

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Efeito da quercetina sobre alguns fatores relacionados com a
virulência de *Staphylococcus aureus***

Mariana Santoro de Camargo

Araraquara - SP

2008

MARIANA SANTORO DE CAMARGO

**Efeito da quercetina sobre alguns fatores relacionados com a virulência de
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Araraquara - SP

2008

A Deus, acima de tudo.

Aos meus pais, Eliane e Antonio Carlos,
que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.
Obrigado pelo amor, confiança e por tudo que fazem por mim.

Aos meus irmãos Paulo e Gustavo,
E ao meu sobrinho Lucas,
pelos momentos de alegria que me proporcionam.

À Stella, minha orientadora, agradeço pelo constante incentivo,
pela paciência, amizade, confiança, compreensão e sabedoria.
Serei eternamente grata.

Ao Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca,
pela colaboração nesse trabalho, imensa prestatividade,
disponibilidade e sugestões.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto**, agradeço eternamente pela paciência dedicada aos meus primeiros passos na pesquisa, prestatividade e conhecimentos que adquiri durante meu estágio de treinamento.

À **Cibele** pelo auxílio no desenvolvimento experimental e nas interpretações dos meus resultados, pelas sugestões, amizade e prestatividade.

À **Beth** pela ajuda e companhia durante os ensaios de quimiluminescência, amizade e disposição em ajudar.

Ao **Rodrigo** pela grande ajuda com os animais e ensaios, pelos momentos de descontração, amizade e prestatividade.

À **Maria do Carmo** pela colaboração para a realização dos meus experimentos e principalmente pela amizade e apoio.

Ao **Guilherme**, pelo amor, carinho, incentivo, paciência e respeito.

Por sempre me apoiar nos momentos difíceis.

Pela ajuda com as análises estatísticas.

Às amigas **Aline, Liliana e Ana Carolina**, pela companhia durante as disciplinas cursadas e pela amizade.

A **Tatiana**, pela grande amizade e palavras de conforto nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

A **Tirene e Eliana**, pela simpatia e disposição em ajudar sempre.

A **Cláudia, Laura e Sônia**, pela prestatividade, atenção e simpatia.

À **todos os** funcionários e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica.

À **Capex** pela concessão de bolsa e outros auxílios.

RESUMO

Esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da concentração sub-inibitória de quercetina sobre alguns fatores relacionados à virulência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A atividade antibacteriana foi determinada através do método de microdiluição em caldo e a concentração de 40µg/mL de quercetina foi utilizada como sub-inibitória. O sobrenadante de culturas de *S. aureus* em BHI contendo quercetina diminuiu a atividade hemolítica para hemácias de carneiro mas não alterou a atividade de citolisinas extracelulares para células de linhagem contínua (células McCoy B ATCC 1696) quando comparado com o sobrenadante da cultura na ausência do flavonol. O efeito da quercetina na fagocitose do *S. aureus* por polimorfonucleares neutrófilos (PMN) foi determinado através de técnica quimiluminescente. O burst oxidativo de PMN foi estatisticamente significativo para bactérias tratadas em relação às não tratadas, demonstrando que *S. aureus* crescidos na presença de quercetina tornam-se menos susceptíveis à fagocitose. A inibição da expressão de fatores relacionados à adesão bacteriana foi evidenciada através dos experimentos de fagocitose/adesão em microscopia óptica (1.000x). Mesmo que a quercetina, abaixo da concentração inibitória, tenha pouco efeito sobre a viabilidade de *S. aureus*, o conhecimento de que esse flavonol é capaz de alterar a adesão de estafilococos à superfície celular parece ser atrativo para a sua utilização como profilático em processos infecciosos, visto que a adesão é o primeiro passo na patogênese da infecção bacteriana. Entretanto, deve-se considerar sua interferência com a atividade de células fagocíticas, uma importante função do sistema imune do hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVES: quercetina, concentração sub-inibitória, *Staphylococcus aureus*, fatores de virulência.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of quercetin at sub-inhibitory concentration on some *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) factors related to the virulence. The antibacterial activity of quercetin was evaluated by broth microdilution method and the concentration of 40 µg/mL was used as sub- inhibitory. *S. aureus* BHI culture supernatant containing quercetin reduced the hemolytic activity for sheep erythrocytes but did not exhibit a detectable change in cytolysin extracellular activity on continuous cell lines (McCoy B cells ATCC 1696) when compared with quercetin-free medium. The effect of quercetin-grown staphylococci phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils (PMN) was compared with the effect on non-treated bacteria by chemiluminescence assay. The level of oxidative burst of PMN was statistically different in untreated versus quercetin-treated bacteria showing that drug-grown cells became less susceptible to phagocytic uptake. The inhibition of expression of factors related bacterial adhesion was established through adhesion/phagocytosis experiments by optical microscopy (1.000x). Even if quercetin at low level has little effect on *S. aureus* viability, the knowledge that this flavonol is able to affect the properties of staphylococci adherence to cell surfaces may be an attractive advance for its applications as prophylactic in infectious process, considering that bacterial adherence is the initial event in the pathogenesis of bacterial infection. Conversely, it also interferes with the activities of phagocytic cells, an important function of host immune system.

KEY-WORDS: quercetin, sub-inhibitory concentration, *Staphylococcus aureus*, virulence factors.

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA - análise de varincia

BHI (brain heart infusion) - caldo infuso crebro e corao

CIM - concentrao inibitória mínima

Sub-CIM - concentrao sub-inibitória

ERNs - espécies reativas de nitrogênio

EROs - espécies reativas de oxignio

IC₅₀ - ndice citotóxico

ICE - integral da cinética de emissão

IME - intensidade máxima de emissão

PMN - polimorfonuclear neutrófilo

QL - quimiluminescência

PBS - soluço salina tamponada com fosfato

PBSD - soluço salina tamponada com fosfato Dulbecco

UDO – unidade de densidade ptica

Δ QL - variao de quimiluminescência

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da quercetina	14
FIGURA 2	Efeito de diferentes concentrações de quercetina na inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
FIGURA 3	Relação dose-efeito de quercetina sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
FIGURA 4	Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
FIGURA 5	Comparação da atividade hemolítica do sobrenadante da cultura de <i>S. aureus</i> crescidos na ausência (controle) e presença da concentração sub-inibitória de quercetina (teste)	31
FIGURA 6	Relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> na ausência e presença da concentração sub-inibitória de quercetina	33
FIGURA 7	Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMN/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> (controle); PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> tratado (teste); PMN/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos opsonizados	34

FIGURA 8	Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMN/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> (controle); PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> (teste); PMN/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos não opsonizados.....	34
FIGURA 9	Micrografia de esfregaço de PMN apresentando células de <i>S. aureus</i> fagocitadas/aderidas, coradas por Leishman	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Atividade de hemolisinas extracelulares para hemácias de carneiro do sobrenadante de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> crescido na ausência e presença da concentração sub-inibitória de quercetina	32
TABELA 2	Variação da quimiluminescência (ΔQL) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/ <i>S.aureus</i> na presença (teste) e ausência (controle) da concentração sub-inibitória de quercetina.....	35
TABELA 3	Variação da quimiluminescência (ΔQL) para para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/ <i>S. aureus</i> na presença (teste) e ausência (controle) da concentração sub-inibitória de quercetina	35
TABELA 4	Médias do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN determinadas através de microscopia óptica	36

SUMÁRIO

	Página
I - INTRODUÇÃO	13
II - OBJETIVO	19
III - MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Procedência de meios e reagentes	20
2. Microrganismo	20
3. Animais	20
4. Linhagem celular	21
5. Preparo da solução de quercetina	21
6. Avaliação da atividade antibacteriana da quercetina sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	21
7. Avaliação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina no crescimento de <i>S. aureus</i>	22
8. Determinação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina em hemolisinas extracelulares de <i>S. aureus</i>	23
9. Determinação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na indução de citolisinas de <i>S.aureus</i>	23
10. Determinação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na fagocitose de <i>S. aureus</i>	24
10.1. Indução de exsudato celular para obtenção de PMN de rato	24
10.2. Separação e quantificação de PMN por gradiente de densidade	24
10.3. Avaliação da viabilidade dos PMN durante o tempo do ensaio	25
10.4. Preparo da suspensão bacteriana	25
10.5. Ensaio quimiluminescente	26
10.6. Ensaio de adesão/fagocitose por microscopia óptica em lâmina	27
11. Análise estatística	28
IV - RESULTADOS	
1. Atividade antibacteriana da quercetina para <i>Staphylococcus aureus</i>	29
2. Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	30

3.	Atividade de hemolisinas de <i>S. aureus</i> crescidos em concentração sub-inibitória de quercetina	31
4.	Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na indução de citolisinas de <i>S. aureus</i>	32
5.	Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na fagocitose de <i>S. aureus</i>	33
6-	Avaliação da adesão/fagocitose através de microscopia óptica em lâmina	36
V -	DISCUSSÃO	37
VI -	CONCLUSÃO	43
VII -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
VIII -	Parecer nº 02/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa	53

I – INTRODUÇÃO

Os flavonóides são compostos polifenólicos de ampla distribuição no reino vegetal, sendo de grande importância para o crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas. Essa ampla classe de substâncias é resultante do metabolismo secundário, biossintetizada a partir da via dos fenilpropanóides (ZUANAZZI, 1999) e encontrada em frutos, sementes, flores (MOJZISOVÁ, KUČHTA, 2001; CHUN, CHUNG, SONG, 2007), própolis e mel (GRANGE, DAVEY, 1990), representando um constituinte comum da dieta humana (MOJZISOVÁ, KUČHTA, 2001).

