



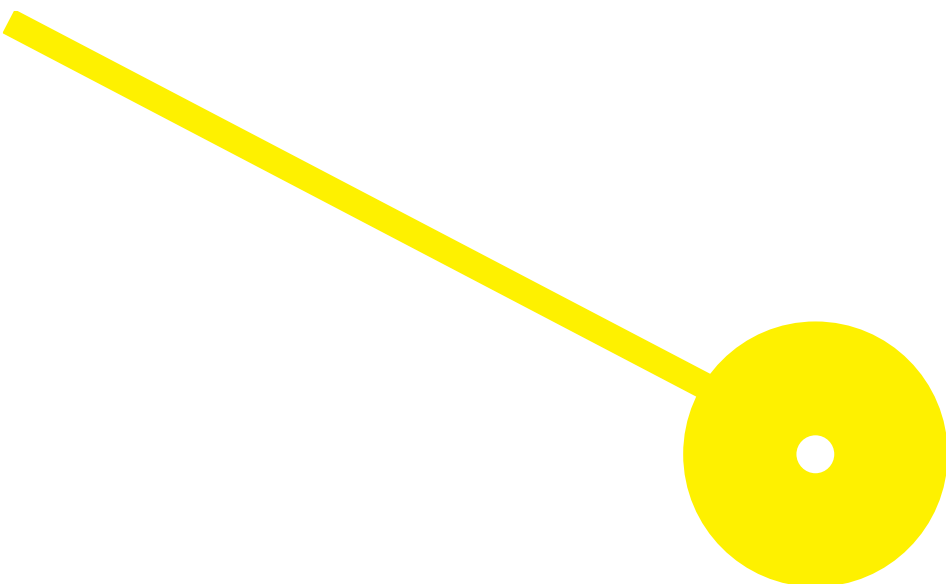
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA – RAMO DE MICROBIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

Atividade antimicrobiana de compostos flavonoides diméricos

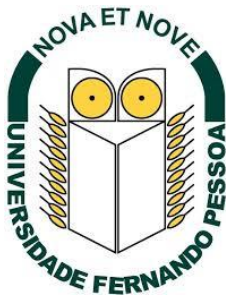
Maria Inês Dias Lopes

09/2023





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Atividade antimicrobiana de compostos flavonoides diméricos

Autor

Maria Inês Dias Lopes

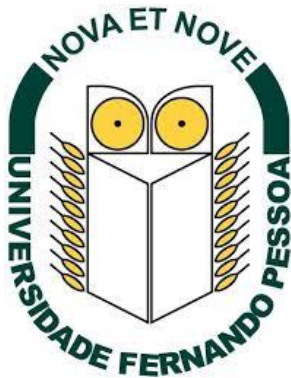
Orientadores

Professor associado/Maria de Fátima Araújo Magalhães Cerqueira/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Molecular Oncology and Viral Pathology GRP-IC, Portuguese Institute of Oncology of Porto FP-IBID, FP-BHS, Universidade Fernando Pessoa
Professor Catedrático Convidado na Universidade Fernando Pessoa/Rui Medeiros/Vice-Diretor do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto, Francisco Gentil, EPE
Mestre/Carla Manuela Moutinho Silva Campos/ Molecular Oncology and Viral Pathology GRP-IC, Portuguese Institute of Oncology of Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo/Área de Especialização em Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Menção de apoio financeiro

Agradeço ao Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral (GOMPV), do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto (CI-IPOP) (projecto nº PI86-CI-IPOP-66-2019) pelo apoio financeiro e de recursos laboratoriais. Ao Grupo de Investigação Translacional em Longevidade e Saúde do FP-BHS, IBID e à Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.



Agradecimentos

À Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto que, por mais 2 anos no meu percurso académico, foi casa e me permitiu realizar mais um ciclo de estudos.

À coordenadora deste mestrado, a professora Doutora Manuela Amorim, agradeço a disponibilidade, oportunidade e orientação que me continuou a dar durante mais estes dois anos. Ao professor Doutor Rui Medeiros, ser-lhe-ei sempre grata pela oportunidade que me deu em integrar o grupo de investigação do IPO do Porto e de me ter possibilitado os melhores meses de aprendizagem que já tive.

À minha orientadora, a professora Doutora Fátima Cerqueira, não há palavras suficientes para agradecer todo o incentivo, a dedicação, a confiança e as valiosas contribuições neste projeto. Comecei com receio se seria capaz, por ser também o primeiro contacto com o mundo da investigação, mas desde início me deu apoio, mostrou-se sempre disponível para ouvir sugestões que eu tivesse e mostrou-me que erros todos cometemos. Agradeço muito por estes 6 meses em que não saí a mesma desde o primeiro dia que entrei no laboratório.

À professora Carla Campos, por ter sido o contacto inicial para esta oportunidade, por orientar e ajudar sempre com as suas palavras neste bonito caminho.

Ao grupo de investigadores da Universidade Federal do Maranhão, o professor Rui Gil da Costa, Cláudia Quintino da Rocha e Haissa Oliveira Brito, que extraíram, isolaram e caracterizaram os compostos que gentilmente disponibilizaram para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos que me permitiram progredir, principalmente a coordenadora do mestrado, professora Manuela Amorim, que esteve sempre disponível e com conselhos para dar.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Fernando Silva, agradeço as contribuições que tiveram para com este trabalho, pois tiveram sempre uma palavra amiga e um bom ambiente, dentro e fora das portas do laboratório, que no fim fez toda a diferença.

À minha colega de mestrado, Sílvia, por ter sido a minha parceira incondicional. Pela cumplicidade natural e inevitável, pelos risos, receios e ânsias. Passamos por tudo juntas até ao último dia.

Aos amigos que estiveram sempre do meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio em mais dois anos.

Aos meus pais e ao meu irmão João, pelo apoio que sempre deram durante toda a minha vida, por acreditarem que seria capaz de superar obstáculos e pelo esforço investido no meu percurso académico. Agradeço terem compreendido a minha ausência.

E por fim à minha sobrinha, que apesar de só ter 4 anos, foi sempre uma fonte onde pude ir buscar energias e parar para pensar no porquê de querer continuar a investir e a ter esperança no futuro.

Resumo

Plantas do género *Arrabidaea* são utilizadas na medicina popular (1). Estudos mostraram o efeito de flavonoides diméricos obtidos de *Arrabidaea brachypoda* contra protozoários da família Trypanosomatidae (1,2). Neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana de um extrato hidroetanólico (RAB), e da sua fração apolar obtida com diclorometano (RAB-DCM) e de três flavonoides diméricos – braquidina (Br) A, B e C, isolados desta fração. Todos inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) usados: ATCC 29213 e V459. Nenhum foi ativo contra as leveduras testadas (*Candida albicans*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*) ou bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*).

Br C foi a mais ativa em *S. aureus* ATCC 29212 (Concentração Inibitória Mínima – CIM – 12,0 µM) e a Concentração Mínima Letal (CML) indicou um efeito bacteriostático. O composto Br C provocou uma diminuição significativa dos halos de DNase e uma redução de 90% na atividade da catalase à concentração de 1/2 MIC.

A atividade anti-inflamatória mostrou que o extrato RAB-DCM inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS. Quanto ao efeito tóxico contra fibroblastos humanos, nenhum composto usado afetou significativamente a viabilidade celular.

Os resultados deste trabalho destacam a potencial atividade antimicrobiana da braquidina C.

Palavras-chave: flavonoides diméricos; antimicrobiano; mecanismo de ação; concentração mínima inibitória; fatores de virulência.

Abstract

Plants from *Arrabidaea* genus are used in folk medicine (1). Studies have shown the effect of dimeric flavonoids obtained from *Arrabidaea brachypoda* against protozoa of the family Trypanosomatidae (1,2). In this work we evaluated the antimicrobial activity of the hydroethanolic extract (RAB), and its nonpolar fraction obtained with dichloromethane (RAB-DCM) and three dimeric flavonoids – brachyidin (Br) A, B and C, isolated from this fraction. All inhibited the growth of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) used: ATCC 29213 and V459. None were active against the yeasts tested (*Candida albicans*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans*) or Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*).

Br C was the most active in *S. aureus* ATCC 29212 (Minimum Inhibitory Concentration – MIC – 12.0 μM) and the Minimum Lethal Concentration (CML) indicated a bacteriostatic effect. The compound Br C caused a significant decrease in DNase halos and a 90% reduction in catalase activity at a concentration of 1/2 MIC.

The anti-inflammatory activity showed that the RAB-DCM extract inhibited the production of nitric oxide by RAW264.7 macrophages stimulated with LPS. As for the toxic effect against human fibroblasts, no compound used significantly affected cell viability.

The results of this work highlight the potential antimicrobial activity of brachyidin C.

Keywords: dimeric flavonoids; antimicrobial; mechanism of action; minimum inhibitory concentration; virulence factors.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Resistência antimicrobiana bacteriana.....	2
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	7
1.2. Resistência antimicrobiana fúngica.....	9
1.2.1. <i>Candida spp.</i>	11
1.2.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
1.3. Flavonoides.....	16
1.3.1. Flavonoides diméricos.....	17
1.4. <i>Arrabidaea brachypoda</i>	20
1.5. Objetivos.....	21
2. Métodos.....	22
2.1. Testes de suscetibilidade.....	23
2.1.1. Ensaio de suscetibilidade por microdiluição em caldo para Bactérias.....	24
2.1.2. Ensaio de suscetibilidade por microdiluição em caldo para leveduras.....	26
2.2. Avaliação do mecanismo de ação da Braquidina C.....	27
2.2.1. Interferência com a atividade da Desoxirribonuclease.....	27
2.2.2. Interferência com a atividade da Catalase.....	28
2.2.3. Interferência com a atividade da Coagulase.....	28
2.3. Atividade citotóxica e anti-inflamatória.....	29
2.3.1. Citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos primários.....	29
2.3.2. Interferência na produção de óxido nítrico (NO) pela linha celular de macrófagos RAW264.7.....	30
2.4. Tratamento/análise de dados.....	31
2.5. Questões Éticas.....	31
3. Resultados.....	32
3.1. Testes de suscetibilidade.....	32
3.2. Avaliação do mecanismo de ação da Braquidina C.....	34
3.3. Atividade citotóxica e anti-inflamatória.....	36
3.3.1. Citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos primários.....	36

3.3.1.	Interferência na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS..	37
4.	Discussão.....	39
5.	Conclusão.....	46
6.	Referências Bibliográficas.....	48
7.	Anexos	Erro! Marcador não definido.
7.1.	Anexo A – Trabalho apresentado em reunião científica	Erro! Marcador não definido.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC®	Coleção de Cultura Norte Americana (do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>)
CECT	Coleção espanhola de Culturas Tipo (do espanhol, <i>Colección Espanola de Cultivos</i>)
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CMI	Concentração mínima inibitória
CML	Concentração mínima letal
CSLI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido (do inglês, <i>Extended-spectrum β-lactamase</i>)
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	Comité Europeu de Testes Suscetibilidade Antimicrobiana (do inglês, <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
H ₂ DCFDA	2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (do inglês, <i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HDFa	Fibroblastos dérmicos humanos primários (do inglês, <i>Human Dermal Fibroblasts</i>)
VIH	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human immunodeficiency vírus</i>)
IACS	Infeções associadas aos cuidados de saúde
ITU	Infeção do trato urinário
LPS	Lipopolissacarídeos (LPS, do inglês, <i>lipopolysaccharides</i>)
MHA	<i>Mueller Hinton agar</i>
MHB	Caldo <i>Mueller Hinton</i> (do inglês, <i>Mueller Hinton broth</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Gibco Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDB	Caldo <i>Sabouraud Dextrose</i> (do inglês, <i>Sabouraud Dextrose broth</i>)
SDA	<i>Sabouraud Dextrose</i> agar
UCI	Unidades de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colónias
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina (do inglês <i>Vancomycin resistant Enterococci</i>)

Índice de Tabelas

Tabela 1: Número de estirpes de bactérias isoladas reportadas por alguns laboratórios e em pacientes de unidades de cuidados intensivos (UCI), de 2017 a 2021, em Portugal.....	3
Tabela 2: Fatores de virulência de <i>S. aureus</i>	5
Tabela 3: Fatores de virulência de <i>E. coli</i>	8
Tabela 4: Exemplos de fungos inibidos por biflavonoides.....	18
Tabela 5: Exemplos de bactérias inibidas por biflavonoides.....	19
Tabela 6: Estirpes de referência de bactérias e leveduras utilizadas.	22
Tabela 7: Extratos e compostos flavonoides diméricos extraídos de <i>Arrabidea brachypoda</i>	22
Tabela 8: Controlos para o ensaio de microdiluição em caldo.....	23
Tabela 9: Antimicrobianos e respetivos solventes, diluentes e concentração das soluções utilizados em bactérias.....	24
Tabela 10: Antimicrobianos e respetivos solventes, diluentes e concentração das soluções utilizados em leveduras.....	26
Tabela 11: Atividade antimicrobiana (concentração mínima inibitória) dos extratos RAB e RAB-DCM.....	32
Tabela 12: Atividade antimicrobiana (concentração mínima inibitória) dos compostos flavonoides diméricos.....	33
Tabela 13: Ensaio da DNase em <i>MSSA ATCC 29213</i>	34
Tabela 14: Ensaio de catalase em <i>MSSA ATCC 29213</i>	35

Índice de Figuras

Figura 1: Grupos prioritários de fungos categorizados pela OMS.....	10
Figura 2: Organismos <i>Cryptococcus neoformans</i> , conforme evidenciado pelas células de levedura encapsuladas verdes brilhantes, por uma técnica de fluorescência. Ampliação: 570x.15	
Figura 3: Os compostos flavonoides podem ser encontrados em frutas cítricas, verduras, legumes e grãos, além de bebidas, como chá verde e vinho tinto.....	16
Figura 4: Representação da estrutura química dos compostos flavonoides diméricos extraídos das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> . 1 – Braquidina A, 2 – Braquidina B, 3 – Braquidina C. [Reproduzido com autorização de Da Rocha et al. (1,2)]	21
Figura 5: Ensaio de catalase em MSSA ATCC 29213. Na figura é visível a efervescência obtida nos poços de controlo positivo comparativamente aos poços de controlo negativo.....	35
Figura 6: Viabilidade de células HDFa quando expostas aos extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)..	36
Figura 7: Viabilidade de células HDFa quando expostas aos extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)...	36
Figura 8: Inibição da produção de NO por macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS pelos extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)	37
Figura 9: Viabilidade de macrófagos RAW264.7 tratados com os extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)	37
Figura 10: Inibição da produção de NO por macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS pela braquidina A (BRA-A), braquidina B (BRA-B) e braquidina C (BRA-C). (n=2).....	38
Figura 11: Viabilidade de macrófagos RAW264.7 tratados com braquidina A (Br A), braquidina B (Br B) e braquidina C (Br C). (n=2).....	38

1. Introdução

A presente dissertação intitulada “Atividade antimicrobiana de compostos flavonoides diméricos” foi elaborada no âmbito da unidade curricular de Dissertação do 2º ano do Mestrado de Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo de Microbiologia e Saúde Pública, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Os antimicrobianos são substâncias capazes de inibir o crescimento e/ou aniquilar um ou mais microrganismos e, por isso, são agrupados em grupos de acordo com os alvos contra os quais atuam (3,4). De acordo com o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*), um isolado é considerado suscetível quando não é resistente a nenhum antimicrobiano testado, ou resistente, quando resiste a um ou mais agentes antimicrobianos (5).

