinona com potente atividade antimicrobiana. Esses derivados possuem atividades antibacterianas, especialmente contra linhagens Gram-positivas, e fungos através da interação com a parede celular e as estruturas de DNA (MOHAMED et al., 2013).

Em vista do exposto, o *design* e a síntese de antibacterianos mais novos são uma área de imenso significado e continua a atrair a atenção de um número crescente de químicos medicinais. Relatórios anteriores sobre síntese de derivados de quinazolina começaram principalmente a partir de ácido antranílico 27-32, benzonitrilo e assim por diante (RAO e BAHEKAR, 2001; ROCCO et al., 2004).

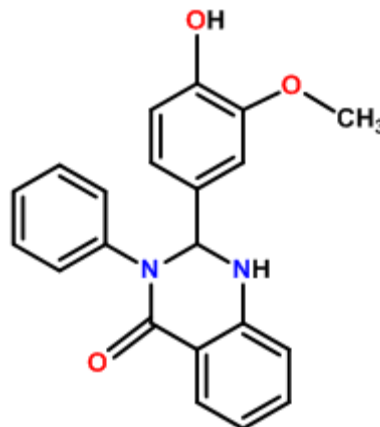
Existem vários medicamentos aprovados com estrutura de quinazolina no mercado, como cloridrato de prazosina, mesilato de doxazosina e cloridrato de terazosina (SELVAM, 2011; ABIDA, 2011).

Desta forma, alguns estudos da relação de atividade da estrutura de derivados de quinazolinona em várias literaturas revelaram que a substituição nas posições 2 e 3, existência de átomos de halogéneo em posições 6 e 8 e substituição (principalmente amina ou amina substituída) na 4ª posição do anel de quinazolinona poderiam melhorar suas atividades antimicrobianas (GIRI et al., 2009).

**Figura 3** - C100 (2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona)



**Figura 4** - C300 (2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenyl-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-one)



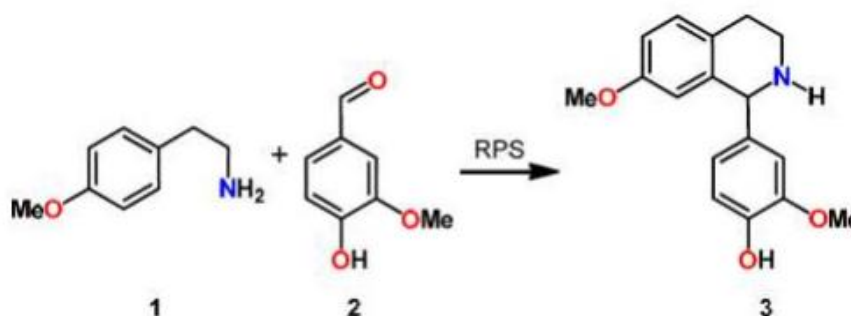
### 1.3.1.2. Alcaloide isoquinolínico

Os isoquinolínicos são os alcaloides mais abrangentes no reino vegetal, onde compreendem cerca de 400 membros. Os anéis isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico e tetrahydroisoquinolínico 1-substituído são estruturas geralmente encontradas em uma variedade de produtos naturais e em compostos biologicamente ativos (Figura 5) (GRUNDON, 1976; AMAT et al., 2010).

Seus efeitos têm ações antimalárica, antitumoral (QUINN; IRANSHAHI, 2014) e antimicrobiana (SHOKEEN et al., 2005), além de outros efeitos farmacológicos,

como analgésicos (CORDELL et al., 2001), antidepressivos, anti-inflamatório (KUROKI; CHOI; LIU, 2004; CHAEEA et al., 2007; LUO et al., 2010), contra cólicas estomacais, intestinais e menstruais, relaxante muscular, anti-hipertensivo (CORDELL, 1983; DONG et al., 1992; CHUEH et al., 1995; SILVA et al., 2009) e mais uma variedade de ações biológicas. Alguns estudos demonstraram a atividade antimicrobiana dessa classe sendo eficaz para bactérias Gram-positivas, como a *Staphylococcus epidermidis* (RABELO et al., 2014).

**Figura 5** - Síntese do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (MTHP).



### 1.3.2. Neolignanas

As neolignanas são conhecidas como uma classe de metabólitos secundários com uma grande diversidade estruturais e atividades farmacológicas, sendo formadas pelo acoplamento de duas unidades de fenilpropanoides (eugenol, álcool coniferílico, isoeugenol, etc.) (SOUZA, 2012).

As lignanas são formadas através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entres si ou, destes com ácidos cinâmicos, estruturalmente apresentam o carbono gama (C-9) oxigenado. Neolignanas são dímeros oxidativos de alil fenóis e de propenil fenóis, entre si ou cruzados e não apresentam carbono gama (C-9) oxigenado (BARBOSA-FILHO, 1999).

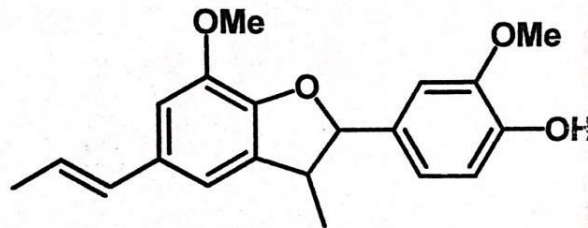
Sua ocorrência na natureza se limita a plantas vasculares que possuem o tecido enriquecido por ligninas, macromoléculas dotadas de um esqueleto em (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, abrangendo usualmente muitas unidades, de 2 até 5000. A biossíntese tanto dos



lignóides, como das ligninas, envolve os metabólitos primários finais da via metabólica do chiquimato: ácido cinâmico –álcoois cinâmicos –propenilfenóis + alifenóis (GOTLLIEB; YOSHIDA, 1984).

Sobre a atividade das lignanas, elas possuem uma atividade esquistossomicida (PEREIRA, 2011), atividade anti-leishmaniose (NÉRIS, 2013), antibacteriana (LI et al., 2017), antitumoral (BASTOS et al., 1996), anti-inflamatória (SOUZA et al., 2004) e anti-oxidante (CHAN et al., 1996).