Essa classe de compostos é formada pela união de três anéis, dois deles aromáticos (A e B) e um heterocíclico (C). Os flavonóides são agrupados em classes dependendo da substituição e do nível de oxidação em flavona, flavonol, flavanona, isoflavona, chalcona, aurona, entre outras (ZUANAZZI, 1999). Até 1994, mais de 4000 compostos desse tipo já haviam sido descritos, conforme citado por YUNES e CECHINEL FILHO (2007).

Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas aos flavonóides destacam-se a antioxidante, antiespasmódica, antiinflamatória e antialérgica (HARBORNE, WILLIAMS, 2000). Essas substâncias têm sido relatadas como inibidoras da aterosclerose no estágio inicial, além de possuírem atividade hipolipêmica (JUZWIAK et al., 2005). Dentre os flavonóis, a quercetina (5,7,3',4'-tetra-OH) (Figura 1) é uma aglicona que está presente em diversos alimentos, como alho, cebola, alface, brócolis, maçã, azeitona, uva, entre outros, e exerce múltiplas atividades farmacológicas (SKIBOLA, SMITH, 2000; MOON, 2008).

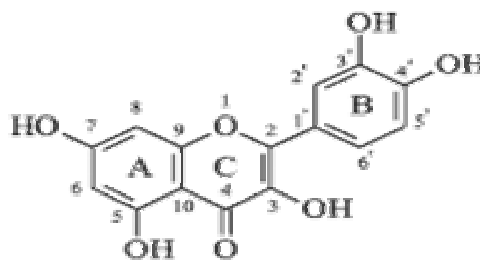


Figura 1 – Estrutura química da quercetina

O consumo diário da quercetina pode estar associado à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, desenvolvimento de tumores, derrames cerebrais e doenças neurodegenerativas (PEDRESCHI, CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; RATNAN et al., 2006) que são justificados pela proteção contra danos oxidativos ao DNA (FAROMBI, 2006), peroxidação lipídica (LIMA, FERNANDES-FERREIRA, PEREIRA-WILSON, 2006; YEOMANS, LINSEISEN, WOLFRAM, 2005) e inibição da liberação de mediadores da inflamação (CHO et al., 2003; MAMANI-MATSUDA et al., 2006). Embora possua diversos efeitos benéficos à saúde humana, a quercetina demonstra atividades citotóxica (SOARES, VARANDA, RADDI, 2006) e mutagênica (GASPAR et al., 1994) *in vitro*.

O potencial antimicrobiano dos flavonóides vem sendo documentado na literatura. A galangina, flavonóide comumente encontrado na própolis, demonstrou atividade inibitória para *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* (AFOLAYAN, MEYER, 1997). Estudos *in vitro* evidenciaram que o flavonóide baicaleina inibe a infecção e replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LI et al., 2000).

Quercetina, rutina, morina, leucocianidina, catequina, entre outros flavonóides, possuem atividade contra vários tipos de vírus (CUSHNIE, LAMB, 2005).

Própolis, mistura complexa que contém altas concentrações de flavonóides, é citada como detentora de atividade antibacteriana (GRANGE, DAVEY, 1990). Estudos *in vivo* demonstraram que a administração oral de quercetina protege animais de laboratório contra infecção induzida por *Shigella* (VIJAYA, ANANTHAN, 1996) e, mais recentemente, que a administração intraperitoneal de uma isoflavona (sophoraisoflavone A) induz proteção contra *Salmonella typhimurium* em ratos (DASTIDAR et al, 2004).

Staphylococcus aureus continua sendo um importante patógeno, tanto em infecções comunitárias quanto hospitalares, apesar de ser um microrganismo comensal da pele e mucosas. Quando as barreiras mucocutâneas são quebradas ou quando a imunidade do hospedeiro está comprometida, essa bactéria tem a capacidade de invadir tecidos e disseminar-se através da corrente sanguínea (MENZIES, KOURTEVA, 2000).

Estratégias complexas são utilizadas pelos microrganismos para exercerem sua patogenicidade, amplamente denominadas de fatores de virulência, as quais estão associadas a diferentes funções. Apesar dos fatores de virulência serem, na maioria das vezes, alvo isolado em estudos de patogenicidade, deve-se considerar a complexa interação patógeno-hospedeiro.

Uma variedade de exotoxinas direcionadas ao metabolismo da célula hospedeira, sintetizada por *S. aureus*, tem potencial imediato de agressão. Dentre essas toxinas, a α -hemolisina é uma toxina formadora de poro com atividade citolítica, hemolítica e propriedades tóxicas (DINGES, ORWIN, SCHLIEVERT, 2000). *S. aureus* também produz outras toxinas, incluindo diferentes hemolisinas (β , γ e δ) e várias toxinas danificadoras de membrana que atuam em células alvo rompendo as barreiras de

permeabilidade celular através da formação de poros ou ação detergente (GEMMELL, FORD, 2002; van BELKUM, KOOL-SIJMONS, VERBRUGH, 2002). Os poros transmembrana resultam no extravasamento de moléculas de baixo peso molecular do citosol, levando a morte celular (BHAKDI, TRANUM-JENSES, 1991, WARD, LEONARD, 1992).

Vários desses mecanismos específicos de virulência são ativados após a ligação da bactéria à superfície da célula hospedeira, favorecida por adesinas, fatores designados indiretos de virulência. A adesão, processo que envolve várias etapas, está relacionada com a presença de estruturas e moléculas específicas na superfície bacteriana que promovem uma ligação irreversível na célula hospedeira. Cápsula, pili, proteínas ligadas a fibronectina e proteína A estão incluídos entre esses fatores, cuja função primária encontra-se associada ao processo de adesão. A expressão dessas e de outras adesinas é intimamente influenciada por estímulos externos (van BELKUM, KOOL-SIJMONS, VERBRUGH, 2002).

Nas últimas décadas foram frequentes os relatos sobre a influência de diversos grupos de substâncias químicas na estrutura e metabolismo dos microrganismos. Essas substâncias, quando em concentração ou tempo insuficiente para causar morte ou inibição total do crescimento, causam modificações nas propriedades bacterianas que podem refletir em alterações de componentes somáticos e produtos extracelulares (WU et al., 1995; HOWARD, PINNEY, SMITH 1993; GALICE et al., 2006).

É reconhecido que antimicrobianos, em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima, são capazes de alterar a morfologia e taxa de crescimento do microrganismo, expressão, produção e/ou liberação de enzimas e toxinas, bem como outros fatores de virulência (BERNARDO et al, 2004). Tais alterações podem afetar, diretamente, interações entre bactérias e células do hospedeiro, principalmente no que

diz respeito aos fenômenos de adesão e fagocitose, demonstrando que várias estruturas somáticas estão envolvidas nesses processos (GEMMEL, FORD, 2002).

O efeito de alguns flavonóides na inibição de sortases de *Staphylococcus aureus*, enzimas que modulam a capacidade de adesão da bactéria no tecido do hospedeiro e outras proteínas associadas à virulência, foi recentemente demonstrado (KANG et al., 2006).

A fagocitose é uma das estratégias defensivas mais importantes na destruição de microrganismos invasores, onde polimorfonucleares neutrófilos (PMN) ou macrófagos atuam como mecanismo protetor capaz de responder contra microrganismos que conseguem penetrar no hospedeiro (MIMS et al., 1999). Receptores específicos são encontrados na membrana dessas células e a ligação fator quimiotático/receptor pode iniciar uma série de eventos celulares e bioquímicos, incluindo alterações no potencial de membrana e fluxo de íons, rearranjo do citoesqueleto, secreção do conteúdo de grânulos citoplasmáticos e indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (BORUTAITE, BROWN, 2001; FORMAN, TORRES, 2001). Essas espécies reativas, possuidoras de importantes atividades biológicas, são tóxicas para alvos intra e extracelulares, tanto em procariotos como em eucariotos, e sua excessiva produção pode acarretar injúria celular (RAMASARMA, 1990).