A resistência pode ser intrínseca, quando surge naturalmente, sem depender de uma exposição prévia a agentes antimicrobianos. De uma perspetiva evolutiva, a resistência aos antimicrobianos é adquirida, quando representa uma resposta adaptativa dos microrganismos às pressões seletivas decorrentes da exposição, por vezes contínua, a um agente antimicrobiano e a condições *stress* (3,6). Este último tipo de resistência é o mais preocupante para a comunidade médica, farmacêutica e laboratorial. Muito embora existam vários fatores associados ao seu aparecimento, o seu principal desencadeador é o uso excessivo e inadequado de antibióticos e antifúngicos em vários campos (medicina, agricultura, pecuária e veterinária) (6).

Nos últimos anos, a identificação de microrganismos multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes de drogas, tornou-se num problema grave de saúde pública do século XXI reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS). As infeções originadas por estes microrganismos põem em causa a capacidade terapêutica dos sistemas de saúde e culminam em, aproximadamente, 700 000 mortes anuais em todo o mundo (7).

A grande maioria desses agentes patogénicos é encontrada principalmente em hospitais e outras instalações de cuidados de saúde e a terapêutica baseia-se no inevitável recurso a drogas de terceira e quarta linha, associados a mais efeitos colaterais graves, como falência de órgãos e prolongamento do tempo de convalescença. Embora a sua transmissão seja particularmente documentada em unidades de cuidados intensivos, a instituição de saúde como um todo é afetada (7).

1.1. Resistência antimicrobiana bacteriana

A resistência antimicrobiana bacteriana é uma ameaça emergente do século XXI para a saúde pública e está a ter repercussões graves por todo o globo. Até 2050, prevê-se que seja atingido o pico de 10 milhões de mortes por ano, em todo o mundo, o que totaliza um maior número de óbitos que os causados por doenças oncológicas (8,9).

Apesar da existência de vários estatísticos para análise, existem regiões com uma menor vigilância e onde o acesso aos sistemas de saúde são escassos, o que limita o número de dados disponíveis (10).

Segundo o CDC, em 2019, os dados revelaram que as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram responsáveis por mais de 250000 mortes associadas à resistência antimicrobiana, por ordem crescente de óbitos. No seu conjunto, estes agentes infecciosos foram responsáveis por 929 000 de 1,27 milhões de mortes atribuíveis à resistência antimicrobiana bacteriana. Nos países mais desenvolvidos, a grande maioria dos óbitos relacionados teve origem em infeções causada por *S. aureus* e *E. coli* (10).

O relatório de vigilância da resistência antimicrobiana da região europeia da OMS baseia-se nos dados de resistência a antimicrobianos de isolados reportados à Vigilância da Ásia Central e da Europa de Resistência Antimicrobiana (CAESAR, do inglês, *Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance*) (11).

Em 2019, as alterações de comportamento e os esforços para o controlo da pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, modificaram os riscos de infeção. Por este motivo, é importante comparar os dados de 2020/2021 com anos anteriores. No topo da pirâmide das bactérias mais documentadas em 2021, a nível europeu, estão *E. coli* (39,4%), *S. aureus* (22,1%) e *K. pneumoniae* (11,9%) (11).

Na Tabela 1 estão apresentados os dados relativos a Portugal entre 2017 e 2021, observando-se pouca variação no número de laboratórios dos quais são provenientes os dados e uma diminuição do número de isolados de 2020-2021, exceto nas unidades de cuidados intensivos (UCI). Também nos restantes países com um aumento do número de casos notificados em 2020-2021, a sua maioria ocorreu entre pacientes de UCI, e uma das grandes preocupações reside nos isolados que apresentavam resistência aos carbapenemos (11).

Tabela 1: Número de estirpes de bactérias isoladas reportadas por alguns laboratórios e em pacientes de unidades de cuidados intensivos (UCI), de 2017 a 2021, em Portugal

Bactérias	2017			2018			2019			2020			2021		
	Nº Labs	n	% UCI	Nº Labs	n	% UCI	Nº Labs	n	% UCI	Nº Labs	n	% UCI	Nº Labs	n	% UCI
<i>E. coli</i>	62	6452	4	59	5921	4	58	6433	4	63	5858	4	57	5633	4
<i>K. pneumoniae</i>	61	2743	10	58	2604	10	55	2709	9	60	2790	9	56	2602	14
<i>P. aeruginosa</i>	57	1220	13	55	1115	12	54	1061	11	57	1061	9	53	1016	14
<i>Acinetobacter spp.</i>	36	174	16	39	127	18	30	99	14	31	104	9	26	67	17
<i>S. aureus</i>	64	3789	5	59	3940	7	59	3308	6	65	3319	6	59	2948	10
<i>S. pneumoniae</i>	54	1056	1	55	1062	NA	53	983	NA	48	588	NA	41	427	NA
<i>E. faecalis</i>	58	1014	8	56	979	9	54	945	9	58	990	10	52	999	13
<i>E. faecium</i>	46	467	16	47	440	16	43	411	15	43	406	12	43	416	17

Labs, laboratórios; NA, não aplicável.

Adaptado de: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 – 2021 data, OMS, 2023 (8)

Assim, existe uma prevalência crescente de bactérias patogénicas multirresistentes em todo o mundo, tais como: *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*); *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE, do inglês *Vancomycin resistant Enterococci*) e bactérias Gram-negativo produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs, do inglês, *Extended-spectrum β -lactamase*) e carbapenemases (8).

Atualmente, *Enterococcus* representam uma parte das principais infeções nosocomiais. Atendendo às resistências intrínsecas a antimicrobianos (como betalactâmicos e aminoglicosídeos) e à resistência adquirida (contra glicopeptídeos, quinolonas, tetraciclina, macrólidos e estreptogramina), a identificação nas últimas décadas de VRE foi um fator crucial para um aumento na taxa de mortalidade. No sentido de travar a colonização, o controlo de VRE passa por limitar o uso excessivo de vancomicina e cefalosporinas, hospitalizações desnecessárias e por aumentar a deteção e notificação de indivíduos colonizados (12).

As bactérias Gram-negativo desenvolveram o mais amplo espectro de resistência devido a múltiplas adaptações estruturais e enzimas de degradação de antibióticos, incluindo beta-lactamases de espectro expandido (ESBL), cefalosporinases e carbapenemases (13,14).

Algumas bactérias Gram-negativo resistentes, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, produzem ESBLs, enzimas que hidrolisam penicilinas, oximiinocefalosporinas e aztreonam e, conseqüentemente, impedem a resolução da infeção com a antibioterapia disponível (13). Uma tendência preocupante é o aumento de portadores assintomáticos de bactérias produtoras de ESBL. Por exemplo, mais de 50% de algumas populações em regiões do Sudeste Asiático estarão colonizadas (13).

Também *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (CRE) são especialmente alarmantes uma vez que este grupo de antibióticos, os carbapenemos, são utilizados como 1ª linha na terapêutica dirigida a bactérias produtoras de ESBL (15).

As espécies *S. aureus* e *E. coli* estão entre as mais prevalentes de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, respetivamente, e apresentam vários fatores de virulência e resistência a vários antimicrobianos, como abordado nos próximos subcapítulos (10).

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus spp. são bactérias Gram-positivo pertencentes à família *Micrococcaceae*, anaeróbias facultativas, amplamente distribuídas no meio ambiente. Morfologicamente, apresentam-se como cocos com forma esférica, agrupados em cachos e imóveis (16).

De todas as espécies, *S. aureus* é a mais patogénica, apresentando vários fatores de virulência e grande capacidade de adaptação a condições adversas. Distingue-se de outras espécies estafilocócicas com base na pigmentação de ouro das colónias e resultados positivos dos testes de coagulase, fermentação de manitol e desoxirribonuclease (DNase) (16).

S. aureus tipicamente não causa infeções no ser humano, fazendo parte da flora comensal de 30–70% da população (sendo que nas narinas estão os seus principais nichos ecológicos), e é encontrado por todo o mundo em superfícies de processamento de alimentos (17). No entanto, é responsável por causar infeções no ser humano que podem ser ligeiras (como feridas, furúnculos e carbúnculos, e impetigo bolhoso) ou graves e invasivas, quando a bactéria atinge a corrente sanguínea (frequentemente pelo uso de dispositivos médicos, como o cateter venoso central), nomeadamente gastroenterite, endocardite, síndrome do choque tóxico e certas intoxicações alimentares e septicemia (17). A endocardite e septicemia são condições clínicas de alta morbidade e mortalidade, mesmo com as antibioterapias agressivas aplicadas (17).

A intoxicação alimentar estafilocócica tem um período de incubação de 2–6 h e os sintomas mais comuns são náuseas e vômitos, cólicas abdominais e diarreia. A sua progressão está relacionada com a sua capacidade de sobrevivência pelos fatores de virulência (17).

Os principais fatores de risco para a sua disseminação sistémica são a idade, existência de comorbilidades, como doenças cardíacas, diabetes, doença renal, infeção por vírus da imunodeficiência humana (VIH, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) presença de dispositivos médicos e uso de drogas intravenosas (16).

A espécie *S. aureus* é famosa por produzir uma infinidade de enzimas e toxinas que representam os fatores de virulência que permitem a sua colonização, multiplicação e invasão dos tecidos. Os principais são enzimas, como gelatinase, hemolisinas, coagulase, DNase, lípases e catalase, e toxinas (enterotoxinas e exotoxinas) (16).

Apesar de não ser um fator necessário para o crescimento de *S. aureus*, a produção de catalase, uma enzima capaz de converter o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, permite a esta bactéria resistir à sua presença no interior de células fagocíticas (18). Também a produção da enzima DNase permite a esta bactéria resistir à ação dos neutrófilos (19).

A produção da sua própria coagulase e fator de von Willebrand permite-lhe sequestrar a cascata de coagulação, pela ligação ao fibrinogénio e à fibrina (16). Esta ligação permite a formação de aglomerados rodeados por fibrinogénio que protegem a bactéria de ataques por parte do sistema imunológico e da ação de antibióticos (16). Na verdade, a capacidade de *S. aureus* de induzir a coagulação é um dos principais contributos para a patogénese da doença (16).

Alguns dos seus fatores de virulência encontram-se associados a condições clínicas (Tabela 2).

Tabela 2: Fatores de virulência de *S. aureus*.

Toxina	Função	Doença associada
α -hemolisina	Formação de poros, lise celular e propriedades pró-inflamatórias.	Pneumonia, sepsis
Panton-Valentine Leucocidina		Pneumonia, bacteremia
Modulinas solúveis em fenol		Bacteremia, infeção da pele
Inibidor da diferenciação das Células Epidérmicas	Rutura das células endoteliais.	Pneumonia, bacteremia, úlcera de pé diabético
Toxinas Esfoliativas	Disrupção das adesões e junções das células da epiderme.	Síndrome estafilocócica da pele escaldada
Enterotoxinas Estafilocócicas	Atividade de superantigénio e pro-inflamatória.	Intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico
Toxina 1 - Síndrome do Choque Tóxico		Síndrome do Choque Tóxico
Proteína A (SpA)	Interfere com a ligação de Imonuglobulinas e funciona como superantigénio e conduz à apoptose de linfócitos B.	Septicemia

Fontes: (20-23).

Os superantigénios fazem parte duma classe de exotoxinas que ativam os linfócitos T do hospedeiro, o que conseqüentemente conduz à libertação de grandes quantidades de citocinas que desencadeiam febre, apoptose, doenças autoimunes, anergia ou deleção e, em casos graves, o choque anafilático (20,24).

O tratamento das infeções provocadas por *S. aureus* é por vezes comprometido pelo aparecimento de estirpes MRSA. Embora estas estirpes tenham sido descritas pela primeira vez na década de 1960, já são endémicas em 40–60% dos hospitais de países industrializados, sendo por isso impossível a sua erradicação (17).

As estirpes de MRSA produzem uma proteína de ligação à penicilina (PBP, do inglês penicillin-binding protein) alterada, associada à diminuição da afinidade para a maioria das penicilinas semissintéticas, que é codificada por um gene adquirido, *mecA* (25,26). Esta resistência deve-se à transferência e inserção de um elemento genético móvel designado *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) nos cromossomas de estirpes suscetíveis. As estirpes MRSA representam um grave problema pelas altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como sua resistência a todas as penicilinas e vários β -lactâmicos, exceto ceftarolina e ceftobiprole (25,26). A maioria dos casos de infeção por MRSA encontrava-se associada a cuidados de saúde (HA-MRSA (do inglês, *hospital-associated MRSA*) em doentes internados em hospitais ou noutras instituições (como unidades de cuidados continuados e centros de diálise), submetidos a procedimentos ou dispositivos invasivos (cirurgias, tubos intravenosos ou articulações artificiais) e o veículo principal de transmissão eram as mãos dos profissionais de saúde (25–27). Esta limitação ao ambiente hospitalar tem sido quebrada nas últimas décadas pelo surgimento de casos de infeções por MRSA em reclusos, no exército e em equipas de desporto, estando, por isso, associadas à comunidade (CA-MRSA, do inglês, *community-associated MRSA*). A transmissão de MRSA ocorre pelo contato direto e a manifestação mais comum é a infeção da pele e dos tecidos moles (25–27).

De uma forma geral, *S. aureus* é capaz de adquirir resistência a todas as classes de antibióticos clinicamente disponíveis através de mutações ou aquisição de genes determinantes de resistência por transferência de outras bactérias pelo que, apesar de estarem mais elucidados os mecanismos da sua patogénese, o tratamento das infeções é cada vez mais limitado (25–27).

1.1.2. *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* e um dos modelos mais bem caracterizados de microrganismos (28). É uma bactéria móvel, com forma de bastonete, anaeróbia facultativa, com capacidade de fermentação da lactose e não produtora de oxidase, com pH ideal para crescimento entre 6,0 e 8,0 (28). É capaz de sobreviver em habitats ecológicos distintos (até mesmo abióticos), por ser muito versátil e ser capaz de se adaptar facilmente a diferentes condições (28).