**Figura 6 - Licarina**



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Explorar o potencial de do MTHP, da Licarina, do C100 e C300 com o intuito de averiguar as suas atividades antimicrobianas defrontes sete linhagens de bactérias Gram-negativas multirresistentes, com a finalidade de descobrir substâncias potencialmente terapêuticas como agentes antibióticos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar triagens farmacológicas em linhagens multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (RX01 e RX08), *Burkholderia cepacia* (RX02), *Aeromonas hydrophila* (RX04), *Escherichia coli* (AV12), *Citrobacter freundii* (AV13) e *Enterobacter aerogenes* (AV14);
- Caracterizar o mecanismo de ação do C100 e C300 perante as linhagens de *Escherichia coli* (AV12) e *Enterobacter aerogenes* (AV14).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Produto teste

Foram utilizadas quatro substâncias sintéticas, codificadas como o MTHP (1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina), Licarina (neolignana diidrobenzofurânica), C100 (2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona) e C300 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenyl-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one. Estas foram sintetizadas e cedidas pelo Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues do Departamento de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB. As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% formando uma solução de concentração  $10^{-1}$  M (solução-estoque), que era acondicionada a  $-20$  °C, sendo diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

#### 3.2. Microrganismos

Foram utilizadas sete linhagens de bactérias pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA): *Pseudomonas aeruginosa* (RX01 e RX08), *Burkholderia cepacia* (RX02), *Aeromonas hydrophila* (RX04), *Escherichia coli* (AV12), *Citrobacter freundii* (AV13) e *Enterobacter aerogenes* (AV14). As linhagens foram isoladas em ralos de lavatórios de três salões de beleza nas cidades de João Pessoa e Cabedelo (Tabela 1), e em embalagens de cosméticos, sendo estas caracterizadas como multirresistentes a diferentes antibióticos, tais como: amoxicilina, cefalexina, cefalotina, entre outros (XAVIER et al., 2015). Os microrganismos foram mantidos em ágar nutriente inclinado sob refrigeração à 4°C e submetidas a repiques trimestrais.

**Tabela 1** - Origem das linhagens

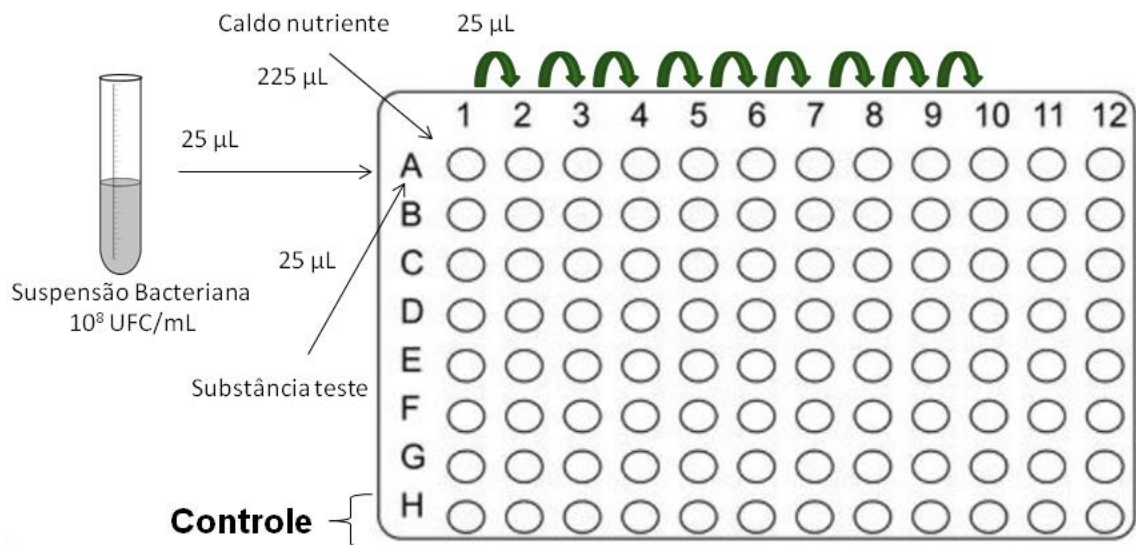
Linhagem	Microorganismo	Local de isolamento
RX01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Embalagem de cosméticos
RX02	<i>Burkholderia cepacia</i>	Embalagem de cosméticos
RX04	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Embalagem de cosméticos
RX08	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Embalagem de cosméticos
AV12	<i>Escherichia coli</i>	Ralo de salão de beleza
AV13	<i>Citrobacter freundii</i>	Ralo de salão de beleza
AV14	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ralo de salão de beleza

### 3.3. Concentração inibitória mínima

As suspensões bacterianas foram padronizadas em solução de NaCl 0,9% estéril, a partir de uma cultura recente, padronizada pelo tubo nº 1 da escala de MacFarland ( $\approx 3 \times 10^8$  UFC/mL). O experimento foi conduzido em placa de 96 poços (Figura 7), dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H).

O preparo da microplaca com as diluições seriadas da substância consistiu em preencher os poços com caldo nutriente (CN), de composição: extrato de carne (1 g/L); extrato de levedura (2 g/L); peptona (5 g/L) e cloreto de sódio (5 g/L), pH 6,8  $\pm$  0,2 (Kasvi, São Paulo, Brasil), sendo aplicados 225  $\mu$ L de meio nos poços. Na 1ª coluna foi preparada a concentração mais alta das substâncias. A partir desta coluna, foi iniciada a diluição seriada ao longo da microplaca até a 9ª coluna. Para isto, foi utilizada uma micropipeta, com a qual o meio foi homogeneizado e 10% (22,5  $\mu$ L) transferido para a 2ª coluna (Figura 7).

**Figura 7** - Esquema da microplaca utilizada na diluição dos antibióticos.



**Fonte:** O autor

Em seguida 10% do conteúdo dos poços da 2<sup>a</sup> coluna foi transferido para o poço da 3<sup>a</sup> coluna, para diluição por homogeneização e assim sucessivamente, até chegar à 9<sup>a</sup>, quando, após a homogeneização, 10% do volume de meio com antibiótico diluído (22,5 µL) foi descartado. Os intervalos de concentração do antibiótico na microplaca, nas colunas 1<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> foram de 10<sup>-3</sup> M a 10<sup>-11</sup> M para todas as substâncias utilizadas.

Para a inoculação das bactérias nas colunas 1<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> da microplaca, foram utilizados 25 µL de suspensão bacteriana do pré-inóculo por poço. A última linha da placa não era inoculada, sendo utilizada como controle de esterilidade. Após a inoculação, as microplacas foram mantidas em temperatura ambiente, por 48 horas, sendo observadas a cada 24 horas.

Após o período de 48 horas, foi retirado 25 µL do sistema, e inserido em placas multipoços contendo 225 µL de caldo nutriente, a fim de verificar a viabilidade após o ensaio, que era observada pela turbidez do poço. O sistema foi mantido à temperatura ambiente por 24 horas.