Uma variedade de técnicas é utilizada para avaliar a função fagocítica de PMN, dentre elas: redução do sal tetrazólio, citometria de fluxo e ensaios que medem e quantificam emissão de luz (STITES, 1994). Essas técnicas evoluíram de maneira bastante expressiva nas últimas décadas e o aumento da sensibilidade e especificidade vêm permitindo avaliar alterações em funções celulares e bacterianas. Métodos envolvendo reações quimiluminescentes são utilizados na determinação de atividades

enzimáticas e no monitoramento do processo fagocitário (GALICE et al., 2006; DAHLGREN, KARLSSON, BYLUND, 2007).

Durante a fagocitose, após a perturbação da membrana plasmática e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase e outras enzimas, o *burst* respiratório ou oxidativo é iniciado e uma série de EROs e ERNs são produzidas (HAMPTON KETTLE, WINTERBOURN, 1998; PASMANS et al., 2001). A produção dessas espécies reativas é acompanhada da emissão de luz de baixa intensidade. A utilização de sondas quimiluminescentes, como o luminol, aumenta a sensibilidade da reação, pois são capazes de amplificar a quimiluminescência propiciando a detecção de baixos níveis de emissão de luz (STITES, 1994). A luz emitida durante a quimiluminescência dependente de luminol é diretamente proporcional à quantidade de espécies reativas produzidas (LINCOLN et al., 1995).

Em decorrência da necessidade de novas opções terapêuticas, ênfase no estudo da atividade antimicrobiana de flavonóides teve destaque nos últimos anos. Assim, consideramos importante avaliar as alterações induzidas pela quercetina em alguns fatores relacionados à virulência de *S. aureus* visando oferecer subsídios para o emprego desse flavonol como antibacteriano na clínica médica.

II – OBJETIVO

Em decorrência dos efeitos benéficos e potencial antimicrobiano dos flavonóides, esse trabalho visou avaliar a capacidade da concentração sub-inibitória de quercetina em modular alguns fatores relacionados com a virulência de *S. aureus*:

- a) Crescimento bacteriano
- b) Atividade de hemolisinas
- c) Expressão de citolisinas
- d) Interação com PMN

III - MATERIAL E MÉTODOS

1- Procedência de meios e reagentes

Sigma-Aldrich: Quercetin dihydrate (No. Q0125), Glycogen from oyster (No. G8751), Neutral Red (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) (No. N4638), Luminol sodium salt (No. A4685), Zimosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (No. Z4250)

Acumedia Manufactures, Inc.: Brain-Heart Infusion Broth (7116) (BHI)

Cultilab: Hemácias de carneiro, Soro fetal bovino

Difco: Mueller-Hinton Broth (211443)

Pharmacia Biotech: Histopaque densidade 1077 (cod. 17-1440-02)

Instituto Adolfo Lutz: Meio Eagle, Solução de tripsina-EDTA-versene

Mallinckrodt: Dimethyl Sulfoxide (DMSO, lote B24H34)

2- Microrganismo

Staphylococcus aureus (ATCC 25923), cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Manginhos, RJ, Brasil, foram conservados a - 20° C em sangue de carneiro.

3 - Animais

Ratos tipo *Rattus albinus norvegicus* (macho, 150-200g), fornecidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, foram mantidos em biotério climatizado ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ de umidade, 10-18 circulações/hora e ciclo claridade/escuro de 12 h), com água e ração *ad libitum*. O projeto recebeu parecer

favorável à sua execução pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara – UNESP (nº 02/2007).

4 - Linhagem celular

Células McCoy (ATCC 1696), adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, foram mantidas em meio Eagle (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) adicionado de 7,5% de soro fetal bovino (Cutilab, Campinas, SP, Brasil).

5 - Preparo da solução de quercetina

Quercetina foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10mg/mL para utilização em cada experimento. A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 4%, por não interferir no crescimento bacteriano (DEVIIENNE, 2000).

6 - Avaliação da atividade antibacteriana da quercetina sobre *Staphylococcus aureus*

A atividade da quercetina sobre o crescimento bacteriano foi determinada utilizando-se o método espectrofotométrico de microdiluição (DEVIIENNE e RADDI, 2002). O microrganismo foi, inicialmente, cultivado em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%, as quais foram incubadas por 20-24 horas a 35-37°C. Posteriormente, três colônias foram transferidas para caldo Mueller-Hinton, incubado a 35-37°C até obtenção de crescimento em fase exponencial, correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (0,08 – 0,10 UDO em 620 nm). Orifícios de microplacas foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller-Hinton contendo concentrações do flavonóide variando de 0,46 a 120µg/mL e 100 µL da suspensão bacteriana. A inibição do crescimento foi determinada através da diferença da absorvância em 620 nm

(espectrofotômetro multicanal Spectra (Shell) & Rainbow (Shell) Readers da Tecan Austria Ges.m.b.H) obtida antes e após incubação da placa por 24 horas, a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes. Para o controle do crescimento, a 100µL da suspensão bacteriana foi adicionado o mesmo volume do caldo sem o flavonóide. Os resultados foram utilizados para a determinação da concentração sub-inibitória empregada nos testes propostos.

7 - Avaliação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina no crescimento de *S. aureus*

O efeito da quercetina sobre o crescimento bacteriano seguiu metodologia proposta por TESSIER, NIGHTINGALE, NICOLAU (2000). O microrganismo foi, inicialmente, cultivado em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%, as quais foram incubadas por 20-24 horas a 35-37°C. Posteriormente, três colônias foram transferidas para caldo infusão cérebro e coração (BHI) para obtenção de cultura em fase exponencial de crescimento. A suspensão bacteriana foi inoculada em tubos contendo caldo BHI com concentração sub-inibitória de quercetina e incubada por 20-24 horas a 35-37°C. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos, as células bacterianas lavadas por 3 vezes em solução salina tamponada (PBS, pH 7,2), resuspendidas em caldo BHI e padronizadas a $UDO_{620} = 0,10$. Duzentos e cinquenta microlitros (250 µL) de cada suspensão foram transferidos para orifícios de microplaca, a qual foi incubada a 35-37°C. Leituras espectrofotométricas, em mesmo comprimento de onda, foram realizadas de 30 em 30 minutos, por um período de 8 horas. Os experimentos foram acompanhados de crescimento controle, isto é, bactéria cultivada na ausência da substância teste. Os dados foram analisados, comparativamente, através da relação direta entre absorvância e tempo de incubação.

8 - Determinação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina em hemolisinas extracelulares de *S. aureus*

A atividade hemolítica do sobrenadante de cultura de *S. aureus* foi avaliada segundo metodologia descrita por SMITH-PALMER, STEWART e FYFE (2004), com algumas modificações. Cultura de *S. aureus* com turvação correspondente a 0,5 de McFarland foi transferida para caldo BHI na ausência e presença da concentração sub-inibitória de quercetina. Os tubos foram incubados por 20-24 horas a 35-37°C, padronizados em mesma absorvância (620 nm) com caldo BHI e centrifugados a 300 x g, por 15 minutos. A 2 mL do sobrenadante filtrado foi adicionado 1 mL de suspensão de hemácias de carneiro a 1% em PBS, pH 7,2. Como controle de ausência de hemólise e hemólise total, o mesmo volume da suspensão bacteriana foi substituído por tampão fosfato e água destilada, respectivamente. Após incubação a 37°C, por 45 minutos, os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram, cuidadosamente, transferidos para orifícios de microplaca (96 orifícios) para leitura das absorvâncias a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise em relação ao controle de hemólise total (100%).

9 - Determinação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na indução de citolisinas de *S. aureus*

Células McCoy B foram mantidas em meio Eagle, adicionado de 7,5% de soro fetal bovino. Após tripsinização (2 mL de tripsina) as células foram contadas em câmara de Neubauer e 200 µL desse meio contendo, aproximadamente, 10^4 - 10^5 células/mL foram inoculados em orifícios de microplacas para cultura de tecido (96 orifícios), as quais foram incubadas a 35-37°C. Após 20-24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com 200 µL do sobrenadante da cultura de *S. aureus* em concentrações

que variaram de 1,56 a 50%, diluído em meio Eagle, conforme descrito no item 8. As placas foram reincubadas por 24 horas, reveladas pela técnica do vermelho neutro e submetidas à leitura espectrofotométrica em 540 nm e filtro de referência 620 nm (BORENFREUND, PUERNER, 1985). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo três vezes, acompanhados de crescimento celular controle. O índice citotóxico (IC₅₀) dos sobrenadantes, concentração que diminui em 50% a viabilidade celular, foi determinado através da equação da reta de regressão (LAPPONI, 1997).