É um comensal que faz parte do microbioma humano por estar presente no trato gastrointestinal da maioria dos animais de sangue quente, impedindo a colonização por agentes patogênicos (29). Embora pareça ser uma bactéria comensal inofensiva, algumas estirpes são patogênicas. De acordo com o local onde causam infecção, as estirpes de *E. coli* dividem-se em estirpes patogênicas intestinais e extraintestinais (30,31).

As estirpes patogênicas intestinais, como *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterohemorrágica (produtora da toxina de Shiga) e *E. coli* enterotoxigênica, entre outras, são transmitidas pela via fecal-oral, através do consumo de água e alimentos contaminados com fezes de humanos ou de animais infetados, e responsáveis por enterite de origem alimentar (30,31). A gravidade destas infecções varia entre gastroenterites leves ou moderadas e infecções que ameaçam a própria vida, sendo que a gravidade depende de fatores do microrganismo e do hospedeiro (30,31).

Esta bactéria encontra-se também associada a infecções extraintestinais decorrentes de cuidados de saúde prestados em ambulatório ou em internamento (32). Apesar de poder causar infecção em qualquer sistema de órgãos, é responsável por 75-90% dos casos de infecção do trato urinário (ITU), mais comuns no sexo feminino, e cuja suscetibilidade aos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento dessas ITU's varia por todo o globo (32). É, também, um agente associado a pneumonia, meningite neonatal e septicemia (30,33).

Tal como as restantes bactérias, também *E. coli* apresenta vários fatores de virulência (Tabela 3), codificados em ilhas de patogenicidade, plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis, tais como adesinas, toxinas, fatores de aquisição de ferro, lipopolissacarídeos, cápsulas de polissacarídeos e invasinas (34).

Tabela 3: Fatores de virulência de *E. coli*.

Fator de Virulência	Gene(s)	Função
Fímbria tipo 1	fm	Fator de colonização em infecções extraintestinais: formação de biofilmes.
Adesina afimbrial	afa	Capacidade de hemaglutinação.
Ibe ABC	ibeA,B,C	Invasão celular nos tecidos do hospedeiro.
Antigénio 43	agn43(fu)	Participa na adesão e formação de biofilmes.
Aerobactina	iuc,aer	Sideróforo, aquisição de Fe ²⁺ / ³⁺ no hospedeiro.
Antigénios da cápsula	KpsMI-neuA, KpsMII	Proteção contra a fagocitose.
Proteína da membrana externa	omp	Evasão do sistema imune do hospedeiro.
Autotransportador de serina protease	pic	Toxina que degrada mucinas, promove a colonização do epitélio e danifica a membrana celular.
Toxina autotransportadora secretada	sat	Toxina proteolítica com um efeito citotóxico.
Vacuolização da toxina autotransportadora	vat	Toxina proteolítica que induz a vacuolização da célula hospedeira.
Hemolisina A	hlyA	Lise celular pela formação de poros nas membranas da célula hospedeira.
Fator necrosante citotóxico	cnf	Necrose celular.

Fontes: (34–36).

Desde 1980, os padrões de suscetibilidade de infecções por *E. coli* foram mudando com a introdução de sucessivas cefalosporinas de amplo espectro (37). A produção de β -lactamases, uma ampla classe de enzimas, frequentemente codificadas em plasmídeos e produzidas por *Enterobacteriaceae*, particularmente por *E. coli*, representa o mecanismo de resistência mais eficaz contra os β -lactâmicos (38). Como conferem resistência às penicilinas e cefalosporinas, conduzem à multirresistência em bactérias Gram-negativo (37).

A resistência a carbapenemos em *Enterobacteriaceae* é, também, uma agravante para o tratamento de infecções, que se deve essencialmente a carbapenemases codificadas por plasmídeos (37). *E. coli* também apresenta resistência a (fluoro)quinolonas, que aparece associada à presença de genes ESBL (39). A resistência às fluoroquinolonas, obtida através de cromossomas ou de genes codificados por plasmídeos, têm estado aliada à existência de genes

de resistência a β -lactâmicos, como blaCTX-M-14 e blaCTX-M-15 (40) Embora não seja considerada antibioterapia de primeira linha, as fluoroquinolonas têm sido muito usadas devido à problemática da resistência. No que toca à resistência às quinolonas, esta é mediada por mutações em enzimas, como a girase e topoisomerase de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*), bombas de efluxo e transferência de genes de plasmídeos (37).

1.2. Resistência antimicrobiana fúngica

Muito embora a população seja diariamente alertada para a resistência bacteriana, a resistência aos fúngicos continua a deter menor reconhecimento entre a população. Estima-se, no entanto, que provoquem mais de 2 milhões de óbitos anualmente (41). Na verdade, várias estirpes fúngicas patogénicas tornaram-se resistentes a mais de uma classe de antifúngicos (azóis, equinocandinas, pirimidinas e polienos), havendo uma necessidade de busca urgente por alternativas (42).

A incidência mundial de infeções fúngicas invasivas teve um aumento significativo nos últimos anos em todo o mundo, com altas taxas de morbilidade e mortalidade, facto que se deve ao aumento de indivíduos suscetíveis submetidos a tratamentos antitumorais de quimioterapia e radioterapia, tratamentos imunossupressores (transplantados, portadores de doenças autoimunes), quebra de barreiras anatómicas (como o uso prolongado de cateter venoso central), procedimentos cirúrgicos invasivos, nutrição parenteral e infeção por VIH (43–45). Embora as novas imunoterapias permitam avanços no tratamento de doenças e aumento da sobrevida, têm sido relatadas infeções como aspergilose, criptococose e histoplasmose (46).

Aliados a esses fatores, também a globalização, urbanização e invasão de habitat conduziu ao contacto entre os nichos geográficos de novos fungos patogénicos e o ser humano (46).

No decorrer da pandemia de *SARS-CoV-2* verificou-se que, na sequência desta infeção, os doentes desenvolveram infeções fúngicas invasivas associadas, tendo o mais documentado sido aspergilose, mucormicose e candidemia (47,48).

Recentemente, foi descrita a espécie *Blastomyces helicus* como responsável por blastomicoses atípicas e disseminadas em humanos e animais de companhia nos estados ocidentais e províncias de América do Norte (46).

No ano de 2017, a OMS criou pela primeira vez uma lista onde classifica os principais fungos resistentes a agentes microbianos, de acordo com alguns critérios, como o grau de severidade da doença causada, possibilidade de emergência de resistências aos antifúngicos e outros desafios

inerentes ao seu tratamento (49). Esta lista de agentes fúngicos patogênicos prioritários representa um esforço mundial face às enormes lacunas no que toca ao conhecimento desses microrganismos, à falta de investimento em investigação, ao crescente risco de ocorrência destas infeções fúngicas, bem como à emergência de resistência aos antifúngicos utilizados no seu tratamento (49).

No esquema da Figura 1 estão representados os 19 fungos prioritários de 2022, divididos em três grupos de prioridade (crítico, alto e médio), destacando-se um nível crítico relativamente a *C. neoformans* e *C. albicans*.

Além destes, *C. auris* multirresistente tem sido uma grande preocupação para o CDC por várias razões, tais como, a dificuldade de identificação com métodos de laboratório padrão e a crescente resistência ao fluconazol, anfotericina B e voriconazol, bem como resistência emergente à caspofungina (46). *A. fumigatus*, um fungo ambiental comum com potencial para infetar os pulmões e o trato respiratório, tem mostrado um aumento na resistência a azóis desde a década de 1990, o que conduz a falhas no tratamento (46).




















Nível de prioridade: crítico	Nível de prioridade: alto	Nível de prioridade: médio
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Figura 1: Grupos prioritários de fungos categorizados pela OMS. Adaptado de: WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action, OMS, 2022 (49)

1.2.1. *Candida spp.*

As leveduras do género *Candida* têm emergido nas últimas décadas como um grave problema, nomeadamente por causarem infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS), devido ao desenvolvimento de resistências aos antifúngicos (15). Por serem agentes patogénicos oportunistas, exploram as fraquezas locais ou sistémicas da resistência do hospedeiro para causar infeções, denominadas candidíases (15).

C. albicans é a espécie de *Candida* mais patogénica e a interação hospedeiro-fungo engloba a virulência do fungo e os mecanismos de defesa do hospedeiro (50). Faz parte da microbiota humana, colonizando maioritariamente o trato gastrointestinal, o trato reprodutor feminino, a cavidade oral e a pele (50). Em indivíduos saudáveis é um comensal em equilíbrio com a restante flora microbiana. Aquando de distúrbios nesse equilíbrio – resultantes, por exemplo, de mudanças de pH, antibioterapia, infeção ou terapia imunossupressora – pode causar infeções superficiais (como candidíase vulvovaginal, orofaríngea e cutânea) ou infeções sistémicas do sangue (candidemia), do coração, do sistema nervoso central e noutros órgãos (51).

A candidíase invasiva tem altas taxas de mortalidade, que variam entre 20% e 50%, mesmo com a terapia antifúngica existente (50,52). A candidemia é a forma mais comum de infeção invasiva relatada em vários países e afeta sobretudo os indivíduos imunocomprometidos, hospitalizados e em unidades de terapia intensiva (50,52,53).

Os fatores de virulência de *C. albicans* são o dimorfismo, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, a produção de enzimas hidrolíticas (como fosfolipases e proteinases), alterações fenotípicas, a obtenção de nutrientes e a formação de biofilmes (54). A patogénese e virulência é determinada de forma direta ou indireta por proteínas codificadas por genes específicos (51,55). Como os tecidos do hospedeiro são uma barreira face à aquisição de nutrientes, *C. albicans* desenvolveu estratégias que lhe permitem obter micronutrientes – por exemplo, na falta de zinco, produz uma proteína ligadora de zinco, codificada pelo gene PRA1, que elimina o zinco dos tecidos (54). Por outro lado, esta obtenção de micronutrientes está, também, associada ao escape do sistema imune do hospedeiro, pois consegue produzir proteínas, como a Pra1, que bloqueiam componentes do sistema de complemento e reduzem a taxa de morte das leveduras (54).

O dimorfismo é um fator determinante para a virulência deste fungo. A transição morfológica de células leveduriformes para hifas determina, segundo vários autores, o seu estado comensal ou patogénico (51,55). Na verdade, imagens histológicas mostram que as células invasoras de *C.*

albicans apresentam hifas que permitem maior capacidade de adesão, invasão e disseminação, e ainda ligação à ferritina, crucial para a aquisição de ferro. Este processo morfológico é regulado por uma rede de vias de transdução de sinal em resposta a estímulos ambientais (51,55).

Os β -glucanos da parede celular são capazes de estimular monócitos e aumentar a produção de citocinas (51). A alteração do pH ambiental é outro mecanismo de virulência desta levedura: acidifica o ambiente através de aminoácidos como fontes de carbono, o que conduz à produção de proteases aspárticas, permitindo-lhes neutralizar o ambiente ácido dos fagossomas dos macrófagos através do fator de transcrição Stp2 (51,56).

Os biofilmes são estruturas tridimensionais, com uma estrutura complexa, formada de células microbianas ligadas a tecidos hospedeiros ou superfícies abióticas, envolvidas numa substância polissacarídica extracelular (EPS, do inglês, *extracellular polysaccharide substance*) (52,57). As diferenças entre os biofilmes e células planctónicas ultrapassam a sua atividade metabólica (52,57,58). Por exemplo, existem proteases produzidas que são reguladas positivamente em células de biofilme, mas não em células planctónicas, conduzindo a padrões de clivagem proteolítica distintos em cada estado de crescimento (51). Na verdade, as células que se dispersam a partir de comunidades em biofilmes maduros mostram virulência e capacidade de adesão superior para formação de novos biofilmes (52,58). Estes são clinicamente relevantes pois permitem às células microbianas que os formam resistir a agressões, como as realizadas pelos antifúngicos convencionais, conferindo-lhes resistência à sua ação (52,57,58).

A maioria das doenças causadas por *C. albicans* está comumente associada a biofilmes, principalmente pela sua constante adesão a cateteres e outros implantes médicos, estando esta levedura classificada pelo CDC como a terceira mais isolada da corrente sanguínea de pacientes hospitalizados com taxa de mortalidade a aproximar-se dos 50% (52,57,58). A matriz extracelular destes biofilmes inclui polissacarídeos como α -manano, β -1,6-glucano e β -1,3-glucano. Embora este último seja o constituinte minoritário, é o principal responsável pela resistência do biofilme aos antifúngicos, através do bloqueio da difusão (57).

O tratamento das infeções provocadas por *C. albicans* tem vindo a tornar-se mais limitado devido ao crescente aumento de resistência a azóis e equinocandinas (51). A ocorrência de resistência a azóis, nomeadamente ao fluconazol, deve-se à superexpressão de bombas de efluxo da membrana celular e à sobreexpressão do gene EGR11, que resulta no aumento da enzima esteroil 14-demetilase (que funciona como resposta à baixa concentração de ergosterol provocada pelo

antifúngico) (59,60). Já a resistência a equinocandinas foi atribuída a mutações no gene Fks1, a subunidade catalítica de β -(1,3)-glucanosintase (57).

Embora *C. albicans* seja a principal responsável de candidíase, a infecção fúngica invasiva mais comum e a terceira infecção mais frequente em doentes hospitalizados, tem ocorrido uma tendência de aumento no número de infecções causadas por outras espécies de *Candida*, nomeadamente *C. krusei*, o que é em parte explicado pelo crescente aumento da resistência das espécies de *Candida* não *albicans* aos antifúngicos, nomeadamente resistência a azóis e formação de biofilmes (61–64).

C. krusei é um fungo dimórfico, amplamente distribuído na natureza, que coloniza as membranas mucosas em indivíduos saudáveis. Em contraste com as restantes espécies de forma ovoide, estas leveduras são normalmente alongadas (65).

É a quinta causa mais comum de candidíase e tem uma grande relevância clínica face à sua resistência intrínseca ao fluconazol e suscetibilidade reduzida a outros antifúngicos, como flucitosina, voriconazol, equinocandinas e anfotericina B (62,66). As mutações nos genes ERG11 e FKS 1 são os principais mecanismos que conduzem a resistência a azóis e equinocandinas e à superexpressão da bombas de efluxo, por exemplo, Abc1p (67).

Os fatores de virulência de *C. krusei* incluem a secreção de proteases, adesinas, reguladores de formação de biofilmes e dimorfismo (68). No entanto, a elucidação dos seus mecanismos é mais limitada, comparativamente com *C. albicans* (68). A sua patogenicidade envolve a adesão a células epiteliais das membranas da mucosa e a células endoteliais, mas não tão eficientemente como *C. albicans* (68). Estudos mostraram que *C. krusei* é produtora de enzimas hidrolíticas como proteínase, fatores hemolíticos e DNase (68). Contrariamente a *C. albicans*, esta levedura produz níveis mais baixos de fosfolipase (68).