### 3.1. Avaliação do efeito do dimetilsulfóxido nas linhagens bacterianas

Para eliminação da hipótese de um possível efeito antimicrobiano do DMSO, foi avaliado o efeito deste reagente frente às linhagens bacterianas. Dessa forma, as bactérias foram plaqueadas e permaneceram em estufa a 37°C por 24 horas. Eram preparadas suspensões das linhagens testes em solução salina (NaCl a 0,9% p/v), as quais eram padronizadas de acordo com o tubo 1 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente  $3.10^8$  Unidades Formadoras de Colônia - (UFC/mL).

O estudo de observação de sensibilidade das linhagens bacterianas frente ao dimetilsulfóxido (DMSO) foi realizado através da técnica de difusão em meio sólido utilizando-se discos de papel de filtro (Bawer et al., 1966).

Os discos contendo o DMSO foram embebidos com 2µL de cada concentração utilizada (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%, 0,00001%, 0,000001%, 0,0000001%), sendo em seguida colocados em placas de Petri estéreis contendo ágar Muller-Hinton inoculado com 1mL das suspensões bacterianas. Após incubação das placas a 37°C por 18 horas, foi observada a interferência do DMSO sobre as linhagens bacterianas ensaiadas. O ensaio foi realizado em duplicata e os resultados a serem expostos foram obtidos através da média dos resultados dos dois ensaios paralelos.

### **3.2. Investigação do mecanismo de ação das substâncias na parede celular bacteriana**

Para investigar a ação da droga sobre a parede celular bacteriana foi realizado um ensaio com sorbitol, um protetor osmótico. Caso a droga atuasse de alguma forma sob a parede celular da bactéria, ele provocaria lise de suas células quando na ausência do sorbitol, mas permitiria seu crescimento na presença desse suporte osmótico. O ensaio comparou diferentes concentrações das drogas na ausência e na presença de sorbitol a 0,8 M (FROST et al., 1995).

As linhagens eram plaqueadas e permaneciam em estufa a 37°C por 24 horas. Foram preparadas suspensões das linhagens testes em solução salina (NaCl a 0,9% p/v), as quais eram padronizadas de acordo com o tubo 1 da escala McFarland.

Foram utilizadas placas de 96 poços, em cada poço foi inserido 225 µL de caldo nutriente (CN) previamente adicionado de sorbitol com peso molecular de 182,17 g

(VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ). Para a inoculação das bactérias, foram utilizados 25  $\mu$ L de suspensão bacteriana do pré-inóculo por poço. A última linha da placa não era inoculada, sendo utilizada como controle de esterilidade. As microplacas foram mantidas em temperatura ambiente, por 48 horas para realização da leitura.

Após o período de 48 horas, foi retirado 25  $\mu$ L do sistema, e inserido em placas multipoços contendo 225  $\mu$ L de caldo nutriente, a fim de verificar a viabilidade após o ensaio com o sorbitol, que era analisado pela turbidez. O sistema foi mantido a temperatura ambiente por 24 horas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração inibitória mínima

#### 4.1.1. Concentração inibitória mínima MTHP

A Tabela 2 mostra o efeito do MTHP (1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina), em diferentes concentrações, sob as linhagens bacterianas. A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* (RX01) e de *Escherichia coli* (AV12) se apresentaram sensíveis ao MTHP, com CIM de  $10^{-4}$  M e  $10^{-5}$  M, respectivamente. Em contrapartida, as demais linhagens se mostraram resistente.

**Tabela 2** - Concentração inibitória mínima do MTHP

Microrganismos	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-9}$ M	$10^{-10}$ M
RX01	S	S	R	R	R	R	R	R
RX02	R	R	R	R	R	R	R	R
RX04	R	R	R	R	R	R	R	R
RX08	R	R	R	R	R	R	R	R
AV12	S	S	S	R	R	R	R	R
AV13	R	R	R	R	R	R	R	R
AV14	R	R	R	R	R	R	R	R
Controle	R	R	R	R	R	R	R	R

**S**- Sensível à substância; **R**- Resistente à substância.

#### 4.1.2. Concentração inibitória mínima da Licarina

As linhagens de *B.cepacia* (RX02) e *E.coli* (AV12) foram sensíveis à Licarina (neolignana diidrobzofurânica), ambas apresentando CIM de  $10^{-4}$  M. As demais linhagens foram resistentes a droga em todas as concentrações analisadas (Tabela 3).





**S-** Sensível à substância; **R-** Resistente à substância.

#### 4.1.4. Concentração inibitória mínima do C300

A Tabela 5 demonstra o efeito do C300, em diferentes concentrações, sob as linhagens bacterianas. A linhagem de *P.aeruginosa* (RX01), *B.cepacia* (RX02), *E.coli* (AV12), *E.aerogenes* (AV14) se apresentaram sensíveis ao C300, com CIM de  $10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M e  $10^{-6}$  M, respectivamente. Em contrapartida, as demais linhagens se mostraram resistente ao mesmo.

**Tabela 5 - Concentração inibitória mínima do C300**

Microrganismos	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-9}$ M	$10^{-10}$ M
RX01	S	S	S	R	R	R	R	R
RX02	S	S	S	R	R	R	R	R
RX04	R	R	R	R	R	R	R	R
RX08	R	R	R	R	R	R	R	R
AV12	S	S	S	S	S	R	R	R
AV13	R	R	R	R	R	R	R	R
AV14	S	S	S	S	R	R	R	R
Controle	R	R	R	R	R	R	R	R

**S-** Sensível à substância; **R-** Resistente à substância.

#### 4.2. Avaliação do efeito do dimetilsulfóxido nas linhagens bacterianas

A Tabela 6 demonstra que o dimetilsulfóxido (DMSO) não apresentou atividade antimicrobiana nas linhagens analisadas em nenhuma das concentrações utilizadas. Dessa forma, conclui-se que o mesmo não interfere na atividade das substâncias utilizadas.

**Tabela 6** - Avaliação do efeito do dimetilsulfóxido nas linhagens bacterianas

Microrganismos	1%	0,1%	0,01%	0,001%	0,0001%	0,00001%	0,000001%	0,0000001%
RX01	R	R	R	R	R	R	R	R
RX02	R	R	R	R	R	R	R	R
RX04	R	R	R	R	R	R	R	R
RX08	R	R	R	R	R	R	R	R
AV12	R	R	R	R	R	R	R	R
AV13	R	R	R	R	R	R	R	R
AV14	R	R	R	R	R	R	R	R
Controle	R	R	R	R	R	R	R	R

S- Sensível ao DMSO; R- Resistente ao DMSO.