10 - Determinação do efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na fagocitose de *S. aureus*

10.1 - Indução de exsudato celular para obtenção de PMN de rato

Dez mL de uma solução de glicogênio de ostra a 0,5% (p/v) em NaCl a 0,85% (p/v) foram injetados, via intraperitoneal, em rato macho (*Rattus albinus norvegicus*) com peso médio de 200 g. Após 12 horas, o animal foi sacrificado (câmara de CO₂) e a cavidade abdominal lavada com 20 mL de tampão PBS-Dulbecco (PBS-D), contendo 10 UI heparina/mL. O lavado foi coletado por sucção, com seringa e agulha, transferido para tubo cônico siliconizado e centrifugado a 200 x g, por 3 minutos. Após 2 lavagens com tampão PBS-D sem cálcio, foi realizada a separação dos PMN.

10.2 – Separação e quantificação de PMN por gradiente de densidade

Em tubos siliconizados cônicos, com capacidade para 15 mL, foram adicionados 5 mL de histopaque e, vagarosamente, o mesmo volume da suspensão celular foi adicionado. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 700 x g, o sedimento lavado 2 vezes em tampão PBS-D sem cálcio e ressuspensionado no mesmo

tampão para obtenção de suspensão contendo 2×10^6 células/mL (contagem realizada em câmara de Neubauer), o qual foi mantido em banho de gelo durante os experimentos. A eficácia da separação foi verificada através da contagem diferencial das células, em esfregaços obtidos em citocentrífuga (FANEN) após coloração pelo método de Leishman, através da observação de 500 células por preparação, em microscópio óptico comum (1.000x). Suspensões contendo, no mínimo, 90% do tipo celular desejado foram utilizadas nos ensaios.

10.3 – Avaliação da viabilidade dos PMN durante o tempo do ensaio

A viabilidade de PMN, durante o período da reação, foi determinada utilizando a técnica colorimétrica do vermelho neutro (BORENFREUND, PUERNER, 1985). Tampão PBS-D (100 μ L), contendo aproximadamente 6×10^6 células/mL, foi distribuído em orifícios de microplaca para cultura de tecido, sobre os quais foram adicionados 200 μ L de solução de vermelho neutro (1 mg/mL em PBS-D) no tempo inicial (t=0) e final (t=60') da reação quimiluminescente. Após incubação por 3 horas, a 35-37°C em estufa de CO₂ (5-10%), o sobrenadante foi desprezado e as células tratadas conforme descrito para o teste do vermelho neutro. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro multicanal, em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm. Os testes foram realizados em triplicata e acompanharam todos os ensaios.

10.4 - Preparo da suspensão bacteriana

O microrganismo foi, inicialmente, cultivado em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5%, as quais foram incubadas por 20-24 horas a 35-37°C. Posteriormente, cerca de 2-3 colônias foram repicadas para caldo BHI, incubado a 35-37°C até obtenção de crescimento em fase exponencial e transferido para caldo BHI na concentração sub-

inibitória de quercetina (teste). Após incubação por 24 horas, o crescimento bacteriano foi centrifugado (300 x g, 15 min), lavado 3 vezes com PBS sem cálcio e ressuspenso no mesmo tampão. Suspensão bacteriana de 0,3 unidade de densidade óptica (UDO) foi utilizada por fornecer maior magnitude da emissão de luz (KITAGAWA, 2004). Para realização de experimentos com *S. aureus* opsonizado, soro do animal doador de PMN foi adicionado à suspensão bacteriana a 0,6 UDO (v/v) e incubada por 30 minutos. O experimento foi acompanhado de cultura bacteriana na ausência da quercetina (controle).

10.5 - Ensaio quimiluminescente

Os ensaios quimiluminescentes foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca. As reações seguiram recomendações descritas por SILVA (2000), realizadas em luminômetro BioOrbit modelo 1251, dotado de dispensadores automatizados. O aparelho está interfaceado a um microcomputador e os resultados foram processados através do software Multiuse versão 2.0. Em tubo de reação, após 10 minutos de incubação, o estímulo foi adicionado (t=0) obtendo-se volume final de 1 mL. O tempo da reação foi de 60 minutos. Os estímulos utilizados foram: zymosan (700 µg/mL), suspensão bacteriana (opsonizada e não opsonizada) incubada na presença (teste) e ausência (controle) da concentração sub-inibitória de quercetina. O sistema PMN/luminol/PBS sem a adição do estímulo foi definido como a linha de base. As reações foram realizadas à 37°C, monitoradas por 60 minutos, obedecendo ao seguinte protocolo geral:

- a) tampão PBS pH 7,4;
- b) suspensão celular (PMN 2×10^6 células/mL);
- c) sonda quimiluminescente luminol (2×10^{-5} M);

- d) estímulos (*S. aureus* 0,3 UDO e zymosan 1 mg/mL);
- e) volume final da reação 1 mL.

Para realização do ensaio, foram adicionados aos tubos de reação: tampão PBS, suspensão celular e sonda quimiluminescente. Posteriormente, os tubos foram posicionados na câmara de leitura do luminômetro e a reação disparada através da adição dos estímulos imunológicos, utilizando dispensador externo. O pico máximo de emissão de luz e o valor da integral foram calculados para todas as curvas geradas.

A variação da quimiluminescência (ΔQL) expressou a intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE), após correção com a linha de base (células sem estímulo), representada da seguinte forma:

$$\Delta QL_{\text{Máxima}} = \text{IME das células estimuladas} - \text{IME das células sem estímulo}$$

$$\Delta QL_{\text{Cinética}} = \text{ICE das células estimuladas} - \text{ICE das células sem estímulo}$$

10.6 – Ensaio de adesão/fagocitose por microscopia óptica em lâmina

A influência da concentração sub-inibitória de quercetina na adesão/fagocitose de *S. aureus* por PMN seguiu metodologia proposta por PESSOA e DIAS (1987) com algumas modificações. Resumidamente, suspensão de PMN (2×10^6 células/mL) e *S. aureus* (item 10.4) foi incubada por 10 minutos na proporção de 50 bactérias por célula, e, em seguida, lavada 2 vezes em PBS. Esfregaços foram realizados em citocentrífuga (FANEN) e, após secagem, corados pelo corante de Leishman. Para 100 PMN observados em microscopia óptica por experimento, o número médio de bactérias fagocitadas/aderidas foi calculado. Os resultados do teste e controle foram analisados comparativamente.

11 - Análise estatística

A interpretação dos resultados obtidos nos ensaios foi realizada através de análise de variância (ANOVA), sendo 0,05 o nível de significância (LAPPONI, 1997).

IV – RESULTADOS

1 - Atividade antibacteriana da quercetina para *Staphylococcus aureus*

A quercetina não apresentou concentração inibitória mínima (CIM) na maior concentração testada (120 $\mu\text{g/mL}$), visto que a partir de 60 $\mu\text{g/mL}$ não ocorreu diminuição na absorvância, sendo a inibição do crescimento mantida em 30% em relação ao controle (Figura 2). Através da análise de regressão linear (Figura 3), definimos a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ para a realização dos experimentos propostos, que representa a concentração do flavonóide que inibiu 50% o crescimento bacteriano e definida nesse trabalho como sub-inibitória.

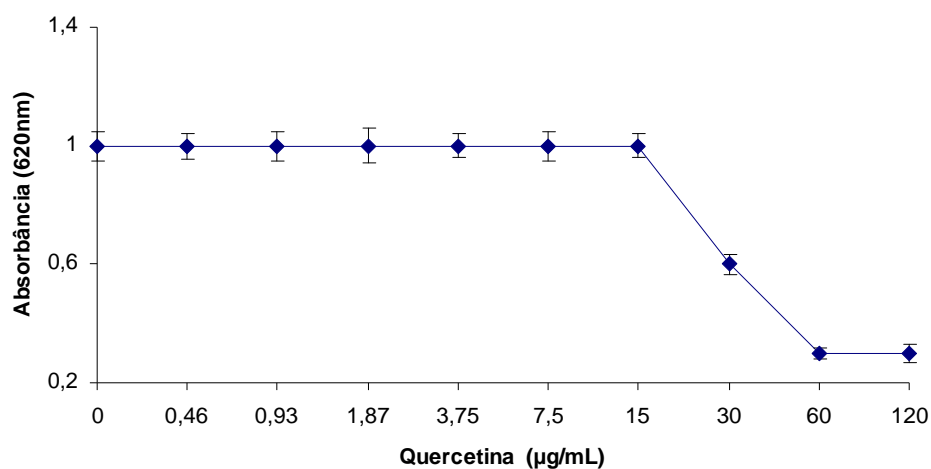


Figura 2 – Efeito de diferentes concentrações de quercetina na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*

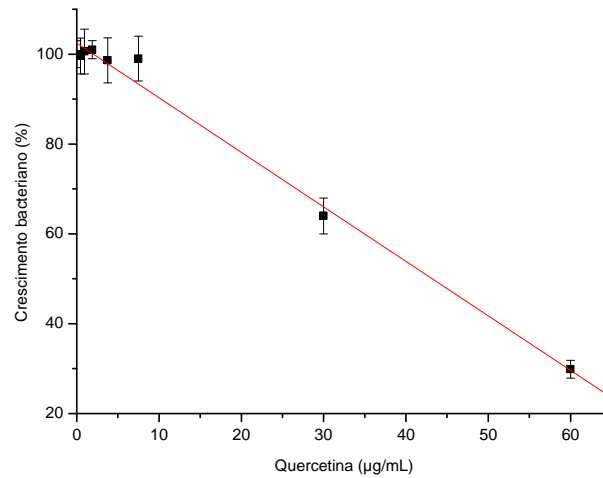


Figura 3 – Relação dose-efeito de quercetina sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*

2 - Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina sobre o crescimento de *S. aureus*

A Figura 4 apresenta a curva de crescimento de *S. aureus*, por um período de 8 horas, após exposição à concentração sub-inibitória de quercetina. Não houve diferença significativa entre os valores de absorvância da cultura teste e controle ($p=0,215939$).