Esta levedura também apresenta capacidade de formação de hifas e o seu genoma contém genes putativos dos genes existentes em *C. albicans* (68). Por este motivo, o controlo da transição dimórfica parece ser semelhante em ambas as espécies (68). É também capaz de formar biofilmes, sendo que a atividade metabólica dessas estruturas aumenta a resistência a antifúngicos e é superior aquando da presença de outras espécies de *Candida* não *albicans* (69).

1.2.2. *Cryptococcus neoformans*

As leveduras do género *Cryptococcus* são caracterizadas pela sua forma oval ou redonda e pela existência de uma cápsula. *C. neoformans* é um agente patogénico ubíquo no meio ambiente, quer no ar, quer no solo, em madeira em estado de decomposição e cavidades de árvores (70). Por ser tão comum, a maior parte da população inala pequenas quantidades de esporos ou células leveduriformes transportados pelo ar diariamente, pelo que não existe transmissão inter-humana ou de animais para o ser humano. Na generalidade, quando ocorre em pessoas saudáveis é assintomática ou de sintomatologia ligeira (70,71).

À semelhança de *C. albicans* e *C. krusei*, a maioria dos casos de infeção, denominada criptococose, ocorre em indivíduos imunocomprometidos (por exemplo, com doenças autoimunes, transplantados ou com terapia de corticosteroides) (72). É particularmente grave quando infeta indivíduos com VIH num estado avançado, uma vez que representa uma das principais causas de mortalidade nestes doentes, que se estima entre os 41% e 61% (72).

A criptococose, afeta principalmente os pulmões ou o sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal), sendo a meningite criptocócica potencialmente fatal (73,74). Estima-se que cerca de 152 000 casos de meningite criptocócica são diagnosticados em todo o mundo, por ano, sendo mais frequente em adultos com VIH na África Subsaariana (71). Apesar de ter havido uma redução significativa nos casos de meningite criptocócica associada ao VIH em 2020 em comparação com 2014 – justificada pela expansão da terapia antirretroviral –, apenas com o aumento de esforços para a eficácia do diagnóstico precoce, terapêutica e *screening* será possível a não ocorrência de mortes pela doença até 2030 (72).

Esta levedura reproduz-se de forma assexuada, por gemulação. No entanto, perante condições específicas, como desidratação, pode ocorrer uma transição morfológica de levedura para hifas, permitindo a produção de esporos infecciosos que são tolerantes a situações desfavoráveis e/ou *stress* (75). Como esta alteração está justamente associada ao tipo de reprodução, não foi considerado um fungo dimórfico clássico (classificado de acordo com as condições térmicas) (75). Estudos recentes demonstram que esta transição fenotípica está intimamente ligada ao grau de patogenicidade, sendo considerada um benefício para garantir a sua sobrevivência no organismo hospedeiro (76).

A patogenicidade de *C. neoformans* varia consoante os fatores de virulência das estirpes e os seus genótipos. O principal é a produção de cápsula de polissacarídeos (evidenciada nas células da Figura 2), tendo sido já provado que estirpes sem cápsula são avirulentas (77). Este fator foi

estudado e demonstrou impedir a ação do sistema de complemento e migração de leucócitos, inibir a fagocitose e permitir a replicação no interior das células fagocíticas (como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), inibir a produção de citocinas e alterar a apresentação de antígenos (76,77).

Além disso, enquanto *in vitro* produzem uma pequena cápsula, *in vivo* existem fatores do organismo hospedeiro que as levam a produzir uma cápsula com uma maior espessura. Assim, esta levedura é capaz de modular a espessura da cápsula consoante as condições existentes (78). Deste modo, o grau de encapsulamento e o tempo de duração da infecção depende da resposta do tipo de tecido em que se desenvolve a infecção (76). Por exemplo, dada à sua natureza neurotrópica, a sua multiplicação no sistema nervoso central origina leveduras com cápsula mais espessa, pelo que a sua existência no tecido neural é feita com ausência ou pouca inflamação no seu redor. Esta associação entre a morfologia das leveduras e a resposta imune que é despoletada ainda não se encontra completamente elucidada (76,79).

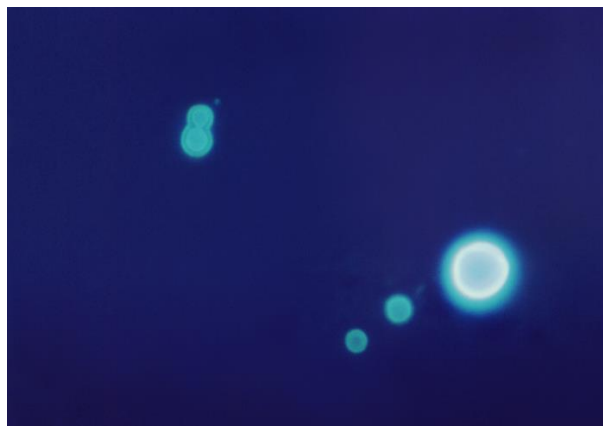


Figura 2: Organismos *Cryptococcus neoformans*, conforme evidenciado pelas células de levedura encapsuladas verdes brilhantes, por uma técnica de fluorescência. Ampliação: 570x.
Fonte: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=20358>

A produção de melanina por oxidação das catecolaminas, que se acumula na parede da célula, confere proteção contra espécies oxidantes libertadas pelas células hospedeiras e exposição a agentes antifúngicos, através da diminuição da permeabilidade da parede celular (71). Também a produção das enzimas urease e fosfolipases (como a PLB1) permite aumentar a aptidão da levedura de sobreviver quando internalizada nos fagossomas e manter a integridade da parede celular fúngica, respetivamente (71,80).

A nível da terapêutica, para a criptococose localizada é utilizado o fluconazol, embora em indivíduos imunocomprometidos seja aplicada a anfotericina B e flucitosina. A resistência antifúngica é pouco compreendida, tendo já sido comprovada a suscetibilidade reduzida ao fluconazol (81).

1.3. Flavonoides

A crescente resistência a antibióticos e antifúngicos tem sido um grande desafio para a comunidade médica e farmacêutica, exigindo a busca por novos compostos com propriedades antimicrobianas. A estratégia passa pela utilização de agentes que atuem sinergicamente, contendo os mecanismos de resistência e diminuindo as doses de antibiótico/antifúngico mínimas para administração e os efeitos tóxicos para os doentes (82).

Vários estudos têm demonstrado o potencial individual ou sinérgico de flavonoides naturais e sintetizados, especialmente contra fungos resistentes a medicamentos (83,84). Os flavonoides são um grupo versátil de compostos que se encontram amplamente distribuídos na natureza como metabolitos secundários de plantas e estão presentes na dieta humana (Figura 3) (83,84). Além do seu grande valor nutricional, as suas propriedades biológicas antioxidantes, antialérgicas e anti-inflamatórias, têm muito potencial antifúngico, razão pela qual têm assumido grande interesse no âmbito da indústria alimentar, farmacêutica e médica (83–86). Os seus níveis de toxicidade são bastante reduzidos e, portanto, são atualmente críticos para o desenvolvimento de novos medicamentos (83–86).



FONTES DE COMPOSTOS FLAVONOIDES

Figura 3: Os compostos flavonoides podem ser encontrados em frutas cítricas, verduras, legumes e grãos, além de bebidas, como chá verde e vinho tinto.

1.3.1. Flavonoides diméricos

Os flavonoides são compostos que existem tanto no estado livre como combinados com um açúcar ou na forma de dímeros. Tendo isto em consideração, podem ser classificados em flavanonas, flavonas, flavonóis e flavanonóis (87,88). Os biflavonoides constituem uma classe de flavonoides diméricos e são ligações de subunidades flavona-flavona, flavanona-flavona ou flavanona-flavanona, unidas de forma simétrica ou assimétrica por meio de um alquil ou uma base ligante de alcoxi de comprimento variável (87,88).

Estes compostos também se dividem em bisflavonoides, quando os dois resíduos são iguais, e em biflavonoides, quando são diferentes. Em alguns, as ligações diméricas podem ser C-C (como na amentoflavona e robustaflavona) ou C-O-C (como hinokiflavona e ochnaflavona) (89).

Em 1929, a ginkgetin, a primeira biflavona, foi separada do arbusto *Ginkgo biloba* por Furukawa e abriu um novo caminho para a descoberta de mais de 500 mil biflavonas, como amentoflavona, agatisflavona, cupressoflavona, hinoquiflavona e robustaflavona (90).

Devido às suas propriedades químicas e biológicas, houve uma grande evolução quanto à sua manipulação, para a identificação e síntese de novos biflavonoides bioativos com características potencializadas (91). Na literatura, os biflavonoides são amplamente relatados pelas suas propriedades farmacológicas, pois apresentam baixa toxicidade para as células humanas, o que abre novas rotas para encontrar e sintetizar novas drogas contra patógenos (91).

Pesquisas recentes relataram extensivamente que a atividade biológica desses compostos é maior do que a dos flavonoides monoméricos, devido ao número excessivo de grupos hidroxilo (91). Apesar de ser um grupo de compostos bastante promissor e uma alternativa para a resistência antimicrobiana, poucos são completamente estudados, com mecanismos de ação elucidados e com toxicidade amplamente investigada (91).

Os flavonoides diméricos podem atuar contra muitos vírus de RNA e DNA, bloqueando diferentes fases do seu ciclo de vida (92). Além disso, podem ser inibidores indiretos ao interagir com as células imunitárias do hospedeiro (93). Estudos relatam a atividade de produtos naturais contra Coronavírus, tendo como alvo principal a replicação viral. Destes, numerosos flavonoides, como a quercetina, geraram forte atividade antiviral, afetando as proteases de *SARS-CoV*, *MERS-CoV* e *SARS-CoV-2* (92). No entanto, os biflavonoides, como a mentoflavona, tornaram-se compostos de interesse devido aos seus importantes efeitos antivirais, principalmente como inibidores de proteases (94). No mundo da investigação, parecem ser mais promissores que os

flavonoides monoméricos devido à sua maior estabilidade físico-química durante os testes e parâmetros farmacocinéticos (92).

Também em infecções parasitárias, responsáveis por uma grande sobrecarga nos sistemas de saúde e que afetam milhões de pessoas em todo o mundo, já existem evidências da atividade dos compostos flavonoides diméricos (1,2). Por exemplo, as braquidinas B e C – compostos centrais neste estudo – demonstraram ser capazes de inibir a invasão de *Trypanosoma cruzi* e a sua multiplicação intracelular nas células hospedeiras, reduzindo a parasitemia e, em *Leishmania amazonensis*, reduziram o número de amastigotas e macrófagos infetados, apresentando também um efeito sinérgico com a anfotericina B (1,2).

Como já mencionado no capítulo 1.2, os vários problemas associados aos antifúngicos, como uso prolongado, aquisição de resistência, toxicidade e efeitos adversos, tornam os flavonoides diméricos uma estratégia pela atividade antifúngica inerente (Tabela 4).

Tabela 4: Exemplos de fungos inibidos por biflavonoides.

Fungo	Composto	Conclusões	Referência Bibliográfica
<i>Candida albicans</i>	Amentoflavona	Atividade fungistática. Afeta o progresso do ciclo celular das células durante a fase S.	(95)
		Interrompe a transição dimórfica. Aumenta o nível intracelular de trealose que induz resposta ao stresse em células fúngicas.	(96)
	Quercetina	Inibe a aderência fúngica e a formação de biofilme.	(97)
<i>Aspergillus flavus</i>	Amentoflavona	Inibir a produção de aflatoxina B1 e aflatoxina B2.	(98)
	Tetrametoxi-6,6"-bigenkwanin		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Isoginkgetin	Não demonstrou efeito deletério no ensaio de citotoxicidade em linhagens celulares.	(88)
<i>Cryptococcus neoformans</i>			

Os flavonoides diméricos podem formar complexos com proteínas solúveis nas paredes celulares dos fungos e a natureza lipofílica desses compostos torna-os capazes de romper as membranas fúngicas (99,100).

Vários estudos demonstraram também efeitos antibacterianos de compostos flavonoides diméricos contra estirpes bacterianas para as quais existe um crescente aumento de resistência, derivado, principalmente, da antibioterapia excessiva e desregrada (91). Na Tabela 5 estão apresentadas algumas bactérias para as quais alguns compostos evidenciaram efeito antimicrobiano.

Tabela 5: Exemplos de bactérias inibidas por biflavonoides.

Bactéria	Composto	Conclusões	Referência Bibliográfica
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,4',7'',4'''- Tetramethoxy amentoflavone	A natureza lipofílica das moléculas e o peptídeo poroso externo da estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas determinou o seu efeito. Nas bactérias Gram-negativas a inibição é menor. Ausência de citotoxicidade contra a linhagem celular renal do macaco-verde.	(88)
<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Macrophyloflavone</i> 18	Inibe a síntese de ácidos nucleicos, a função da membrana citoplasmática, o metabolismo energético e as porinas nas membranas celulares	(101)
<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Manniflavanone</i> GB3	Mecanismo de ação não elucidado.	(102)
<i>Bacillus subtilise</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	Agatisflavona 2, amentoflavona 1, e tetrahydroamentoflavone	Inibição da formação de biofilme. Dimerização e um anel C reduzido conduziu a uma maior atividade dos compostos.	(103)

Tabela 5: Exemplos de bactérias inibidas por biflavonoides.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	Ochnaflavone 15b and ochnaflavone 7-O-methyl ether 15c	Baixa toxicidade. Mais eficazes contra bactérias Gram-negativo.	(104)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Amentoflavona	Mecanismo de ação não elucidado. Espécies reativas de oxigênio ou stresse osmótico não foram os responsáveis pela morte bacteriana.	(105)

1.4. *Arrabidaea brachypoda*

O Brasil é um país caracterizado pela sua grande biodiversidade em plantas e pela existência de vários biomas, como a Amazônia e o Cerrado (a savana brasileira central), que são comumente utilizadas na medicina tradicional (106). No entanto, ainda existem inúmeras plantas para as quais ainda não foi estudada a bioatividade e potencialidade terapêutica (106).

As plantas do gênero *Arrabidaea* destacam-se por possuírem vários compostos, como flavonoides, antocianinas, alantoínas e triterpenos, com propriedades anti-inflamatórias, anti tumorais, antimicrobianas e promotoras da cicatrização (2,107,108). Estudos recentes têm demonstrado a sua potencialidade como protetor gástrico *in vivo* (107). Um fator que as tornou importantes no mundo da medicina tradicional é a sua capacidade de reduzir a dor e a inflamação nos casos de artrite e tratamento em casos de litíase renal (2).