### 4.3. Investigação do mecanismo de ação das substâncias sobre a integridade da parede celular bacteriana

#### 4.3.1. Investigação do mecanismo de ação do C100

A Tabela 7 expressa que tanto a linhagem de *E. coli* (AV12) e *E. aerogenes* (AV14) cresceram na presença do sorbitol, apresentando elevação da CIM, o que aponta que o C100 atua na integridade da parede dessas linhagens.

**Tabela 7** - Investigação do mecanismo de ação do C100 sobre a integridade da parede

Microrganismos	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-10</sup> M
AV12 com sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
AV14 com sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
AV12 sem sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+
AV14 sem sorbitol	-	-	-	-	-	+	+	+
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) - Positivo; (-) – Negativo.

### 4.3.2. Investigação do mecanismo de ação do C300

A Tabela 8 demonstra que tanto a linhagem de *E. coli* (AV12) e *E.aerogenes* (AV14) cresceram na presença do sorbitol, com elevação da CIM, denotando que o C300 atuou na inibição da parede bacteriana dessas linhagens.

**Tabela 8** - Investigação do mecanismo de ação do C300 sobre a integridade da parede

Microrganismos	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-9</sup> M
AV12 com sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
AV14 com sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
AV12 sem sorbitol	-	-	-	-	-	+	+
AV14 sem sorbitol	-	-	-	-	-	+	+
Controle	-	-	-	-	-	-	-

(+) - Positivo; (-) – Negativo.

## 5. DISCUSSÃO

O fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os microrganismos é conhecido desde o início da era microbiana. Com o surgimento e uso clínico de sulfonamidas, em 1933, e, em seguida, da penicilina, em 1941, pôde-se perceber que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos poderia ser uma característica natural das bactérias ou ser adquirida por linhagens individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 2000).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (CUNHA, 1988). Foi descrito em trabalhos anteriores o perfil de resistência a múltiplas drogas das linhagens utilizadas neste trabalho, tais como à amoxicilina, sulfonamida e polimixina B (XAVIER, 2015; FERRARO, 2015).

Nos últimos anos o desenvolvimento de fármacos eficientes no tratamento de infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, que por outro lado, fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas às drogas utilizadas. Este fato ressalta a necessidade de estimular novas pesquisas e estratégias voltadas para a preservação da eficácia dos agentes antibacterianos atualmente disponíveis e a descoberta de novas classes de agentes antibacterianos (TAVARES, 2000).

As plantas são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais servem como modelos para a síntese de um grande número de fármacos (RABELO, 2010). As plantas superiores evoluíram a partir da seleção de defesa contra ataques microbianos, desta forma, produtos sintéticos obtidos a partir destes são menos propensos a sofrer resistência (RANG et al., 2001; DIXON, 2001; LI et al., 2004).

Os alcaloides isoquinolínicos compõem uma classe de moléculas que vem despertando interesse ultimamente. Estudos químicos e farmacológicos quanto a sua atividade antimicrobiana são amplamente realizados e com base nessa hipótese, foi analisado o efeito do MTHP, um alcaloide isoquinolínico obtido através de síntese orgânica (PAREDES et al., 2015).

A atividade dessa classe frente a bactérias Gram-positivas é bem descrita na literatura, porém muitas linhagens Gram-negativas se mostram resistentes a alguns

alcaloides, tais como O-metilmoschatolina, isomoschatolina, nornuciferina, isocoreximina e liriodenina (RABELO et al., 2014; COSTA, 2011; COSTA, 2010; PEREZ-AMADOR, 2004).

Os mecanismos de resistência utilizados por bactérias Gram-negativas, como a alteração na permeabilidade da membrana externa e as bombas de efluxo, podem aumentar a CIM frente às drogas com atividade antimicrobiana, corroborando com os resultados obtidos com o MTHP (TAFUR et al., 2008). As linhagens de *P.aeruginosa* (RX01) e *E.coli* (AV12) apresentaram sensibilidade ao mesmo, com CIM de  $10^{-4}$  M e  $10^{-5}$  M respectivamente, enquanto que as demais linhagens demonstraram resistência (Tabela 3).

As neolignananas são conhecidas como uma classe de metabólitos secundários com uma grande diversidade estrutural e atividades farmacológicas (SOUZA, 2012). Estudos anteriores demonstraram a atividade antimicrobiana de neolignananas, partindo dessa premissa, foi utilizada a Licarina, uma substância pertencente a essa classe, a fim de verificar seu possível efeito (LI et al., 2017). Como resultado, foi observado que as linhagens de *B.cepacia* (RX02) e *E.coli* (AV12) apresentaram sensibilidade à Licarina, porém com CIM de  $10^{-4}$  M em ambos os casos.

Li et al., 2004 descreve o efeito de neolignananas em linhagens de bactérias Gram-positivas, porém as bactérias Gram-negativas não foram sensíveis. As diferenças no efeito antimicrobiano dos compostos isolados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ser devidas a diferenças nas barreiras de permeabilidade. Em espécies Gram-negativas, a membrana externa é uma barreira bastante efetiva para compostos anfipáticos (PESSINI et al., 2003).

Os alcaloides quinazolínicos são considerados estruturas privilegiadas na química medicinal. Estas estruturas representam moléculas que são capazes de se ligar em múltiplos locais com alta afinidade e facilitam a descoberta mais rápida de compostos medicamente ativos úteis (JAFARY et al., 2016).

Pesquisas consideráveis foram realizadas na síntese de novos derivados de quinazolina com potente atividade antimicrobiana. Esses derivados possuem atividades antibacterianas, especialmente contra linhagens Gram-positivas, e fungos por meio da interação com a parede celular e as estruturas de DNA. O cloridrato de alfuzosina, o cloridrato de prazosina, o mesilato de doxazosina e o cloridrato de terazosina são medicamentos aprovados com estrutura quinazolinica no mercado (MOHAMED et al., 2014).

Para eliminarmos a hipótese da influência do dimetilsulfóxido (DMSO) na atividade antimicrobiana destas substâncias, foi analisado o efeito deste frente às linhagens utilizadas neste estudo. Como resultado foi observado que o DMSO não interferiu no crescimento bacteriano, indicando assim que não há participação desse solvente no efeito das substâncias utilizadas.

A partir desse princípio, foram analisado o provável efeito de dois alcaloides dihidroquinazolínicos, o C100 e o C300, diante linhagens de bactérias Gram-negativas. O C100 mostrou-se efetivo diante das linhagens de *P. aeruginosa* (RX01), *E. coli* (AV12) e *E. aerogenes* (AV14), sendo as duas últimas mais sensíveis, apresentando CIM de  $10^{-9}$  M e  $10^{-7}$  M, respectivamente. O C300 inibiu as linhagens de *P. aeruginosa* (RX01), *B. cepacia* (RX02), *E. coli* (AV12) e *E. aerogenes* (AV14), com CIM de  $10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-7}$  M e  $10^{-6}$  M respectivamente. Diante dos resultados obtidos, se fez necessária a investigação do mecanismo de ação desses alcaloides quinazolínicos.