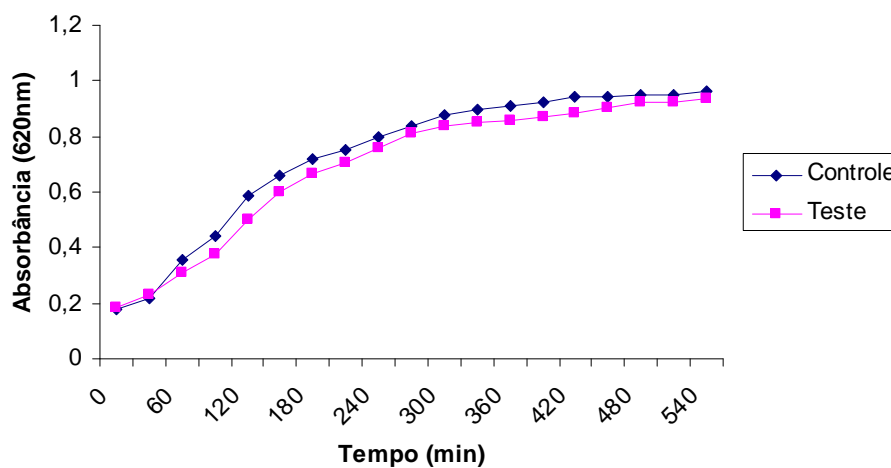


Figura 4 – Efeito da concentração sub-inibitória (40 µg/mL) de quercetina no crescimento de *Staphylococcus aureus*

3 - Atividade de hemolisinas de *S. aureus* crescidos na presença de concentração sub-inibitória de quercetina

A Figura 5 compara a atividade de hemolisinas do sobrenadante da cultura de *S. aureus* crescidos na ausência e presença da concentração sub-inibitória de quercetina. Os dados evidenciam que a quercetina, na concentração de 40 µg/mL, diminuiu a atividade de hemolisinas extracelulares demonstrada através da metodologia utilizada (Tabela 1). BHI e BHI adicionado da concentração sub-inibitória de quercetina não apresentaram atividade hemolítica (dados não apresentados).

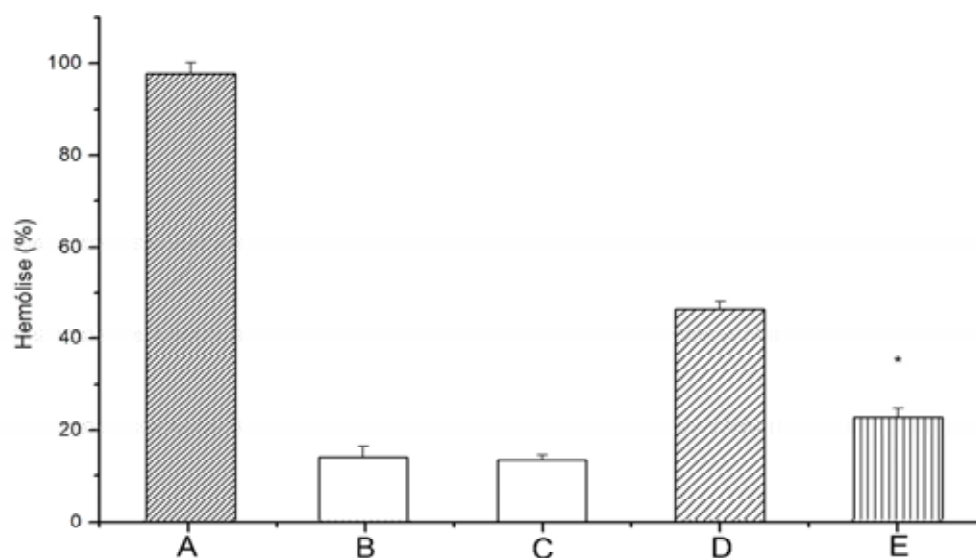


Figura 5 – Atividade hemolítica para hemácias de carneiro: (A) Controle de hemólise total, (B) Controle de ausência de hemólise, (C) Controle de hemólise da quercetina (40µg/mL), (D) Hemólise do sobrenadante da cultura de *S. aureus* na ausência de quercetina, (E) Hemólise do sobrenadante da cultura de *S. aureus* na presença da concentração sub-inibitória de quercetina (40µg/mL) (*p<0,05).

Tabela 1 - Atividade de hemolisinas extracelulares para hemácias de carneiro do sobrenadante de cultura de *Staphylococcus aureus* crescido na ausência e presença da concentração sub-inibitória de quercetina

	Atividade de hemolisinas (absorbância em 540 nm) ¹				valor-P ²
	Controle da Reação		Sobrenadante da cultura		
	Ausência	Hemólise Total	Controle	Teste	
<i>S. aureus</i>	0,063 ± 0,012	0,429 ± 0,007	0,203 ± 0,010	0,101 ± 0,011	0,025770

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão

² Em relação ao sobrenadante de cultura bacteriana na ausência (controle) e presença de quercetina (teste)

4 - Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na indução de citolisinas de *S. aureus*

A relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy dos sobrenadantes das culturas de *S. aureus* na presença e ausência da concentração sub-inibitória de quercetina é apresentada na Figura 6. O sobrenadante da cultura de *S. aureus* expostos à concentração sub-inibitória de quercetina não demonstrou diferença significativa de citotoxicidade em relação ao sobrenadante da cultura na ausência de quercetina, sendo a média dos IC₅₀ de 40,16 ± 1,78% e 44,93 ± 2,47% para o teste e controle, respectivamente.

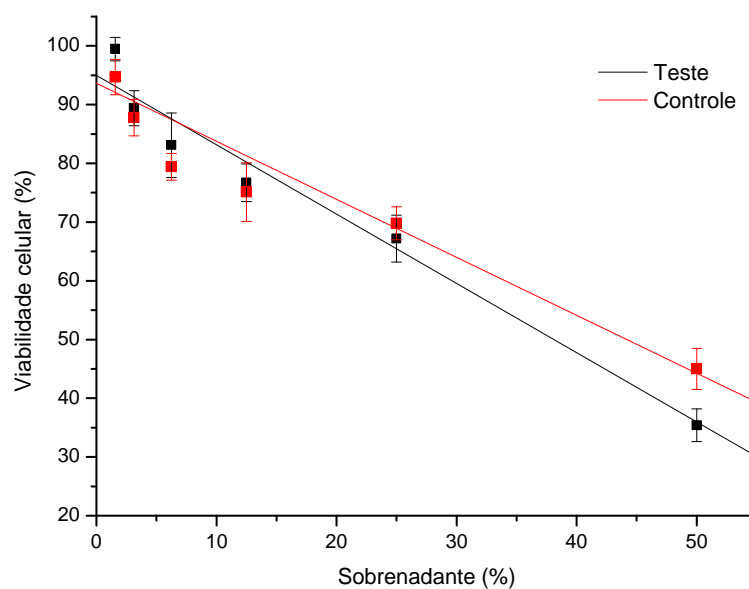


Figura 6 – Relação dose-efeito na viabilidade de células McCoy do sobrenadante de cultura de *Staphylococcus aureus* na ausência e presença da concentração sub-inibitória (40 µg/mL) de quercetina ($p = 0,6304$)

5 - Efeito da concentração sub-inibitória de quercetina na fagocitose de *S. aureus*

As cinéticas das reações de quimiluminescência para *S. aureus* crescidos na presença de quercetina opsonizados e não opsonizados são apresentadas, respectivamente, nas Figuras 7 e 8. A comparação da ICE e IME, através da ANOVA, demonstrou haver diferença significativa entre os ensaios com bactérias cultivadas na concentração sub-inibitória de quercetina e ausência da droga, entretanto diferença significativa entre os experimentos realizados com bactérias opsonizadas e não opsonizadas não foi observada ($p > 0,05$) (Tabelas 2 e 3).