Do arbusto *Arrabidaea brachypoda* (D.C.), nativo da região brasileira de Cerrado, foi preparado um extrato hidroetanólico (RAB) e, a partir deste, uma fração obtida através do uso de diclorometano (RAB-DCM) (107). Do fração RAB-DCM foram isolados três flavonoides diméricos denominados agliconas: braquidina A, braquidina B e braquidina C (Figura 4). Nos extratos RAB e RAB-DCM, estas três moléculas flavonoides diméricas existem sob a forma glucoronada (107).

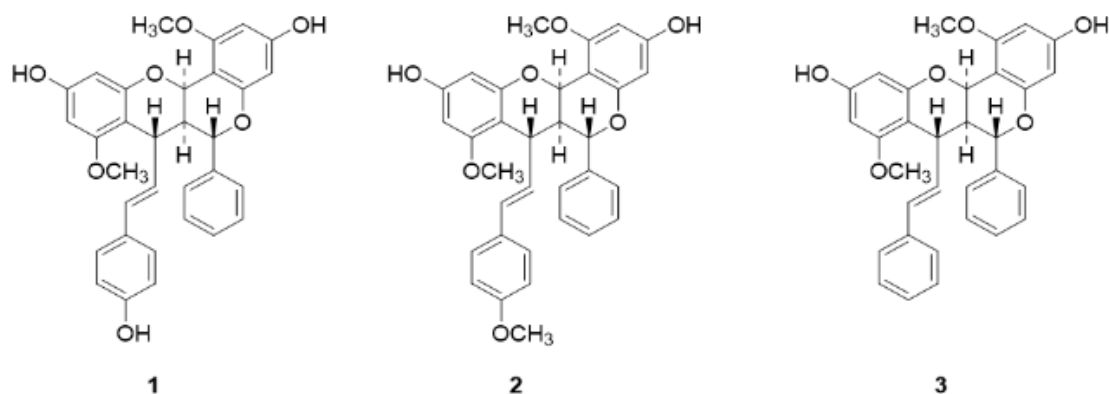


Figura 4: Representação da estrutura química dos compostos flavonoides diméricos extraídos das raízes de *Arrabidaea brachypoda*. 1 – Braquidina A, 2 – Braquidina B, 3 – Braquidina C. [Reproduzido com autorização de Da Rocha et al. (1,2)]

1.5. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é determinar o efeito antimicrobiano de extratos e compostos flavonoides diméricos isolados das raízes de *Arrabidaea brachypoda*.

Neste contexto, os objetivos específicos são os seguintes:

- Testar a atividade antibacteriana e antifúngica de um extrato hidroetanólico, RAB, e da sua fração apolar, RAB-DCM;
- Determinar a atividade antibacteriana e antifúngica das moléculas flavonoides diméricas braquidina A, braquidina B e braquidina C;
- Investigar possíveis mecanismos de ação dos compostos e a sua possível interferência com os fatores de virulência dos microrganismos testados;
- Avaliar as propriedades anti-inflamatórias e citotoxicidade dos extratos RAB e RAB-DCM e dos compostos flavonoides diméricos.

2. Métodos

Este projeto constitui um estudo experimental realizado através de estudos *in vitro*. A amostra em estudo é constituída por extratos e compostos flavonoides diméricos que foram testados em bactérias e leveduras. Na Tabela 6 encontram-se as estirpes de bactérias e fungos selecionadas e recomendadas pelo manual do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CSLI, do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*), para os ensaios de acordo com os objetivos a serem alcançados.

Tabela 6: Estirpes de referência de bactérias e leveduras utilizadas.

Microrganismos	Estirpe
<i>Staphylococcus aureus</i> metilina sensível	ATCC® 29213 V459 ^a
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 10231
<i>Candida krusei</i>	ATCC® 6258
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CECT 1078 ^b

ATCC®, *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura Norte Americana); CECT, Coleção espanhola de Culturas Tipo (*Colección Espanola de Cultivos Tipo*). ^a*Staphylococcus aureus* V459 equivalente a *S. aureus* ATCC 25923. Material de referência do ielab Calidade, S.L. de Alicante, Espanha. ^bGentilmente cedido pela Professora Doutora Maria Eugénia Ribeiro Pinto, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Estas estirpes foram testadas com os extratos de compostos flavonoides e flavonoides diméricos isolados, tal como resumido na Tabela 7.

Tabela 7: Extratos e compostos flavonoides diméricos extraídos de *Arrabidaea brachypoda*.

Produtos de <i>A. brachypoda</i>	Descrição	Origem	Método de extração
RAB e RAB-DCM	Extratos	Raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	Da Rocha et al., 2014 (1).
Braquidinas A, B e C	Compostos flavonoides diméricos		Da Rocha et al., 2014 (1).

Para efeitos da validação da técnica do ensaio de microdiluição em caldo, utilizaram-se como controlos internos os agentes antimicrobianos listados na Tabela 8.

Tabela 8: Controlos para o ensaio de microdiluição em caldo.

Controlos da técnica	Origem	Intervalos de concentração
Gentamicina	Sigma-Aldrich, Missouri, EUA	<i>E. coli</i> ATCC® 25922: 0,25-1,0 (109)
Cetoconazol		<i>S. aureus</i> ATCC® 25922: 0,12-1,0 (109)
		<i>C. krusei</i> ATCC® 6258: 0,25-1,0 (109)

2.1. Testes de suscetibilidade

Numa primeira fase, a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e de compostos flavonoides diméricos isolados, em bactérias e leveduras, foi determinada pelo método de microdiluição descrito pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Deste modo, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI), definida como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu, de forma completa, o crescimento visível do microrganismo testado nos poços de microdiluição. Para diferenciação do efeito bacteriostático/fungistático do efeito bactericida/fungicida, determinou-se a concentração mínima letal (CML) a partir dos poços sem crescimento visível (110,111).

Todos os procedimentos seguiram os requisitos e recomendações mencionados pelas normas de referência M7-A6 e M27-A3, para bactérias e leveduras, respetivamente, do CLSI (110,111). Todos os ensaios foram repetidos, de forma independente. Antes de cada ensaio foi realizada uma subcultura de 24 horas em agar de *Sabouraud dextrose* (SDA, do inglês, *Sabouraud dextrose agar*) ou agar de *Mueller Hinton* (MHA, do inglês, *Mueller Hinton agar*), de forma a atingir as condições exponenciais de crescimento e de pureza das culturas.

2.1.1. Ensaio de suscetibilidade por microdiluição em caldo para Bactérias

Diluição dos antimicrobianos

Para avaliar a suscetibilidade das bactérias selecionadas à ação dos extratos hidroetanólicos, dos compostos flavonoides do extrato diclorometano e da gentamicina, foram preparadas soluções-stock. O cálculo utilizado para a massa de cada composto foi o seguinte:

$$\text{Massa (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mL})}$$

Na Tabela 9 estão indicados os solventes, os diluentes e as concentrações das soluções *stock* e de trabalho de cada composto utilizado.

Tabela 9: Antimicrobianos e respectivos solventes, diluentes e concentração das soluções utilizados em bactérias.

Antimicrobiano/composto	Solvente	Diluyente	Concentração solução <i>stock</i>	Concentração solução trabalho
Extrato RAB e RAB-DCM	DMSO	MHB	256,0 µg/mL	1024,0 µg/mL
Compostos BRA-A, BRA-B e BRA-C			10,0 mmol/L	100,0 µmol/mL
Gentamicina	Água		50,0 µg/mL	16,0 µg/mL

DMSO, Dimetilsulfóxido (*Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA); MHB, *Mueller Hinton broth* (*Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA). Os extratos e compostos oriundos do Brasil foram gentilmente cedidos pelos investigadores da Universidade Federal do Maranhão, o professor Rui Gil da Costa, Cláudia Quintino da Rocha e Haissa Oliveira Brito.

Em cada ensaio, os compostos foram testados em duplicado. Para efeitos da avaliação da precipitação dos antimicrobianos – uma potencial causa de interferência na leitura dos resultados por turvação –, adicionou-se um terceiro poço (branco) aos ensaios.

Assim, na primeira linha de uma microplaca de 96 poços de fundo plano, foram adicionados a cada conjunto de três poços, 100 µL de cada solução de composto antimicrobiano. Nos poços das restantes linhas de cada coluna foram adicionados 50 µL de caldo de *Mueller Hinton* (MHB, do inglês, *Mueller Hinton broth*).

Para cada composto foram realizadas diluições de 1:2. No caso dos extratos RAB e RAB-DCM o intervalo de concentrações foi de 1024,0 µg/mL até 16,0 µg/mL; para a gentamicina foi de 16 µg/mL até 0,125 µg/mL e para os três compostos flavonoides diméricos o intervalo foi de 100,0 µmol/L até 0,781 µmol/L. Atendendo a que o volume final de cada poço era de 100 µL, adicionou-se 50 µL de MHB nos poços dos brancos.

Na penúltima coluna, como controlos positivos, adicionaram-se a todos os poços 50 µL de MHB. Na última coluna, como controlos negativos adicionaram-se a 4 poços 100 µL de meio MHB e noutros 4 poços 100 µL de DMSO.

Preparação dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas de *S. aureus* ATCC® 29213, *S. aureus* V459 e *E. coli* ATCC® 25922 foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas em MHA (*Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA). Com recurso ao densitómetro *Densimat* (*bioMérieux*, Marcy-l'Étoile, França), preparou-se em soro fisiológico uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 na escala de *McFarland* (o que corresponde, aproximadamente, a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, realizou-se uma diluição de 1:10, em meio MHB. A cada poço, exceto nos de controlo negativo e brancos, adicionou-se 50 µL da suspensão de cada bactéria, sendo a concentração por poço de $1,0 \times 10^4$ UFC/poço.

Incubação e Leitura dos Resultados

As microplacas foram incubadas a $(35,0 \pm 2,0)$ °C, sem agitação, durante 16–20 horas. Findo o período de incubação, procedeu-se à leitura dos resultados, comparando-se visualmente a quantidade de crescimento nos poços que continham os compostos com a quantidade de crescimento nos poços de controlo de crescimento.

Para a validação do ensaio, verificaram-se duas condições: os controlos positivos (sem antimicrobiano), apresentavam crescimento, o que assegurou a viabilidade dos microrganismos em teste, e os controlos negativos (controlos de esterilidade) não apresentavam crescimento, garantindo que os reagentes usados não estavam contaminados e que a técnica foi bem executada. Os poços dos controlos positivos funcionaram como controlos de crescimento, pelo que a turbidez existente foi utilizada para determinar os pontos finais de crescimento nos poços, confirmando-se a leitura visual da turvação com o recurso à lupa *Leica EZ4 D* (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemanha).

Determinação da Concentração Mínima Letal

De cada poço com ausência de crescimento, 10 µL foram transferidos para placas de MHA, incubadas a $(35,0 \pm 2,0)$ °C, sem agitação, durante 24 horas. O resultado obtido correspondeu à menor concentração que matou, pelo menos, 99,9% dos inóculos iniciais.

2.1.2. Ensaio de suscetibilidade por microdiluição em caldo para leveduras

Diluição dos antimicrobianos

Para avaliar a suscetibilidade das leveduras selecionadas à ação dos extratos hidroetanólicos, dos compostos flavonoides e do Cetoconazol (*Sigma-Aldrich, Missouri, EUA*), foram preparadas soluções-stock e de trabalho, conforme a informação que consta da Tabela 10. As soluções de trabalho dos compostos foram obtidas numa diluição de 1:10 da solução-stock em caldo *Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640)*, com L-glutamina, sem bicarbonato e com indicador de pH vermelho de fenol (*Biochrom AG, Berlim, Alemanha*), suplementado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanossulfónico).

Tabela 10: Antimicrobianos e respetivos solventes, diluentes e concentração das soluções utilizados em leveduras.

Antimicrobiano/composto	Solvente	Diluyente	Concentração solução stock	Concentração solução trabalho
Extrato RAB e RAB-DCM	DMSO	Caldo de RPMI-1640	256,0 mg/mL	1024,0 µg/mL
BRA-A, BRA-B e BRA-C			10,0 mmol/L	100,0 µmol/L
Cetoconazol			1280,0 mg/mL	16,0 µg/mL

DMSO, dimetilsulfóxido (*Sigma-Aldrich, Missouri, EUA*); Caldo de RPMI-1640 (RPMI-1640 broth) com L-glutamina, sem bicarbonato e com o indicador de pH fenol vermelho (*Biochrom AG, Berlin, Germany*).

Em cada ensaio, os compostos foram testados em duplicado, utilizando-se, tal como referido para as bactérias, um branco para avaliar a possível precipitação.

Deste modo, na primeira linha de uma microplaca de 96 poços, foram adicionados a cada conjunto de três poços, 200 µL de cada solução de composto antimicrobiano. Nas restantes linhas adicionou-se 100 µL de meio de cultura RPMI-1640.

Para cada composto foram realizadas diluições de 1:2: no caso dos extratos RAB e RAB-DCM o intervalo de concentrações foi de 1024,0 µg/mL até 16,0 µg/mL; para o cetoconazol foi de 16 µg/mL até 0,125 µg/mL e para os três compostos flavonoides diméricos o intervalo foi de 100,0 µmol/L até 0,781 µmol/L. Atendendo a que o volume final seria de 200 µL, adicionou-se 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 aos poços dos brancos.

Na penúltima coluna, como controlos positivos, adicionaram-se a todos os poços 100 µL de meio de cultura RPMI-1640. Na última coluna, como controlos negativos adicionaram-se a 4 poços 200 µL de meio de cultura RPMI-1640 e noutros 4 poços 200 µL de DMSO.

Preparação dos inóculos de levedura

As suspensões de levedura de *C. albicans* ATCC® 10231, *C. krusei* ATCC® 6258 e *C. neoformans* CECT 1078 foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas em SDA. Preparou-se em soro fisiológico uma suspensão com uma turvação de 0,5 na escala de *McFarland* (aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Em seguida, realizaram-se duas diluições de 1:50 e de 1:20 e, a cada poço da placa, exceto nos de controlo negativo e brancos, adicionou-se 100 µL da suspensão de cada levedura.

As placas de *C. albicans* ATCC® 10231 e *C. krusei* ATCC® 6258 foram incubadas a $(35,0 \pm 2,0)$ °C, sem agitação, durante 46–50 horas. Quanto às placas de *C. neoformans* CECT 1078, a incubação a $(35,0 \pm 2,0)$ °C teve a duração de 70–74 horas, sem agitação, devido ao seu crescimento lento.

Incubação e Leitura dos Resultados

Findo o período de incubação procedeu-se à validação dos ensaios e à leitura dos resultados, utilizando-se os critérios descritos no ponto 2.2.5.