A parede celular bacteriana é uma membrana rígida que forma e protege os microrganismos, esta é externa à membrana citoplasmática e interna à cápsula possuída por alguns microrganismos (STROMINGER et al., 1959). Células tratadas com drogas que interferem na biossíntese da parede celular frequentemente têm características morfológicas distintas. As mudanças na morfologia podem sugerir os possíveis alvos ou modo de ação destes inibidores (FROST et al., 1995).

O bioensaio do sorbitol é baseado nos danos que uma determinada substância causa aos componentes da parede celular de microrganismos, provocando a lise das células na ausência do sorbitol, que funciona como um osmoprotetor. As duas linhagens analisadas (AV12 e AV14) apresentaram viabilidade na presença do sorbitol, na presença de RETRO-2 e do RETRO-4, indicando que ambas as substâncias atuam na parede celular das bactérias, promovendo a lise.

Muito se discute a cerca dos componentes ativos nas plantas servindo como base para o desenvolvimento de produtos sintéticos. Com o crescente aparecimento de linhagens multirresistentes aos fármacos encontrados no mercado, busca-se pelo fomento destas classes na terapêutica antimicrobiana.

## 6. CONCLUSÕES

No estudo do efeito antimicrobiano do MTHP, da Licarina, do C100 e do C300, visando elucidar o mecanismo de ação em bactérias Gram-negativas multirresistentes, pode-se concluir que:

- O MTHP apresentou atividade nas linhagens de *P. aeruginosa* (RX01) e *E.coli* (AV12);
- A Licarina apresentou efeito nas linhagens de *B. cepacia* (RX02) e *E. coli* (AV12);
- O C100 apresentou efeito em linhagens de *E. coli* (AV12) e *E. aerogenes* (AV14), mas também apresentou efeito na linhagem de *P. aeruginosa* (RX01);
- O RETRO-4 foi eficiente para as linhagens de *E. coli* (AV12) e *E. aerogenes* (AV14), contudo também apresentou efeito na linhagens de *P. aeruginosa* (RX01) e *B. cepacia* (RX02);
- O mecanismo de ação proposto para o C100 e o C300 é o rompimento da parede celular, no entanto a proteína alvo precisa ser conhecida.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDA, P.N., RANA A., IMRAN M. An updated review: newer quinazoline derivatives under clinical trial. **Int J Pharm Biol Arch.** ;2:1651–1657. 2011.
- ABU-LAIL, N.I.; CAMESANO, T.A. Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 10, p. 2173-2183, 2003.
- ANDRADE S.S., JONES R.N., GALES A.C. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J Antimicrob Chemother.**;52:140-141. 2003.
- ALOUSH, V., NAVON-VENEZIA, S., SEIGMAN-IGRA, Y, CABILI S, CARMELI Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. **Antimicrob Agents Chemother**; 50:43–8. 2006.
- ALTMANN, G., SECHTER, I., CAHAN, D., GERICHTER, C.B. *Citrobacter diversus* isolated from clinical material. **J Clin Microbiol** 3:390–392. 1976.
- ARPIN, C., COZE, C.; ROGUES, A. M.; GACHIE, J. P.; BEBEAR, C.; QUENTIN, C. Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.** 34:2163–2169. 1996.
- AWUAH, E.; CAPRETTA, A. Strategies and synthetic methods directed toward the preparation of libraries of substituted isoquinolines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 16, p. 5627–5634, 2010.
- BACCARO, M.R. MORENO, A. M., CORRÊA, A., FERREIRA, A. J. P., CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.15-18, 2002.
- BARBOSA-FILHO, J.M. Lignanais, neolignanais e seu análogos. In: Claudia Maria Oliveira Simões. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 1ª edição. Porto Alegre: Ed.Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, Cap 22, p.471-488. 1999.
- BASTOS, J.K.; BURANDT, C.L.; NANAYAKKARA, N.P.D.; BRYANT, L.; MCCHESENEY, J.D. Quantification of aryltetralin lignans in plant parts and among different populations of *Podophyllum peltatum* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Nat. Prod.** , 59 (4), 406–408, 1996.
- BAWER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS S.C., TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J Clin Pathol.** 45: 493-496. 1966.
- BHADRA, K. KUMAR, G. S. Therapeutic Potential of Nucleic Acid-binding Isoquinoline Alkaloids: Binding Aspects and Implications for Drug Design. **Medicinal Research Reviews**, v.31, n.6 p.821-862, 2011.

- BERGOGNE-BEREZIN, E., JOLY-GUILLOU, M.L., VIEU, J.F. Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter baumannii*. **J Hosp Infect.** 10: 105–13. 1987.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clin Microbiol Rev**, n. 9, p. 148-65, 1996.
- BLAIR, J.E., LENNETTE, E. H., TRUANT, J. P.: Manual of Clinical Microbiology. **Bethesda: American Society for Microbiology**, pp.184-185. 1970.
- BLONDEL-HILL, E., HENRY, E. A.; SPEERT, D. P. *Pseudomonas*. In Manual of Clinical Microbiology, Washington, 9th edn, pp. 734–748. **American Society for Microbiology**, 2007.
- BRAUNA, C.H.C.; MOTA, S.; SANTOS, A.B. Descoloração reductiva do corante azo RR2 na ausência e presença de mediador redox e acceptor de elétrons nitrato. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro , v. 14, n. 2, p. 275-284, June 2009 .
- BUCHANAN, R. L. The "new" pathogens: an update of selected examples. Assoc. Food Drug Off. Q. Bull. 48:142-155. 1984.
- BURKE, V., M. GRACEY, J. ROBINSON, D. PECK, J. BEAMAN, AND C. BUNDELL. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. **J. Infect. Dis.** 148:68-74. 1983.
- BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathol.** 40, 115–117. 1950.
- BUSH, K., S. K. TANAKA, D. P. BONNER, AND R. B. SYKES. Resistance caused by decreased penetration of b-lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 27: 555–560. 1985.
- CAN, L., HONGXIN, L., LIYUN, Z., WEIMIN, Z., SHENGXIANG, Q., XIAOYUN, Y., HAIBO TAN, Antibacterial neolignans from the leaves of *Melaleuca bracteata*, **In Fitoterapia**, v. 120, p. 171-176. 2017.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T.V. Broth micro dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Microbios.** 82: 181-185. 1995.
- CAVACO, L.M., FRIMODT-MOLLER, N., HASMAN, H., GUARDABASSI, L., NIELSEN, L., AARESTRUP, F.M. Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. **Microb Drug Resist.** 14:163-9. 2008.
- CEZÁRIO, R. C. MYIAMOTO, K. N., NETO, C. H. D. P. W., PULCINELLI, R. S. R., DO CARMO AQUINO, A. R., VIZZOTTO, B. S., & SANTOS, R. C. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. **Enferm Infec Microbiol Clin**, v. 27, n. 5, p. 269-74, 2009.