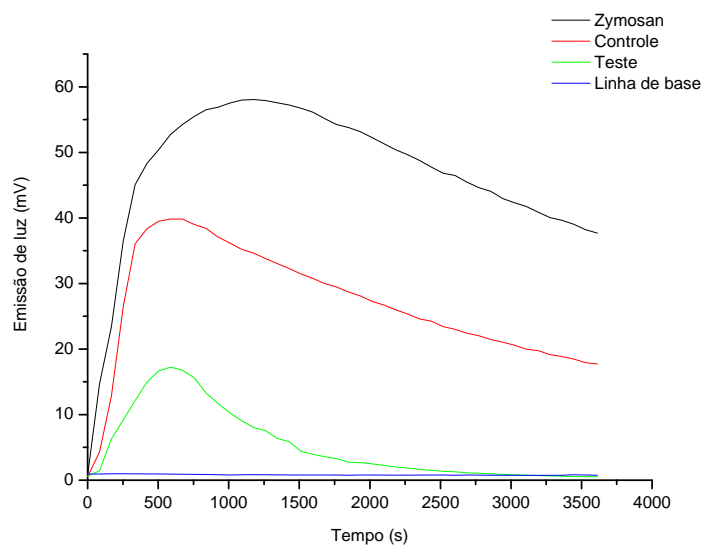


Figura 7 - Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMN/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMN/luminol/*S. aureus* (controle); PMN/luminol/*S. aureus* tratado (teste); PMN/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos opsonizados.

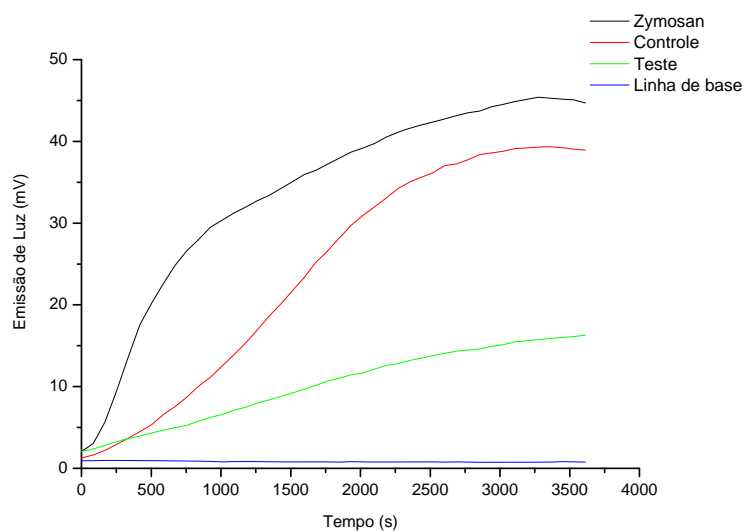


Figura 8 - Quimiluminescência (QL) dos sistemas: PMN/luminol/zymosan (controle de emissão de luz); PMN/luminol/*S. aureus* (controle); PMN/luminol/*S. aureus* tratado (teste); PMN/luminol/PBS (linha de base). Cinéticas representativas de, no mínimo, 3 experimentos independentes. Estímulos não opsonizados.

Tabela 2 - Variação da quimiluminescência (ΔQL) para integral da cinética de emissão (ICE) do sistema PMN/luminol/*S.aureus* na presença (teste) e ausência (controle) da concentração sub-inibitória de quercetina

		ΔQL (mV) para ICE ¹		valor- <i>P</i> ²
		Controle	Teste	
<i>S. aureus</i>	Opsonizado	78258 ± 8578	38742 ± 7684	0,039943
	Não opsonizado	88965 ± 8488	40276 ± 6188	0,000422

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão

²Obtido através da comparação da ICE do controle com o teste

Tabela 3 - Variação da quimiluminescência (ΔQL) para intensidade máxima de emissão (IME) do sistema PMN/luminol/*S. aureus* na presença (teste) e ausência (controle) da concentração sub-inibitória de quercetina

		ΔQL (mV) para IME ¹		valor- <i>P</i> ²
		Controle	Teste	
<i>S. aureus</i>	Opsonizado	40,18 ± 2,44	18,72 ± 3,52	0,042651
	Não opsonizado	38,84 ± 3,95	15,66 ± 2,09	0,000848

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão

²Obtido através da comparação da IME do controle com o teste

6 – Avaliação da adesão/fagocitose através de microscopia óptica em lâmina

Os resultados demonstraram que a quercetina influenciou no número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN (Tabela 4), independente de opsonização ($p < 0,05$). A Figura 9 ilustra a adesão/fagocitose de *S. aureus*, tratados com quercetina e não opsonizados, por PMN.

Tabela 4 - Médias do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN determinadas através de microscopia óptica

		Média do número de bactérias fagocitadas por PMN ¹		valor- <i>P</i> ²
		Controle	Teste	
<i>S. aureus</i>	Opsonizado	46,33 ± 3,51	33 ± 3	0,010548
	Não opsonizado	23,66 ± 3,51	13,67 ± 4,01	0,031825

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão

²Obtido através da comparação da média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN do controle com a média do número de bactérias aderidas/fagocitadas por PMN do teste.

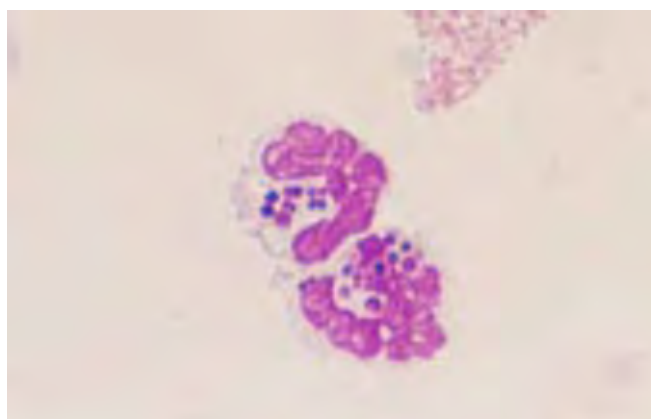


Figura 9 – Micrografia de esfregaço de polimorfonucleares neutrófilos apresentando células de *S. aureus* fagocitadas/aderidas, coradas por Leishman (1.000 x).

V - DISCUSSÃO

A literatura acumula grande volume de informações quanto aos benefícios induzidos pelos flavonóides da dieta à saúde humana, sendo a capacidade antioxidante o melhor caracterizado (KIOKIAS, VARZAKAS, OREOPOULOU, 2008; HARBORNE, WILLIAMS, 2000). Entretanto, outros estudos sugerem a sua aplicação na terapêutica antimicrobiana (VALENTOVÁ et al., 2007; PARKAR, STEVENSON, SKINNER, 2008).

Nos últimos anos, compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, vêm merecendo maior atenção. Há concordância quanto à atividade antibacteriana de extratos de plantas demonstrada através de uma interminável lista de publicações, contudo, não há um consenso quando as substâncias puras presentes em extratos são testadas isoladamente. A atividade antibacteriana da quercetina, um dos flavonóides mais estudados, apresenta discrepância de resultados, provavelmente decorrente de diferentes cepas e técnicas utilizadas nas investigações. A concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus* (ESR # 917), determinada por PARKAR et al. (2008) através da técnica espectrofotométrica de microdiluição em caldo, foi de 62,5 µg/mL; KANG et al. (2006) não conseguiram definir a atividade inibitória desse flavonol para *S. aureus* cepa Newman (CIM > 300 µg/mL) utilizando a mesma técnica.

O ensaio espectrofotométrico de microdiluição, empregado neste trabalho para a determinação da sensibilidade *in vitro* de *S. aureus* (ATCC 25923) para a quercetina, demonstrou que o crescimento bacteriano é reduzido em 50% na concentração de 40 µg/mL (Figuras 2 e 3). CUSHNIE e LAMB (2005), em extensa revisão sobre a atividade antimicrobiana de flavonóides, abordam variações que justificam as discrepâncias relatadas na literatura. Durante a realização deste trabalho, verificamos

que a precipitação do flavonóide quando em soluções de altas concentrações e a sua instabilidade durante o armazenamento (-20° C) interferiam nos resultados.

Características físico-químicas e metabólicas de bactérias podem ser modificadas por sub-CIMs de substâncias antimicrobianas que, dependendo do mecanismo de ação e das espécies envolvidas, alteram diversos fatores relacionados à virulência (LABRO, 2000). No presente trabalho, investigamos a influência da quercetina sobre o crescimento e alguns fatores relacionados à virulência de *S. aureus*.