Determinação da Concentração Mínima Letal

A concentração mínima letal foi determinada através da transferência de 10 µL dos poços em que não existiu crescimento visível para uma placa de SDA. Após incubação a $(35,0 \pm 2,0)$ °C por 48 horas, a CML foi definida como a menor concentração que matou pelo menos 99,9% dos inóculos iniciais.

2.2. Avaliação do mecanismo de ação da Braquidina C

2.2.1. Interferência com a atividade da Desoxirribonuclease

O teste da DNase tem como objetivo a deteção da degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*) (19,112). Para avaliar o efeito inibitório da atividade da DNase dos compostos flavonoides, inocularam-se 10 µL dos poços do ensaio de CMI com concentrações sub-inibitórias de composto Br C numa placa de ágar de DNase. Como controlo positivo foi utilizada a bactéria *S. aureus* não exposta ao composto e como controlo negativo meio MHB.

A inoculação foi feita em pontos definidos, sem estriamento. Após 24 horas de incubação a $(35,0 \pm 2,0)$ °C, o meio foi inundado com ácido clorídrico (HCL; 1N), deixando-se o ácido penetrar em toda a superfície do meio (19,112).

O aparecimento de uma zona transparente de DNA despolimerizado em torno do crescimento bacteriano, indicava um resultado positivo, revelando colónias produtoras de DNase. A ausência dessa produção traduzia-se na opacidade/turvação do ágar devido à precipitação de DNA intacto (19,112).

2.2.2. Interferência com a atividade da Catalase

Para determinar a atividade da enzima catalase em *S. aureus*, através da intensidade de degradação do H₂O₂ em água e oxigénio, procedeu-se à centrifugação e lavagem com PBS dos poços do ensaio de CMI com concentrações sub-inibitórias (½ e ¼ da CMI) de composto B C (113). Em seguida, transferiu-se 100 µL de cada poço para uma microplaca contendo 100 µL de H₂O₂ a 3%. Os resultados positivos com formação de bolhas foram avaliados atribuindo-se *scores* à sua intensidade: ao controlo positivo atribuiu-se a intensidade de 4+ e compararam-se os restantes poços com esse controlo, atribuindo-se intensidades de 4+, 3+, 2+ e + (113).

Como controlo positivo foi utilizada a bactéria não exposta ao composto e como controlo negativo meio MHB.

2.2.3. Interferência com a atividade da Coagulase

Para determinar a atividade da coagulase nas estirpes de *S. aureus* foi utilizada uma microplaca de fundo em U. A cada poço adicionou-se 50 µL de cada diluição sub-inibitória do composto Br C inoculada com *S. aureus* – provenientes do ensaio de microdiluição em caldo – e 50 µL de soro de coelho. Como controlo positivo foi utilizada a bactéria *S. aureus* não exposta ao composto. Após 24 horas de incubação a (35,0 ± 2,0) °C, avaliou-se a formação de coágulos.

2.3. Atividade citotóxica e anti-inflamatória

2.3.1. Citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos primários

Para avaliar um possível efeito tóxico contra linhagens de células humanas, avaliou-se a viabilidade de fibroblastos dérmicos humanos primários (HDFa) expostos aos extratos RAB e RAB-DCM e às três braquidinas, através do ensaio de MTT (sal brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio; *Sigma-Aldrich*, Missori, EUA), baseado na atividade da desidrogenase mitocondrial ativa em células vivas. Começou-se por tripsinizar as culturas de células em monocamada e centrifugaram-se as células a 1500 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 5 mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture* (DMEM:F12; 1:1; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e gentamicina (1 μ g/mL). Preparou-se uma diluição de 1:10, com 50 μ L da suspensão celular e 450 μ L de corante, e encheu-se uma câmara de *Neubauer*, procedendo-se à contagem das células. A determinação do número de células/mL foi feita da seguinte forma:

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Em seguida, calculou-se o número total de células, multiplicando-se pelo volume total da suspensão celular e ajustou-se o seu volume.

Em microplacas de 96 poços com fundo plano, distribuíram-se 100 μ L da suspensão celular por cada poço, que incubaram durante 24 horas a (37,0 \pm 2,0) $^\circ$ C e em atmosfera húmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Em seguida, retirou-se o sobrenadante e as células foram tratadas, em diferentes ensaios, com 100 μ L de concentrações crescentes dos extratos RAB e RAB-DCM (256 a 2 μ g/mL) e dos compostos Br A, B e C (100 a 3,125 μ mol/L), em triplicado. Como controlo negativo para citotoxicidade, somente meio foi adicionado às células. Após 24 horas de incubação, removeram-se os sobrenadantes e adicionou-se 100 μ L de uma solução de MTT a 0,2 mg/mL e incubou-se durante 4 horas. Por fim, removeram-se os sobrenadantes e os cristais de formazan (partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o reagente MTT), foram solubilizados com 100 μ L/poço de DMSO. Após 10 minutos em agitação leu-se a densidade ótica (DO) no leitor de microplacas *STAT FAX 3200* (*Awareness Technology*, Florida, EUA).

Os resultados foram expressos como percentagem (%) de viabilidade celular em relação ao controlo positivo e citotoxicidade através das seguintes fórmulas:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Média da DO do extrato numa determinada concentração} \times 100}{\text{Média da DO do controlo positivo}}$$

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = 100 - \% \text{ viabilidade}$$

Esta técnica foi realizada três vezes em duplicado para cada extrato e compostos testados.

2.3.2. Interferência na produção de óxido nítrico (NO) pela linha celular de macrófagos RAW264.7

A atividade anti-inflamatória dos extratos RAB e RAB-DCM e das três braquidinas foi avaliada com base na sua capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos da linhagem celular RAW264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS, do inglês, *Lipopolysaccharides*; Sigma-Aldrich, Missori, EUA). A produção de nitritos pelas células, libertados para o sobrenadante do poço, em resultado da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, é medida através do reagente de Griess.

Começou-se por efetuar a raspagem das células de três culturas desta linhagem e centrifugou-se a 1500 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em meio de cultura DMEM:F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal e gentamicina. Numa câmara de *Neubauer* procedeu-se à contagem das células, calculando-se a concentração celular que foi ajustada para $1,5 \times 10^5$ células/mL.

As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços de fundo plano (1×10^6 células/200µL/poço) e incubadas a $(37,0 \pm 2,0)$ °C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂, durante 2 horas. Findo esse período, removeu-se o sobrenadante e as células foram tratadas, em diferentes ensaios, com 100 µL dos extratos RAB e RAB-DCM (nas concentrações de 256,0 a 2,0 µg/mL) e dos compostos Br A, B e C (nas concentrações de 100,0 a 3,125 µmol/L), em triplicado. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de LPS a 0,5 µg/mL, aos poços que continham células. Como controlo negativo para a produção de óxido nítrico, adicionou-se meio e como controlo positivo adicionou-se LPS às células. Para cada composto testado, foi feita uma linha de brancos para cada diluição.

As microplacas foram incubadas a $(37,0 \pm 2,0)$ °C em atmosfera húmida com 5% de CO₂ por 24 horas. Após incubação, o sobrenadante dos poços foram transferidos para novas microplacas e

adicionou-se o reagente de Griess (diluição de 1:1 de uma solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% (v/v) e naftilenediamina a 0,1% em água). Após 30 minutos de incubação no escuro, determinaram-se as densidades óticas no leitor de microplacas *STAT FAX 3200* (*Awareness Technology*, Florida, EUA) a 545/630 nm.

$$\text{Produção (\%)} = \frac{\text{Média da DO do extrato numa determinada concentração} \times 100}{\text{Média da DO do controle positivo}}$$

$$\text{Inibição da produção (\%)} = 100 - \% \text{ produção}$$

Nas microplacas com as células, procedeu-se à realização do ensaio de MTT, como descrito no ponto 2.3.1. e determinaram-se as densidades óticas.

Esta técnica foi realizada três vezes em duplicado para cada extrato e composto testado.

2.4. Tratamento/análise de dados

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do programa informático Microsoft® Excel (Microsoft®, Washington, Estados Unidos da América) e do software SPSS® versão 28.0, Statistical Package for the Social Sciences (IBM®, Nova Iorque, Estados Unidos da América).

Na análise dos resultados foi realizada a estatística descritiva. Na estatística inferencial, vendo-se cumpridos os pressupostos paramétricos das variáveis, utilizou-se o teste t de *Student*. O nível de significância usado foi de $\alpha = 0,05$, considerando-se uma diferença como estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

2.5. Questões Éticas

Nem participantes humanos, nem amostras humanas, nem animais foram usados neste estudo pelo que as questões éticas não se aplicam neste trabalho.

3. Resultados

Nesta secção, os resultados encontram-se estratificados consoante os ensaios laboratoriais realizados: ensaios de suscetibilidade por microdiluição em caldo, avaliação do mecanismo de ação da braquidina C e análise da citotoxicidade e atividade anti-inflamatória.

3.1. Testes de suscetibilidade

A concentração mínima inibitória (CMI) de extratos flavonoides foi determinada em bactérias e leveduras, estando os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Atividade antimicrobiana (concentração mínima inibitória) dos extratos RAB e RAB-DCM.

Microrganismos		CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
		Extratos	
		RAB	RAB-DCM
Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC [®] 29213	128,0 \pm 0,0	26,7 \pm 5,3
	<i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 25922	> 1024,0 \pm 0,0	
Levedura	<i>Candida albicans</i> ATCC [®] 10231		
	<i>Candida krusei</i> ATCC [®] 6258		
	<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT [®] 1078		

n = 3 ensaios independentes. CMI, concentração mínima inibitória; ATCC[®], Coleção de Cultura Norte Americana (*American Type Culture Collection*); CECT, Coleção espanhola cultura de cultivos tipo (Colección Española de Cultivos Tipo). Os resultados são apresentados como média \pm sd. Os ensaios foram validados pela presença de crescimento nos poços de controlo positivo e pela ausência de crescimento nos poços de controlo negativo. A atividade do antifúngico cetoconazol em *C. krusei* foi usada como controlo de qualidade dos testes de atividade antifúngica e a atividade antibacteriana da gentamicina em *S. aureus* como controlo de qualidade dos testes de atividade antibacteriana.

De acordo com a Tabela 11, houve inibição de crescimento para *S. aureus* ATCC[®] 29213, sendo o melhor resultado referente ao extrato RAB-DCM (CMI = 26,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A concentração mínima letal para os extratos RAB e RAB-DCM foi, respetivamente, 1024,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 128,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Deste modo, à concentração de CMI de 128,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o extrato RAB e de 26,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o extrato

RAB-DCM, a atividade é bacteriostática. Já nas concentrações de CML referidas para ambos os extratos, a sua atividade é bactericida.

Quanto às estirpes de leveduras utilizadas, verificou-se que os extratos RAB e RAB-DCM não apresentaram atividade inibitória, mesmo à concentração máxima testada (1024,0 µg/mL).

Atendendo a que a fração RAB-DCM foi muito ativa contra a estirpe MSSA testada, seguiu-se o *screening* dos três compostos flavonoides que se isolaram a partir dela (Tabela 12).

Tabela 12: Atividade antimicrobiana (concentração mínima inibitória) dos compostos flavonoides diméricos.

Microorganismos		CMI (µM/L)		
		Braquidinas		
		Br A	Br B	Br C
Bactéria	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	50,0 ± 30,6 ^a	60,0 ± 22,4 ^a	12,5 ± 0,0 ^a
	<i>Staphylococcus aureus</i> V459	100,0 ± 0,0 ^b	≥ 100,0 ± 0,0 ^b	75,0 ± 28,9 ^b
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	> 100,0 ± 0,0 ^c		
Levedura	<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231			
	<i>Candida krusei</i> ATCC® 6258			
	<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT® 1078			

^an = 5, ^bn = 4, ^cn = 2 ensaios independentes. CMI, concentração mínima inibitória; ATCC®, Coleção de Cultura Norte Americana (*American Type Culture Collection*); CECT, Coleção espanhola cultura de cultivos tipo (*Colección Española de Cultivos Tipo*). Os resultados são apresentados como média ± sd. Os ensaios foram validados pela presença de crescimento nos poços de controlo positivo e pela ausência de crescimento nos poços de controlo negativo. A atividade antibacteriana da gentamicina em *S. aureus* e *E. coli* foi usada como controlo de qualidade para bactérias e a do cetoconazol como controlo de qualidade para as leveduras.

Nenhum dos três compostos foi ativo contra as leveduras e a bactéria Gram-negativo testadas, mesmo na concentração máxima de 100,0 µM/L. No entanto, os compostos inibiram o crescimento das bactérias MSSA testadas, tendo a braquidina C sido o composto mais ativo em MSSA ATCC 29213 (CMI = 12,0) e em MSSA V459 (CMI = 75,0).

Dado que a concentração mínima letal para os três compostos flavonoides diméricos obtida foi superior a 100,0 $\mu\text{M}/\text{L}$, a sua atividade foi bacteriostática.

Atendendo a estes resultados, foi escolhida a Br C para progressão dos ensaios e averiguação de possíveis mecanismos de ação contra MSSA ATCC 29213.

3.2. Avaliação do mecanismo de ação da Braquidina C

Para avaliar o mecanismo de ação do composto Br C foi testada a interferência com a atividade das enzimas DNase, coagulase e catalase. Em relação à atividade de DNase em *S. aureus* ATCC 29213 apresentada na Tabela 13, os halos de inibição obtidos para o controlo positivo e os das bactérias tratadas com 1/2 CMI foram significativamente diferentes ($p = 0,014$).

Tabela 13: Ensaio da DNase em MSSA ATCC 29213.

Estirpe	Amostra	DNase (halos em mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Controlo Positivo	21,0 \pm 1,8
	1/2 CMI	18,8 \pm 2,1*
	1/4 CMI	19,4 \pm 1,5

n= 5; *P < 0,05 (teste T *student* para amostras emparelhadas).

Quanto à enzima coagulase, verificou-se formação de coágulo, tanto pelas bactérias tratadas com 1/2 e 1/4 CMI de Br C, como pelas bactérias não tratadas dos controlos, não havendo inibição da sua atividade.

Por outro lado, os resultados da Tabela 14 mostram uma inibição em torno de 90% da atividade enzimática da catalase, após atribuição de uma escala de intensidade de efervescência, quando as bactérias foram expostas às concentrações de 1/2 e 1/4 da CMI, comparativamente com os resultados dos controlos positivos (ao qual foi atribuída a máxima efervescência) e dos controlos negativos, tal como ilustrado na Figura 5.