CHAN, P.; CHENG, J.T.; TSAO, C.W.; NIU, C.S.; HONG, C.Y. The in vitro antioxidant activity of trilinolein and other lipid-related natural substances as measured by enhanced chemiluminescence. **Life Sci.**, 59 (24), 2067-2073, 1996.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável.** 2004.

CHUEH, F.Y.; HSIEH, M.T.; CHEN, C.F.; LIN, M.T. Hypotensive and bradycardic effects of dl-tetrahydropalmatine mediated by decrease in hypothalamic serotonin release in the rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.69, p. 177-180, 1995.

CIÇEK, F.; ÖZER, D., ÖZER, A. Low cost removal of reactive dyes using wheat bran. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, n. 1-2, p. 408-416, 2007.

CORDELL, G. A., QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 183-205, 2001.

COSTA, E.V. MARQUES, F. D. A., PINHEIRO, M. L. B., BRAGA, R. M., DELARMELINA, C., DUARTE, M. C. T., MAIA, B. H. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1111-1117, 2011.

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M. L. B., BARISON, A., CAMPOS, F. R., SALVADOR, M. J., MAIA, B. H. L., EBERLIN, M. N. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1180-1183, 2010.

CRISAN, I. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Rom. J. Virol, Bucureste**, v.46, n.3-4, p.115-33, 1995.

CUNHA, B.A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today**, 34-691-698, 1998.

DAVIN-REGLI, A., D. MONNET, P. SAUX, C. BOSI, R. N. CHARREL, A. BARTHELEMY, AND C. BOLLET. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: 1-year prospective study in two intensive care units. **J. Clin. Microbiol.** 34:1474–1480. 1996.

DECHAMPS, C., D. GUELON, D. JOYON, D. SIROT, M. CHANAL, AND J. SIROT. Treatment of a meningitis due to *Enterobacter aerogenes* producing a depressed cephalosporinase and a *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **Infection.** 19:181–183. 1991.

DEPARDIEU, F., PODGLAJEN, I., LECLERCQ, R., COLLATZ, E., COURVALIN, P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clin Microbiol Rev.**;20:79-114. 2007.

DIJKSHOORN, L., VAN HARSSelaar, B., TJERNBERG, I., BOUVET, P. J. M. & VANEECHOUTTE, M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter gen. sp.* **Syst Appl Microbiol** 21, 33–39, 1998.

DI SALVO, A.S. Antifungal properties of a plant extract. I. Source and spectrum of antimicrobial activity. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 54, n. 2, p.215-219, 1974.

- DONG, H.; LEE, C.-M.; HUANG, W.-L.; PENG, S.-X. Cardiovascular effects of substituted tetrahydroisoquinolines in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.262-268,1992.
- EWING,W. H.,HUGH R.,AND JOHNSON,J.C. Studies on the *Aeromonas* Group. Atlanta, **Communicable Disease Center**, pp. 1-8, 30. 1961.
- FALAGAS, M. E.; KOPTERIDES, P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **J Hosp Infect**, n. 64, p. 7-15, 2006.
- FAOAGALI, J. L., GEORGE, N, LEDITSCHKE, J.F. Antimicrobial effects of melaleuca oil. *Burns* 24: 383, 1998.
- FERRARO, A. P. S. Análises bacteriológicas em lavatórios e pias de salões de beleza. Relatório final (Programa de Iniciação Científica e Tecnológica PIBIC/PIBITI/PIBIC-AF/PIVIC/PIVITI) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.
- FIGUEIREDO-MENDES, C. M. ; SINTO, S., MELLO-SAMPAIO, J. L., CARDOSO-LEÃO, S., OPLUSTIL, C. P., TURNER, P., & VEIGA-KIFFER, C. R. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in brazilian intensive care units. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 23, n. 7, p. 402-5, 2005.
- FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. Niterói/RJ: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2002.
- FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. J. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 306-10, 1995.
- GASTON, M. A. *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. **J. Hosp. Infect.** 11:197–208. 1988.
- GILARDI, G. L., BOTTONE, E., AND BIRNBAUM, M.: Unusual fermentative, gram-negative bacilli isolated from clinical specimens. **Appl. Microbiol.**, 20: 156, 1970.
- GOLDMANN, D. A. & KLINGER, J. D. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **J. Pediatr.** 108, 806–812. 1986.
- GOMES, M. N., MACIEL, R. R., SILVA, J. R., & DE SOUZA, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do *Stryphnodendron barbatiman* contra *Citrobacter freundii*: uma investigação morfológica. 2012.
- GOTTLIEB, O.R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química das neolignanas. **Quím. Nova**, 7 (4), 250-273, 1984.
- GOVAN, J. R., HUGHES, J. E. & VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. **J. Med. Microbiol.** 45, 395–407. 1996.
- GRUNDON, M. F. The Alkaloids. **Royal Society of Chemistry**, 1976.

- GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can Journal Microbiology**, v.36, p.734-746, 1992.
- HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **Am. J. Infect. Control.** 32: 402-408. 2004.
- HAMMER K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Cândida albicans*. **Med. Mycol.**38: 355-362. 2000.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **J. Appl. Microbiol.** 95: 853-860.2003.
- HANSON, N.D; SANDERS, C.C. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. **Curr Pharm Des.** ;5:881-94. 1999.
- HANSON, K. G.; DESAI, A. J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnol Tech.** v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993.
- HEURLIER K, DENERVAUD V, HAAS D. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int JMed Microbiol**; 296:93–102. 2006.
- HIGGINS, C. S., MURTOUGH, S. M., WILLIAMSON, E., HIOM, S. J., PAYNE, D. J., RUSSELL, A. D., WALSH, T. R. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, 7: 308–315, 2001.
- HODGES, G.R., DEGENER, C.E., BARNES, W.G. Clinical significance of citrobacter isolates. **Am J Clin Pathol.** 70:37–40. 1978.
- HUTCHINSON, G. R. PARKER, S., PRYOR, J. A., DUNCAN-SKINGLE, F., HOFFMAN, P. N., HODSON, M. E., PITT, T. L. Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, Gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. **J. Clin. Microbiol.** 34, 584–587. 1996.
- ISLES, A. MACLUSKY, I., COREY, M., GOLD, R., PROBER, C., FLEMING, P., LEVISON, H. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. **J. Pediatr.** 104, 206–210. 1984.
- JACOBY G.A., MUNOZ-PRICE L.S. The new beta-lactamases. **N Engl J Med.** 352:380-91. 2005.
- JAFARI E., KHAJOUEI M.R., HASSANZADEH F., HAKIMELAHI G.H., KHODARAHMI G.A. Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. **Research in Pharmaceutical Sciences.** 11(1):1-14. 2016.
- JARVIS, W. R., AND W. J. MARTONE. Predominant pathogens in hospital infections. **J. Antimicrob. Chemother.** 29:19–24. 1992.
- JAIN, A., ROY, I., GUPTA, M.K., KUMAR, M., AGARWAL, S.K. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing gram negative bacteria in septicæmi neonates in a tertiary care hospital. **J Med Microbiol** ;52:421-5. 2003.