Diferentes métodos são utilizados para quantificar o crescimento de uma população bacteriana. Os métodos diretos determinam o número de células, enquanto os métodos indiretos analisam a massa da população que é diretamente proporcional ao número de células bacterianas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). A técnica espectrofotométrica de microdiluição, método indireto empregado para monitorar o crescimento bacteriano, foi utilizada para demonstrar a influência da quercetina no crescimento de *S. aureus* após remoção do flavonol. As curvas de crescimento apresentadas na Figura 4 não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas, independente da exposição prévia ao flavonol, demonstrando que a supressão do crescimento não é mantida após a sua remoção. A literatura relata a relevância clínica do efeito pós sub-CIM que, em muitas situações, pode justificar o sucesso ou não dos regimes de dosagens intermitentes (ODENHOLT, 2001).

Das, aproximadamente, 220 toxinas bacterianas conhecidas, cerca de 40% lesam membranas de células eucarióticas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). De um modo geral, as citolisinas formadoras de poro compartilham mecanismo de ação semelhante, que envolve ligação à membrana, seguida de sua inserção, oligomerização e formação de poro. A expressão da α -toxina tem sido objetivo de vários estudos, sendo reconhecido que sub-CIMs de aminoglicosídeos diminuem os níveis de expressão,

contudo os β -lactâmicos aumentam drasticamente sua produção (WORLITZSCH et al., 2001). Através da técnica utilizada, nossos resultados demonstraram que o sobrenadante de cultura de *S. aureus* na presença de concentração sub-inibitória de quercetina apresenta a capacidade hemolítica diminuída em relação à observada em culturas na ausência do flavonol (Figura 5). Entretanto, essa diminuição de hemólise deve ser avaliada com cautela, tendo em vista que OKSUN et al. (2007) relatam a formação de agregados entre polifenóis e α -toxina, o que impede a quantificação dessa citolisina.

Além de hemolisinas, a maioria das cepas bacterianas secreta outras citolisinas que incluem: nucleases, proteases, lipases, hialuronidases e collagenases (MENESTRINA, SERRA, PRÉVOST, 2001). Estudos que caracterizam fatores de virulência demonstram a citotoxicidade de citolisinas para uma variedade de linhagens celulares, incluindo células epiteliais, através da alteração da permeabilidade e formação de poro na membrana celular, além dessa estrutura poder sofrer ação detergente (BHAKDI et al., 1996; ZAVIZION, et al., 1995). Em relação à atividade citotóxica de produtos extracelulares liberados por *S. aureus* para fibroblasto de camundongo (linhagem McCoy), observa-se que os danos celulares induzidos pelo sobrenadante das culturas foram semelhantes, independente do crescimento da bactéria na presença de concentração sub-inibitória de quercetina (Figura 6), demonstrando que a produção de citolisinas extracelulares durante o crescimento do microrganismo não foi influenciada pelo flavonol.

S. aureus é capaz de interagir especificamente com células eucariotas através de uma ampla variedade de moléculas, que são importantes para a colonização do hospedeiro. A expressão da maioria das adesinas em *S. aureus* é coordenadamente regulada durante o crescimento (POHLMANN-DIETZE et al., 2000). Estudos demonstram que baixas concentrações de agentes antimicrobianos podem aumentar ou

diminuir adesinas específicas na superfície bacteriana (HOWARD, PINNEY, SMITH, 1993; BRAGA, DAL SASSO, SALA, 2000). Essas alterações também podem comprometer a fagocitose (PALMQVIST et al., 2004).

Sabe-se, desde longa data, que na fagocitose o reconhecimento inicial do microrganismo é facilitado por fatores opsonizantes presentes no soro. Dentre as opsoninas mais importantes destacam-se os derivados do componente C3 do sistema C, que interagem com os correspondentes receptores na superfície dos fagócitos (SILVA, MOTA, 2003). A fagocitose estimula o *burst* oxidativo, envolvendo a ativação da enzima NADPH-oxidase e geração EROs, que incluem ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e radicais hidroxil (JANG et al., 1999). Esse processo pode ser monitorado através de ensaios quimiluminescentes que demonstram a precisa correlação entre emissão de luz e ativação do processo fagocítico. O luminol é uma sonda capaz de amplificar a quimiluminescência e medir o *pool* de espécies reativas de oxigênio formado no meio extra e intracelular (ALLRED, MARGETTS, HILL, 1980).

Nossos resultados demonstraram, através de técnica quimiluminescente utilizando luminol, que o *burst* oxidativo de PMN foi diminuído quando *S. aureus* foram cultivados em concentração sub-inibitória de quercetina independente de opsonização (Figuras 7 e 8), evidenciando que esse flavonol tem a capacidade de alterar a superfície bacteriana envolvida no processo de adesão durante o crescimento. Essa capacidade foi confirmada quando os experimentos foram realizados com *S. aureus* tratados com a concentração sub-inibitória de quercetina sem prévia incubação por 24 horas. Nesses ensaios, a quimiluminescência obtida para células bacterianas tratadas com o flavonol e cultura controle não apresentaram diferença significativa (resultados não apresentados), demonstrando que a diminuição da adesão não é decorrente de

ligações não específicas na superfície bacteriana mas dependente do crescimento na presença de quercetina.

A eficiência da opsonização na fagocitose de *S. aureus* pode ser observada nos experimentos de fagocitose/adesão em lâmina através de microscopia óptica (Tabela 4). Esse trabalho evidencia que as alterações induzidas na superfície bacteriana pela quercetina não diminuíram a eficiência desse processo.

A expressão de exoproteínas é controlada por um complexo operon (*agr*) regulador de genes de virulência (van BELKUM et al., 2002). Sortases são transpeptidases responsáveis por ancorar proteínas de adesão à superfície da parede bacteriana, codificada pelo gene sortase, compreendendo um importante fator de virulência. Em muitos casos, múltiplas sortases são encontradas no mesmo genoma que podem ser agrupadas em quatro classes (A-D), segundo a homologia (MARESSO, SCHNEEWIND, 2008). KANG et al. (2006) demonstraram que alguns flavonóides, incluindo a quercetina, reduzem a atividade de sortase (A e B) de *S. aureus* sem exibir atividade antibacteriana. Essa diminuição na expressão de adesinas induzida pela quercetina pode justificar a acentuada redução da fagocitose de *S. aureus* demonstrada neste trabalho. Contudo, a inibição da expressão de um gene não, necessariamente, resulta na diminuição de outros fatores de virulência.

O emprego de plantas medicinais e de compostos de origem natural com capacidade de inibir a adesão bacteriana figura na literatura. Oxycoco (cranberries), vegetal rico em flavonóides, vem sendo utilizado na prevenção de infecções de trato urinário (RAZ, CHAZA, DAN, 2004) por impedir a adesão de *Escherichia coli* a células uroepiteliais (HOWELL, 2007). A isoflavona genisteína mostrou inibir a internalização de bactérias entéricas por enterócitos (Caco-2 e HT-29) (WELLS et al., 1999). A influência de diversos polifenóis, incluindo a quercetina, na inibição da adesão

de *Salmonella typhimurium* em células Caco-2 também foi demonstrada por PARKAR, STEVENSON e SKINNER (2008).

A busca por novos agentes antimicrobianos, em decorrência do fenômeno de multiresistência aos já disponíveis, induziu vários grupos de pesquisadores a investigar novos alvos para ação de antibacterianos. Apesar do mecanismo de inibição de sortase ainda não estar completamente elucidado, a inibição da adesão bacteriana na superfície celular parece ser uma alternativa para atenuar a virulência bacteriana mas deve-se considerar que também induzirá a evasão de microrganismos dos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro.

VI - CONCLUSÃO

Considerando as informações disponíveis na literatura e as limitações das técnicas utilizadas, a análise dos resultados obtidos nesse trabalho permite-nos concluir que a quercetina, na concentração de 40 µg/mL, não apresentou efeito pós-sub-inibitório para *S. aureus* (ATCC 25923), significando que essa concentração não altera a taxa de crescimento do microrganismo após sua remoção. Todavia, quando *S. aureus* é cultivado na presença desse flavonol alterações na superfície bacteriana induziram diminuição da fagocitose por PMN independente de opsonização.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLAYAN, A. J.; MEYER, J. J. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 57, p. 177–181, 1997.

ALLRED, C. D.; MARGETTS, J.; HILL, H. R. Luminol-induced neutrophil chemiluminescence. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 631, p. 380-385, 1980.

BHAKDI, S.; BAYLEY, H.; VALEVA, A.; WALEV, I.; WALKER, B.; KEHOE, M.; PALMER, M. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. **Arch. Microbiol.**, v. 165, p. 73-79, 1996.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p.733-751, 1991.

BERNARDO, K.; PAKULAT, N.; FLEER, S.; SCHNAITH, A.; UTERMOHLEN, O.; KRUT, O.; MULLER, S.; KRONKE, M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 546-555, 2004.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p. 119-124, 1985.

BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, v. 500, p. 114-118, 2001.

BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; SALA, M. T. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 15-25, 2000.

CHO, S. Y.; PARK, S. J.; KWON, M. J.; JEONG, T. S.; BOK, S. H.; CHOI, W. Y.; JEONG, W. I.; RYU, S. Y.; DO, S. H.; LEE, C. S.; SONG, J. C.; JEONG, K. S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Mol. Cell. Biochem.**, v.243, p. 153-160, 2003.

CHUN, O. K.; CHUNG, S. J.; SONG, W.O.. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. **J. Nutr.**, v. 137, p. 1244-1252, 2007.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 25, p. 343-356, 2005.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; BYLUND, J. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. **Methods Mol. Biol.**, v. 412, p. 349-363, 2007.

DASTIDAR, S. G.; MANNA, A.; KUMAR, K. A.; MAZUMDAR, K; DUTTA, N. K.; CHAKRABARTY, A. N.; MOTOHASHI, N.; SHIRATAKI, Y. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 23, p. 99–102, 2004.

DEVIIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. 2000. 127f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M.S.G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 166-168, 2002.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 16-34, 2000.

FAROMBI, E. O. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 22, p. 159-167, 2006.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, v. 22, p. 189-216, 2001.

GALICE, D. M.; BONACORSI, C.; SOARES, V. C.; RADDI, M. S.; FONSECA, L. M. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 28, p. 143-146, 2006.

GASPAR J, RODRIGUES A, LAIRES A, SILVA F, COSTA S, MONTEIRO M. J., MONTEIRO, C., RUEFF, J. On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. **Mutagenesis**, v. 9, p. 445-449, 1994.

GEMMELL, C. G.; FORD, C. W. Virulence factor expression by gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 665-672, 2002.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **JR Soc. Med.**, v. 83, p. 159-160, 1990.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HOWARD, B. M. A.; PINNEY, R. J.; SMITH, J. T. Contributions of post-antibiotic lard and repair-recovery to the pos-antibiotic effects of ciprofloxacin on *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. **Chemotherapy**, v. 39, p. 22 - 31, 1993.

HOWELL, A. B. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p. 732-737, 2007.

JANG, D. S.; KANG, B.; RYU, S. Y.; CHANG, I.; MIN, K. R.; KIM, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 705-712, 1999.

JUZWIAK, S.; WÓJCICKI, J.; MOKRZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIALECKA, M.; WENDA-RÓZEWICKA, L.; GAWRONSKA-SZKLARZ, B.; Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. **Pharmacol. Rep.**, v. 57, p. 604-609, 2005.

KANG, S. S.; KIM, J. G.; LEE, T. H.; OH, K. B. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29 p. 1751-1755, 2006.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; OREOPOULOU, V. In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 48, p. 78-93, 2008.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A new cytotoxicity naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, p. 1487-1488, 2004.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 615-650, 2000.

LAPONI, J.C. **Estatística**: usando Excel 5 e 7. São Paulo: Lapponi, 1997. 420p.

LI, B. Q.; FU, T.; DONGYAN, Y.; MIKOVITS, J. A.; RUSCETTI, F. W.; WANG, J. M. Flavonoid baicalein inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, p. 534-538, 2000.

LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. **Life Sci.**, v. 79, p. 2056-2068, 2006.

LINCOLN, J. A.; LEFKOWITZ, D. L.; CAIN, T.; CASTRO, A.; MILLS, K. C.; LEFKOWITZ, S. S.; MOGUILVSKY, N.; BOLLEN, A. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3042-3047, 1995.

MAMANI-MATSUDA, M.; KAUSS, T.; AL-KHARRAT, A.; RAMBERT, J.; FAWAZ, F.; THIOLAT, D.; MOYNET, D.; COVES, S.; MALVY, D.; MOSSALAYI, M. D. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 1304-1310, 2006.

MARESSO, A. W.; SCHNEEWIND, O. Sortase as a target of anti-infective therapy. **Pharmacol Rev.**, v. 60, p. 128-141, 2008.

MENESTRINA, G.; SERRA, M. D.; PRÉVOST, G. Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -hemolysin family. **Toxicon**. v. 39, p. 39-45, 2001.

MENZIES, B. E.; KOURTEVA, I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 29, p. 39-45, 2000.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D. **Microbiologia Médica**. 2ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1999. 584p.

MOJZISOVÁ, G.; KUČHTA, M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 529-535, 2001.

MOON, J. Y.; WANG, L.; DICENZO, R.; MORRIS, M. E. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 29, p. 205-217, 2008.

ODENHOLT, I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 17, p. 1-8, 2001.

OKSUN, C.; KINNOSUKE, Y.; NAOKO, M.; MIYAKASI, M.; NODA, M. Inhibitory effects of various plants polyphenols on the toxicity of Staphylococcal α -toxin. **Microbial. Pathogenesis**, v. 42, p. 215-224, 2007.

PALMQVIST, N.; PATTI, J. M.; TARKOWSKI, A.; JOSEFSSON, E. Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 188-195, 2004.

PARKAR, S. G.; STEVENSON, D. E.; SKINNER, M. A. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 124, p. 295-298, 2008.

PASMANS, F.; HERDT, P. D.; NEROM, A. V.; HAESEBROUCK, F. Induction of the respiratory burst in turtle peritoneal macrophages by *Salmonella muenchen*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 25, p. 159-68, 2001.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays L.*) **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 4557-4567, 2006.

PESSOA, M. H.; DIAS, M. F. A test for the evaluation of ingestion by neutrophils. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 573-574, 1987.

POHLMANN-DIETZE, P.; ULRICH, M.; KISER, K.B.; DORING, G.; LEE, J. C.; FOURNIER, J. M.; BOTZENHART, K.; WOLZ, C. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4865-4871, 2000.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 27, p. 269-274, 1990.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RAZ, R.; CHAZA, B.; DAN, M. Cranberry juice and urinary tract infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1413-1419, 2004.

SILVA, I. M. Avaliação de estímulos específicos no *burst* respiratório de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos de rato (*Rattus albinus norvegicus*), através das sondas quimiluminescentes luminol e lucigenina. 2000. 107f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SILVA, W. D.; MOTA, I. **Bier Imunologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan, 2003, 388 p.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, N. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biol. Med.**, v. 29, p. 375-383, 2000.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plants essential oils on the production of enterotoxins A and B and α -toxin by *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1023-1027, 2004.

SOARES, V. C.; VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 835-838, 2006.

STITES, D. P. Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Basic & Clin. Immunol.** 8^{ed}. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange, 1994, p. 195-215.

TESSIER, P. R.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D. P. Postantibiotic effect of trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid and broth culture media. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 241-247, 2000.

TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: ARTMED Editora, 6 ed., 827p., 2000.

VALENTOVA, K.; STEJSKAL, D.; BEDNAR, P.; VOSTALOVA, J.; CÍHALÍK, C.; VECEROVA, R.; KOUKALOVA, D.; KOLAR, M.; REICHENBACH, R.; SKNOURIL, L.; ULRICHOVA, J.; SIMANEK, V. Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: a pilot double-blind placebo-controlled trial. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 3217-3224, 2007.

Van BELKUM, A.; KOOLS-SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. **J. Microbiol. Methods**, v. 48, p. 19-42, 2002.

VIJAYA, K.; ANANTHAN, S. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 58, p. 191-193, 1996.

WARD, R. J.; LEONARD, K. The *Staphylococcus aureus* alpha-toxin channel complex and the effect of Ca²⁺ ions on its interaction with lipid layers. **J. Struct. Biol.**, v. 109, p. 129-141, 1992.

WELLS, C. L.; JECHOREK, R. P.; KINNEBERG, K. M.; DEBOL, S. M.; ERLANDSEN, S. L. The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes. **J. Nutr.**, v. 129, p. 634-640, 1999.

WORLITZSCH, D.; KAYGIN, H.; STEINHUBER, A.; DALHOFF, A.; BOTZENHART, K.; DORING, G. Effects of amoxicillin, gentamicin, and

moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p. 196-202, 2001.

WU, Q., WANG, Q. I., TAYLOR, K. G., DOYLE, R. J. Subnhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 1399-1401, 1995.

YEOMANS, V. C.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins. **Eur. J. Nutr.**, v. 44, p. 422-428, 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. Univali 1ed., 2007, 303p.

ZAVIZION, B.; BRAMLEY, A. J.; POLITIS, I.; GILMORE, J.; TURNER, J. D; PATEL, A. H.; FOSTER, T. J. Effects of *Staphylococcus aureus* toxins on the growth of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) in culture. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 277-284, 1995.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVIK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: Ed. UFRGS; Ed. UFSC, 1991, p. 517-545