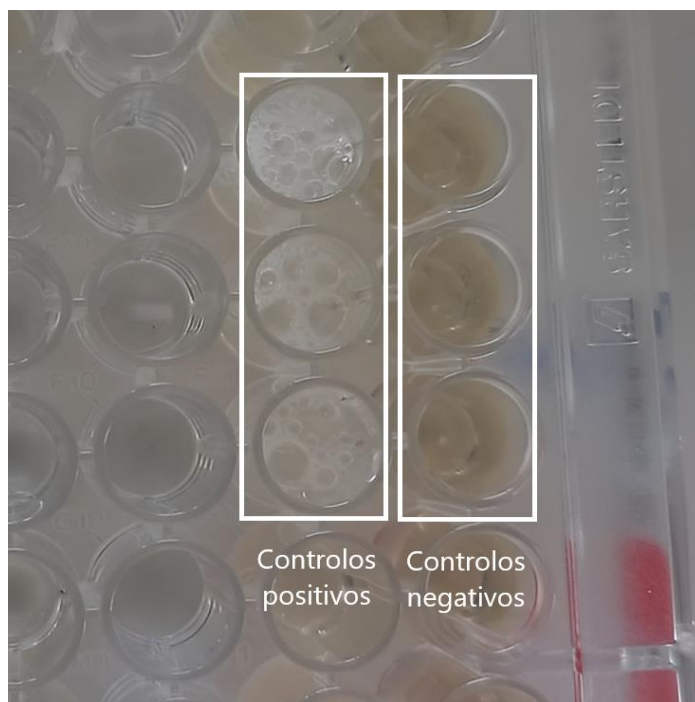


Figura 5: Ensaio de catalase em MSSA ATCC 29213. Na figura é visível a efervescência obtida nos poços de controlo positivo comparativamente aos poços de controlo negativo.

Tabela 14: Ensaio de catalase em MSSA ATCC 29213

Estirpe	Amostra (n=4)	Score de efervescência
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Controlo Positivo	++++
	1/2 CMI	+
	1/4 CMI	+

3.3. Atividade citotóxica e anti-inflamatória

3.3.1. Citotoxicidade em fibroblastos dérmicos humanos primários

Na avaliação de um possível efeito tóxico contra linhagens de células humanas dos extratos RAB e RAB-DCM, averiguou-se que, para o extrato RAB, a viabilidade celular foi >70% a partir da concentração de 128 µg/mL. Quanto ao extrato RAB-DCM, níveis de concentração ≤32 µg/mL, não afetam a viabilidade desta linha celular HDFa (viabilidade > 80%), como mostra a Figura 6.

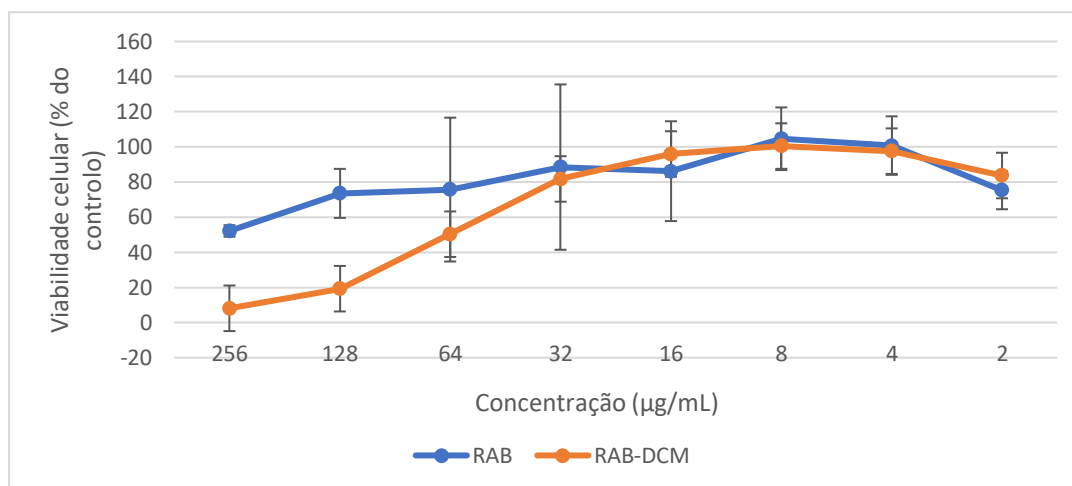


Figura 6: Viabilidade de células HDFa quando expostas aos extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)

Quanto aos três compostos flavonoides diméricos, a braquidina A mostrou ser o composto menos tóxico (viabilidade > 80%) a concentrações ≤ 50,0 µmol/L, enquanto as braquidinas B e C apresentaram viabilidade > 90% a concentrações ≤ 25,0 µmol/L (Figura 7).

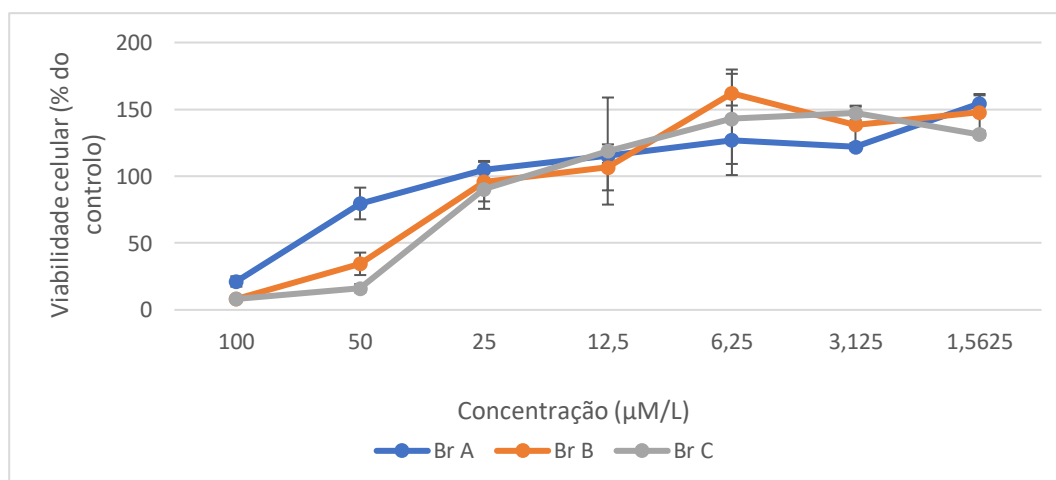


Figura 7: Viabilidade de células HDFa quando expostas às braquidinas. (n=3)
Abreviaturas: braquidina A (Br A), braquidina B (Br B) e braquidina C (Br C).

3.3.1. Interferência na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS

A produção de NO por macrófagos representa ativação e inflamação. O efeito dos extratos RAB e RAB-DCM na produção de NO por macrófagos murinos RAW264.7 estimulados por LPS foi avaliado (Figuras 8 e 9). Enquanto o extrato RAB não demonstrou taxas de inibição superiores a 70%, o extrato RAB-DCM reduziu a produção de NO sem afetar a viabilidade desta linhagem celular, até uma concentração aproximada de 32 µg/mL.

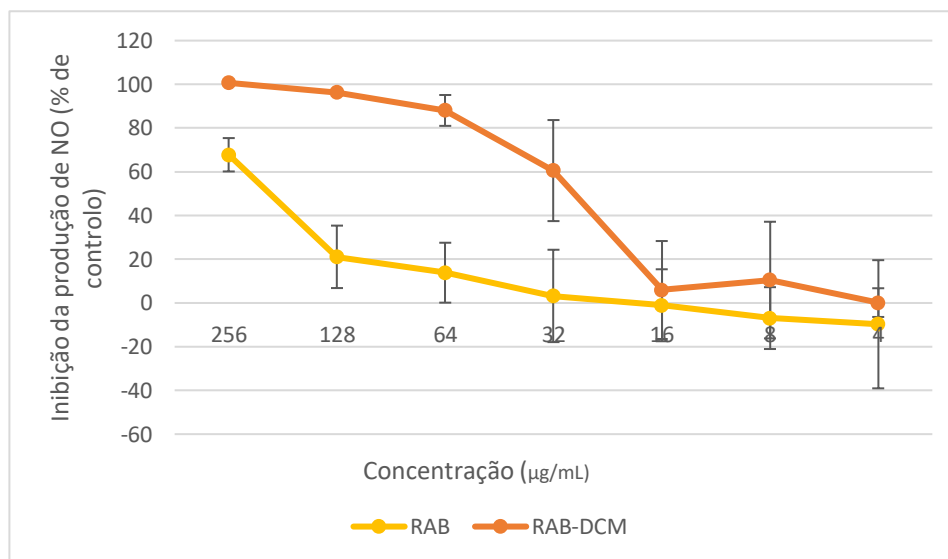


Figura 8: Inibição da produção de NO por macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS pelos extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)

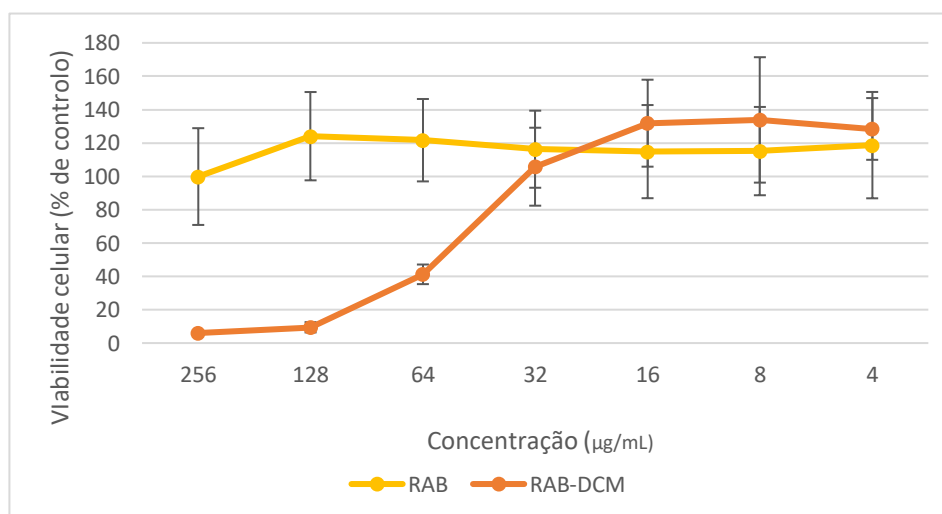


Figura 9: Viabilidade de macrófagos RAW264.7 tratados com os extratos RAB e RAB-DCM. (n=3)

Em relação aos compostos diméricos flavonoides, verificou-se que as três braquidinas inibiram a produção de NO nas concentrações de 100,0 e 50,0 $\mu\text{mol/L}$, seguida por uma marcada diminuição da viabilidade metabólica dos macrófagos, como mostrado nas Figuras 10 e 11.

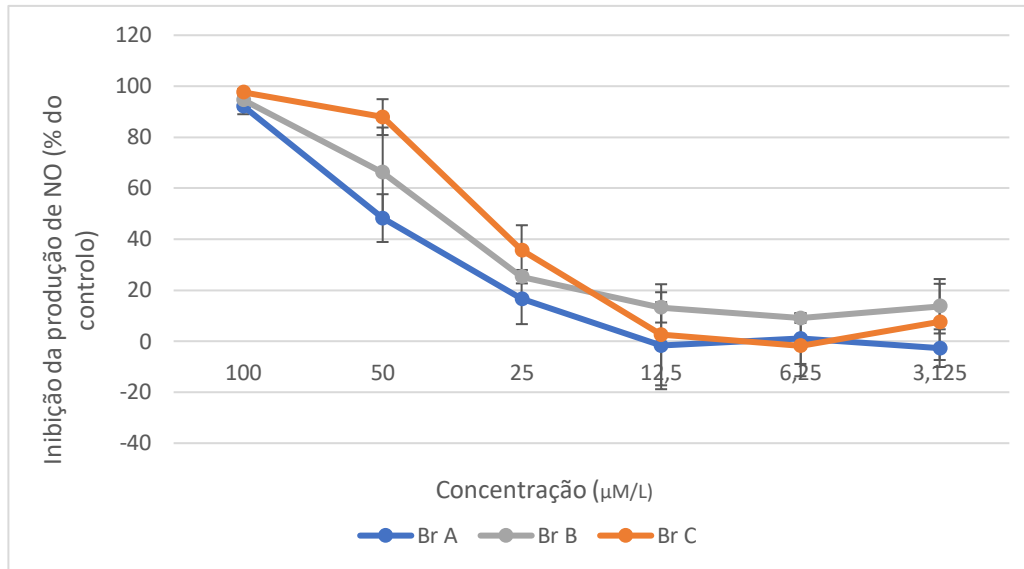


Figura 10: Inibição da produção de NO por macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS pela braquidina A (BRA-A), braquidina B (BRA-B) e braquidina C (BRA-C). (n=2)

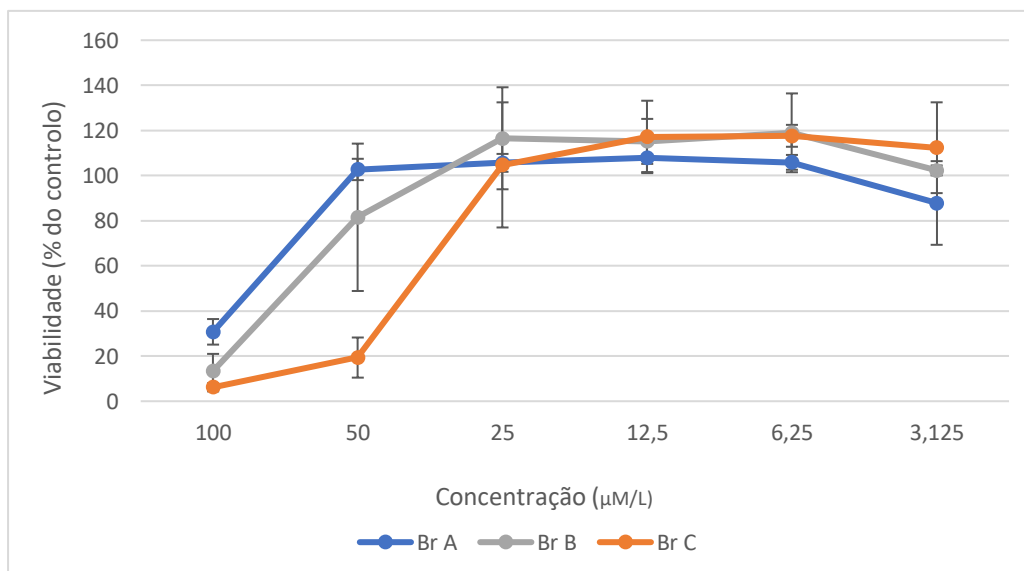


Figura 11: Viabilidade de macrófagos RAW264.7 tratados com braquidina A (Br A), braquidina B (Br B) e braquidina C (Br C). (n=2)

4. Discussão

A aplicação de produtos naturais para fins terapêuticos tem sido um dos interesses desde os primórdios da vida humana. Desde a pré-história que as civilizações procuram a cura para enfermidades em plantas. Na verdade, durante muitos anos, muitas drogas foram desenvolvidas a partir de minerais, vegetais e animais. Dada a facilidade de obtenção dos compostos no seu estado puro, existem modificações da sua estrutura e constituição que permitem produzir agentes terapêuticos ativos e mais seguros (114,115).