- JOINT, I., DOWNIE, A.J., Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. An introduction *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.362 p. 1115-1117. 2007.
- JONES, S. L.; LINDBERG, F. P.; BROWN, E. J. Phagocytosis. **Fundamental immunology**. 4 th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. p.1011-1015, 2000.
- KAYSER, F.H., BIENZ, K.A., ECKERT, J., ZINKERNAGEL, R.M. Medical Microbiology. Stuttgart: thieme. 2004.
- KIM, Y.K., PAI, H., LEE, H.J., PARK, S.E., CHOI, E.H., KIM, J. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. **Antimicrob Agents Chemother** ;46:1481-91. 2002.
- KOHLER, T., MICHEA-HAMZEHPUR, M., EPP S.F., PECHERE J.C. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrob Agents Chemother**. 43:424-7. 1999.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams ; Wilkins. Baltimore. MD:. 964p. 2v. V. 1, p. 408-516. 1984.
- LANDRY, M. A. PFALLER. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007.
- LAVIGNE, J.P., DEFEZ, C., BOUZIGES, N., MAHAMAT, A., SOTTO, A. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Citrobacter* spp. infections in a French university hospital. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 26:439–441. 2007.
- LESSIE, T. G., HENDRICKSON, W., MANNING, B. D. & DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiol. Lett.** 144, 117–128. 1996.
- LI, G. H., ZHAO, P. J., SHEN, Y. M., & ZHANG, K. Q. Antibacterial activities of neolignans isolated from the seed endotheliums of *Trewia nudiflora*. 2004.
- LIPSKY, B.A., HOOK, E.W. 3RD, SMITH, A.A., FLORDE, J.J. *Citrobacter* infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. **Rev Infect Dis** 2:746–760. 1980.
- LIPUMA, J. J., CURRIE, B. J., LUM, G. D. , VANDAMME, P. A. R. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. In **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed, pp. 749–769.
- LIVERMORE, D.M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**. 8:557-84. 1995.
- LUO, Y., LIU, M., DAI, Y., YAO, X., XIA, Y., CHOU, G.; WANG, Z. Norisoboldine Inhibits the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide Stimulated Cells by Down-Regulating the Activation of MAPKs but Not NF-κB. **Inflammation**, v.33, p. 389-397, 2010.

MAHENTHIRALINGAM, E; URBAN, TA; GOLDBERG, JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**. p. 144-156, 2005.

MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência Tec Alim.**, v. 29, p. 114-119, 2009.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clin Microbiol Rev.** v. 12: p. 147–79. 1999.

MCGOWAN J.E.Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Am J Infect Control**, v. 34 p. 29-S37. 2006.

MENEZES, E. A.; MACEDO, F. V. V.; CUNHA, F. A.; ANDRADE, M. D. S. D. S.; ROCHA, M. V. D. P. Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. v. 36, n. 4, p. 209-12, 2004.

MOHAMED, M.A.; GHANEM, H.M.; ABD EL-GHAFFAR, N.F.; MOHAMED, S.S. Biological evaluation and molecular docking of substituted quinazolinones as antimicrobial agents. **AustJ Basic Appl Sci.** v.7 p.263–274. 2007.

MOHANTY, S.; SINGHAL, R.; SOOD, S.; DHAWAN, B.; KAPIL, A.; DAS, B.K. Citrobacter infections in a tertiary care hospital in Northern India. **J Infect** p. 54:58. 2007.

MONTANARI, C. AL.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, EUA, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NÉRIS, P.L.N.; CALDAS, J. P., RODRIGUES, Y. K., AMORIM, F. M., LEITE, J. A., RODRIGUES-MASCARENHAS, S., & OLIVEIRA, M. R. Neolignan Licarin A presents effect against Leishmania (Leishmania) major associated with immunomodulation in vitro. **Experimental Parasitology**. v.135, p.307–313, 2013.

NICOLETTI, G.; SCHITO, G.; FADDA, G.; BOROS, S.; NICOLOSI, D.; MARCHESE, A., CASSONE, A. Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. **J Chemother**, v.18 p.589-602. 2006.

NIGAM, P.; ARMOUR, G.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; & MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. **Bioresource technology**, v. 72, n. 3, p. 219-226, 2000.

NIKAIDO, H. Outer membrane of *Salmonella typhi-murium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. **Biochim. Biophys. Acta**, v.433 p.118-132. 1976.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antibacterial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.33 p.1831–1836. 1989.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J. Biol. Chem.** v.269 p.3905–3908. 1994.

OIE, S.; KAMIYA, A. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. **Am. J. Infect.** v.24 p.389–395. 1996.

OLIVEIRA, A. C. P., SHINOBU, C. S., LONGHINI, R., FRANCO, S. L., SVIDZINSKI, T. I. E. Antifungal activity of propolis extract against yeast isolated from onychomycosis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.101, n.5, p.493-497, 2006.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577-588, 2007.

PAREDES, A.; HASEGWA, M.; PRIETO, F.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ-ORTEGA, M.; J. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, n. 2, p. 129-132, 2001.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annu. Rev. Phytopathol.** 39, 225–258. 2001.

PEARSON, T. A., MITCHELL, C. A., AND HUGHES, W. T. *Aeromonas hydrophila* septicemia. **Amer. J. Dis. Child.** p.123:579, 1973.

PEPPERELL, C.; KUS, J.V.; GARDAM, M.A.; HUMAR, A.; BURROWS, L.L. Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. **Antimicrob Agents Chemother** v.46 p. 3555–3560. 2002.

PEREIRA, A.C.; MAGALHÃES, L.G.; GONÇALVES, U.O.; LUZ, P.P.; MORAES, A.C.G., RODRIGUES, V., NANAYAKKARA, N.P.D. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (-)-and (+)-enantiomers. **Phytochemistry** v.72,p.1424–30, 2011.

PÉREZ-AMADOR, M. C.; GONZALEZ-ESQUINCA, A.; MORALES, M. C.; TORIZ, F. Oxoaporphine alkaloids in *Guatteria diospyroides* baill. and *Annona squamosa* L. *Phyton*, v. 53, p. 53-55, 2004.

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

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G.A.; Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** 46:1-1, 2002.

PIER, G.B., RAMPHAL, R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; p. 216. 2005.



PITOUT, J. D.; CHRISTINE, M.D.; SANDERS, C. ; EUGENE SANDERS, JR. W. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactamase resistance in gram-negative bacilli. **American Journal Medicine**, v.103, p. 51-9, 1997.

PRASHAR, A. ; HILI, P., VENESS, R. G., EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, New York, v. 63, p. 569-575, 2003.

QUALE J., BRATU S., GUPTA J., LANDMAN D.; Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**. 50:1633-41. 2006.

QUINN, R.J., IRANSHAHI, M. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. **RSC Adv**. 2014.

RABÊLO, W. F. Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*). São Luís, p. 77, 2010.

RABELO, D.M.; PINHEIRO, A.M.L.B., BARISONB, A.; SALOMÉB, K. S.; COSTAC, E.V.; SILVAB, F.M.A.; BASTOS D.I.D.S. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Quím. Nova**, São Paulo , v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia, 4a ed.**, Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 2001.

RAO, A.R.R.; BAHEKAR, R. H., Synthesis, evaluation and structure-activity relationships of 5-alkyl-2, 3-dihydroimidazo [1, 2-c] quinazoline, 2, 3-dihydroimidazo [1, 2-c] quinazolin-5 (6H)-thiones and their oxo-analogues as new potential bronchodilators. **Arzneimittelforschung**. v. 51, n. 04, p. 284-292, 2001.

RIPPEY, S.R.; CABELLI, V.J. Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. **Appl. Environ. Microbiol**. 38:108-113. 1979.

ROBERTS, M. F.; WINK, M. Introduction Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications. **Plenum press**. 1998.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G., MARCHANT, R., & NIGAM, P.; Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.

ROCCO, S. A.; BARBARINI, J. E.; RITTNER, R. Syntheses of some 4-anilinoquinazoline derivatives. **Synthesis**, 429-435. 2004.

RUSSELL, A.D., FURR, J.R., Microbial susceptibility and resistance to biocides. **ASM News**. 63: 481–7. 1997.

SANDERS, C.C., THOMPSON, K.S., BRADFORD. Problems with detection of  $\beta$ -lactam resistance among non-fastidious Gram-negative bacilli. In: Infectious Diseases Clinical of North America: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Philadelphia. **The W.B. Saunders Co.**, p.411-424, 1993.

- SANDERS, C. Detection of extended-spectrum-b-lactamase producing members of the family enterobacteriaceae with the vitek ESBL test. **Journal of Clinical Microbiology**. v.34, n.12, p. 2997-3001, 1997.
- SANTOS, C.D.M., *Staphylococcus sp* e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG : perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. 2006.
- SELVAM, T.P., KUMAR, P.V. Quinazoline Marketed drugs. **A Review. Res Pharm.** v.1 p.1–21. 2011.
- SCHRECKENBERGER, P. C., DANESHVAR, M. I., WEYANT, R. S. & HOLLIS, D. G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed. Washington, DC. p. 770–802. 2007.
- SHAWN, B.; BRADLEY, B.; JOHN, W.F.; Acid stress responses in enterobacteria, **FEMS Microbiology Letters**, v.147 p.173–180. 1997.
- SHOKEEN, P; RAY, K; BALA, M; TANDON, V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. Sexually transmitted diseases, v. 32, n. 2, p. 106–111, 2005.
- SLEIMAN, M. VILDOZO, D., FERRONATO, C., & CHOVELON, J. M. Photocatalytic degradation of azo dye Metanil Yellow: Optimization and kinetic modeling using a chemometric approach. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 77, n. 1-2, p. 1-11, 2007.
- SOUZA, G.H.B.; DA SILVA, A.A.; DE SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.E.; DA SILVA, R.; DONATE, P.M.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-O-acetyl, (-)-O-methyl, (-)-O-dimethyletilamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin.IL **Farmaco**. v.59 p. 55-61, 2004.
- SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas.**Rev. Virtual Quim**. v.4, p.197-207, 2012.
- STANGARLIN, J. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., CRUZ, M. D. S., & NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21. 1999.
- STROMINGER, J. L.; PARK, J. T.; THOMPSON, R. E. Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus*: its relation to the mechanism of action of penicillin. **J. biol. Chem**, v. 234, n. 12, p. 3263-3268, 1959.
- SUSSMAN, M. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. United Kingdom:Cambridge University, 639p. 1997.
- TAFUR, J.D.; TORRES, J.A.; VILLEGAS, M.V.. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. **Infectio**, v. 12, n. 3, 2011.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VON GRAEVENITZ, A.; MENSCH, A. H. The genus *Aeromonias* in human bacteriology. **New Eng. J. Med.**, 278:245,1968.

WANG, D.; GAO, F. Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities. **Chem. Cent. J.** v.7, p.95. 2013.

WALSH TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect** v.11 p.2–9. 2005.

WEISBURGER, J. H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. **Mutation Research**, v.506-507, p.9-20. 2002.

WILLIAMSON, E.C.M., MILLAR, M.R., STEWARD, C.G., CORNISH, J.M., FOOT, A.B., OAKHILL, A. Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. **Br J Haematol** v.104, p.560–8. 1999.

XAVIER, R. Análises microbiológicas do lixo produzido por salões de beleza da Grande João Pessoa. Relatório final (Programa de Iniciação Científica e Tecnológica PIBIC/PIBITI/PIBIC-AF/PIVIC/PIVITI) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

XAVIER, R.; FERREIRA, G.F.; VIANA, A.A.G.; VASCONCELOS, U. Antibiotics susceptibility of bacteria isolated from cosmetics packages. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 28., Florianópolis. Anais...Rio de Janeiro: SBM, 2015, p. R-0057-2. 2015.

Yabuuchi, E. Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Arakawa, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. **Microbiol. Immunol.** v.36, p.1251–1275 .1992.

YU, W.L., LIN, C.W., WANG, D.Y. Clinical and microbiological characteristics of *Ochrobactrum anthropi* bacteraemia. **J Formosan Med Ass.** 2003.