Nas últimas décadas, o interesse pela exploração e utilização de substâncias naturais, especialmente derivadas do metabolismo das plantas, tem constituído uma potencial alternativa terapêutica devido ao uso de forma descontrolada e incorreta de agentes sintéticos, que têm resultado em efeitos colaterais, por vezes irreparáveis e determinantes para o futuro. Uma das consequências têm sido as resistências aos agentes antimicrobianos, uma ameaça cada vez mais impactante à resolução de infeções causadas por bactérias e fungos (115).

Dado que os compostos flavonoides são reconhecidos por serem sintetizados pelas plantas como um mecanismo de resposta a infeções, a sua eficácia *in vitro* contra uma ampla gama de microrganismos tem sido alvo de estudo (114). Apesar dos seus mecanismos de ação não estarem amplamente conhecidos, os seus efeitos podem dever-se à sua capacidade de formar complexos com as proteínas extracelulares e solúveis e, portanto, modificar as paredes celulares bacterianas (114).

Estudos recentes demonstraram atividade antiparasitária *in vitro* e *in vivo* *Trypanosoma cruzi* *Leishmania spp.* de um extrato hidroetanólico e da sua fração apolar, extraídos do arbusto *Arrabidaea brachypoda* (1,2). Tendo em consideração essas evidências, neste trabalho pretendeu-se avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de três compostos flavonoides diméricos, começando-se a avaliação a partir de um extrato RAB e da fração apolar RAB-DCM. Para este estudo, foram selecionadas duas bactérias, uma Gram-positivo – *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 –, e uma Gram-negativo – *Escherichia coli* ATCC® 25922 –, de forma a serem representativas destes dois grupos. Em relação às leveduras, a *Candida albicans* ATCC® 10231 foi selecionada por ter uma elevada prevalência como responsável pela maioria das candidíases e crescente resistência a antifúngicos, a *Candida krusei* ATCC® 6258 por apresentar uma inerente resistência ao fluconazol, um dos principais antifúngicos que têm como alvo o ergosterol, e o *Cryptococcus neoformans* CECT® 1078 por ser uma levedura capsulada, o que representa, por si só, um importante e distintivo fator de virulência (53,67,77,116).

No presente trabalho, os extratos RAB e RAB-DCM foram submetidos à avaliação da concentração mínima inibitória em leveduras e bactérias. Nas estirpes de leveduras, ambos os extratos foram inativos. Nas estirpes bacterianas, os valores de CML obtidos para *S. aureus* ATCC® 29213 nos extratos RAB e RAB-DCM, respetivamente, 1024,0 µg/mL e 128,0 µg/mL, permitiram constatar que a atividade bactericida e bacteriostática está dependente da dose de extrato e é superior à CMI (128,0 µg/mL e 26,7 µg/mL, respetivamente). Por outro lado, estes mesmos extratos não inibiram o crescimento de *E. coli* ATCC® 25922.

Segundo a literatura, a ligação entre os compostos flavonoides e as membranas bacterianas envolvem a partição dos compostos mais apolares no interior hidrofóbico da membrana, e ligações de hidrogénio entre os grupos de lipídios da cabeça polar e os compostos mais hidrofílicos na interface da membrana (93,117). A ausência de atividade antimicrobiana em *E. coli* está de acordo com vários estudos que reportaram uma menor eficácia antibacteriana dos flavonoides contra bactérias Gram-negativo devido às diferenças na composição das suas paredes celulares. De facto, a camada de peptidoglicano de bactérias Gram-positivo promove a ligação e absorção dos compostos, enquanto que os lipopolissacarídeos de carga negativa das bactérias Gram-negativo podem originar um efeito repulsivo, levando a uma ligação não eficiente à superfície da membrana (91,93,117,118).

Os resultados de CMI e CML estão concordantes com a prática clínica, em que existem antibióticos utilizados no combate a infeções por *S. aureus* cuja atividade bacteriostática/bactericida é dependente da concentração administrada (119,120). Os antibióticos da classe dos glicopeptídeos e lipoglicopeptídeos possuem esta característica (119,120). A daptomicina, um antibiótico com grande atividade bactericida dependente da concentração em bactérias Gram-positivo é amplamente utilizada contra infeções de *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.*, devido à baixa frequência de efeitos adversos e mecanismos de resistência. De acordo com os valores disponibilizados pelo Comité Europeu de Testes Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST, do inglês, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), a dose necessária para um efeito bacteriostático ou bactericida é, respetivamente, >438 mg/L ou >1061 mg/L (119,120).

A telavancina é um antibiótico derivado da vancomicina, muito utilizada pela sua efetividade contra MRSA, que não só inibe a síntese de peptidoglicano, como também se liga à membrana celular e provoca a sua despolarização (89,121). O facto do momento das alterações na membrana coincidir com uma elevada percentagem de morte bacteriana pressupõe que quanto

um aumento da sua concentração conduzirá a um aumento da permeabilidade, pelo que este duplo mecanismo de ação é responsável pela sua forte atividade bactericida e dependente da concentração (89,121,122).

O extrato RAB-DCM mostrou ser mais efetivo contra *S. aureus*. A falta de atividade do extrato RAB poderá estar relacionada com o facto dos compostos flavonoides diméricos se apresentarem sob a forma glucoronada, enquanto na fração não polar, que contém apenas as braquidinas, estas estão na forma não glucoronada (2). Com base nestas considerações, trata-se do extrato com maior interesse de estudo, pelo que foram explorados os seus componentes ativos, avaliando-se se o efeito antimicrobiano isolada de cada braquidina seria potencializado ou bloqueado devido à quebra de um possível sinergismo (107).

Esta avaliação foi realizada apenas em *S. aureus* pelos seguintes motivos: das estirpes bacterianas testadas foi a que se mostrou suscetível à ação dos extratos; comparativamente com *E. coli*, existem opções terapêuticas cada vez mais limitadas (quer pela evolução das resistências, quer pela existência de clones que a tornam numa "superbactéria"), e devido ao número de infeções por MRSA que representam um grande problema de saúde a nível global (25,123,124). No entanto, nesta etapa optou-se por testar os compostos em duas estirpes de *S. aureus*, de forma a avaliar uma possível constância ou variação dos resultados dentro da mesma espécie.

Segundo os dados presentes na Tabela 12, nenhuma das braquidinas isoladas inibiu o crescimento das leveduras e da bactéria *E. coli* testadas, resultado já esperado e concordante com a ausência de ação inicial dos extratos. No que toca às estirpes de *S. aureus*, os resultados mostram que a Br C foi o composto flavonoide dimérico mais ativo, com CMI de 12,5 e 75,0 $\mu\text{M/L}$ para *S. aureus* ATCC 2913 e *S. aureus* V459, respetivamente.

Quanto aos valores de CML obtidos, em todos os casos foi superior a 100,0 $\mu\text{M/L}$, concluindo-se que a atividade é bacteriostática e seriam necessário concentrações superiores para se atingir a morte das células bacterianas.

Num estudo anterior de Da Rocha et al., foi realizada a quantificação das três braquidinas da fração não polar utilizadas neste estudo, tendo-se concluído que a Br C era o composto mais abundante (1). Este resultado sugere que este composto, por também ser o principal constituinte do extrato, possa ser o responsável pela sua atividade biológica. No entanto, o extrato permanece como uma mistura complexa de diferentes compostos e, tendo em conta que a Br A e B também

apresentam atividade, não é possível atribuir a sua propriedade antibacteriana contra *S. aureus* a um constituinte em particular (107).

Dadas as interações entre os agentes infecciosos e o organismo hospedeiro, é essencial compreender quais os seus mecanismos de virulência e possíveis alvos terapêuticos, dado que representam a chave para controlar a disseminação de microrganismos (23).

Considerando a atividade antimicrobiana da fração não polar do extrato hidroetanólico e das braquidinas contra *S. aureus* ATCC 29213, a etapa seguinte deste trabalho foi investigar possíveis mecanismos de ação. Selecionou-se o composto Br C para essa investigação, dado que foi o flavonoide dimérico que apresentou elevada atividade antibacteriana.

Sabe-se que, para a sua sobrevivência e adaptação face a diferentes nichos ambientais, *S. aureus* apresenta uma grande capacidade para controlar a produção de fatores de virulência, tais como, produzir várias exoenzimas (125). Para este estudo, optou-se por estudar a possível interferência da braquidina C com a atividade de enzimas produzidas por *S. aureus* – DNase, coagulase e catalase – e que representam preponderantes fatores de virulência com grande influência na patogenicidade das infeções que provoca. A estirpe utilizada foi *S. aureus* ATCC 29213, pois correspondeu à estirpe para a qual a Br C apresentou maior atividade antibacteriana.

Existem vários agentes antibacterianos capazes de impedir a produção da enzima DNase. *Macrophyloflavone* e rutina são dois exemplos de flavonoides capazes de inibir a síntese de ácidos nucleicos e a atividade da DNase, respetivamente, em *S. aureus*, de forma bastante semelhante a inibidores sintéticos (101,126). Um dos mecanismos explicativos poderá ser a ligação dos compostos ao DNA e a sua conseqüente competição, ainda que variável, com o local de ligação da enzima desoxirribonuclease (101,125,126).

De acordo com os resultados da Tabela 13, a Br C foi capaz de impedir a produção da enzima DNase nas concentrações de ½ CMI de forma estatisticamente significativa ($p = 0,014$), sendo que em termos de valores médios, existiu uma diminuição de cerca de 2 mm entre controlos positivos e concentrações de Br C de 1/2 CMI.

A coagulase é uma enzima fulcral para a associação de *S. aureus* com fibrina e plaquetas, para a formação de coágulos que funcionam como uma barreira contra células do sistema imune e antimicrobianos. A ausência ou inibição da sua atividade poderá potenciar a resolução de várias infeções (127). Estudos mostraram que, na presença de compostos flavonoides como morina, a bactéria *S. aureus* demonstra uma menor afinidade de ligação ao fibrinogénio (128). No entanto, neste estudo, e nas concentrações testadas, pretendeu-se verificar a ação da Br C na formação

de coágulo por *S. aureus*, tendo-se verificado que não houve qualquer influência, sugerindo que a catalase não deverá ser um alvo para este composto flavonoide dimérico.

O sucesso da colonização desta bactéria na mucosa do ser humano depende, não só dos seus fatores de virulência, mas também da capacidade de coexistir com outras bactérias, como *Streptococcus pneumoniae*. Este produz H_2O_2 em defesa contra outros microrganismos respiratórios, pelo que, a catalase confere a *S. aureus* maior capacidade de resistência (129). Assim, os compostos capazes de inibir esta enzima, induzem a acumulação de espécies reativas de oxigénio e reduzem a capacidade de evasão desta bactéria ao sistema imunológico do hospedeiro. Neste contexto, os flavonoides taninos são um exemplo de compostos capazes de bloquear esta enzima (113).

Os resultados da Tabela 14 mostraram uma inibição de cerca de 90% da atividade enzimática, após atribuição de uma escala de intensidade de efervescência, o que sugere que a Br C inibe a enzima catalase e, conseqüentemente, a decomposição do peróxido de hidrogénio.

Como estudo complementar para avaliar o potencial interesse a nível da citotoxicidade e inflamação das moléculas em estudo, foi realizado um ensaio de viabilidade pelo método do MTT. Este ensaio foi baseado na atividade mitocondrial da desidrogenase, o que por sua vez é uma medida da respiração mitocondrial das células (130). A produção de cristais de formazan é diretamente proporcional ao número de células vivas existentes por poço, pelo que células que sejam metabolicamente inativas não produzem uma quantidade significativa de formazan (130). Assim, a quantidade de formazan produzido pelas células HDFa expostas aos extratos e compostos flavonoides diméricos dependeu do seu metabolismo energético (131).

Quanto aos extratos RAB e RAB-DCM, poderia esperar-se que, a concentrações mais elevadas, existisse uma menor viabilidade de fibroblastos. De acordo com a Figura 6, o extrato RAB é o menos tóxico, apresentando viabilidade superior a 70% a partir da concentração de 128,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Já no extrato RAB-DCM apenas se verificou essa percentagem de viabilidade aquando da sua aplicação em concentrações entre 64,0 e 32,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estes dados corroboram o obtido nas concentrações mínimas inibitórias, pois em *S. aureus* ATCC 29213 o composto RAB-DCM apresentou atividade antimicrobiana superior (CMI = 26,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pelo que se colocou em hipótese que este poderia ser também o mais tóxico dos dois extratos. Embora a viabilidade à CML de 128,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para esse extrato seja comprometida, existiu uma viabilidade superior a 80% para a concentração que teria de ser usada para inibir o crescimento de *S. aureus*, o que representa um dado preliminar de interesse.

De acordo com a Figura 7, que retrata a exposição dos fibroblastos dérmicos humanos primários aos compostos diméricos flavonoides, a Br A foi a menos tóxica, permitindo uma viabilidade celular superior a 80% à concentração mais elevada de 50 $\mu\text{M}/\text{L}$, que corresponde à CMI obtida para *S. aureus* ATCC 29213. Já a Br B e C apresentam viabilidades próximas para cada concentração testada. Enquanto no caso da Br B, a viabilidade celular para a CMI de 60,0 $\mu\text{M}/\text{L}$ obtida para *S. aureus* ATCC 29213 é inferior a 40%, a Br C permite uma viabilidade superior a 100% (face ao grupo de controlo) na CMI de 12,5 $\mu\text{M}/\text{L}$ para a mesma bactéria.

De uma forma geral, o extrato hidroetanólico e a sua fração apolar parecem não afetar significativamente a viabilidade celular da linhagem de fibroblastos testada. Atendendo a que o extrato RAB-DCM e a Br C apresentaram uma maior atividade antimicrobiana, estes resultados de viabilidade sugerem o descrito na literatura acerca dos seus baixos efeitos tóxicos nas concentrações necessárias para aplicação terapêutica (83–86,93).

No âmbito do potencial anti-inflamatório, o óxido nítrico é uma molécula produzida a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase e pode ser libertado por várias células do sistema imunológico, como macrófagos ativados, neutrófilos e linfócitos (132). Além de ter um papel preponderante no sistema de defesa antioxidante, é também responsável pela transdução de uma variedade de sinais intimamente relacionados com a patogénese da inflamação (132). Desta forma, a inibição da produção de NO representa um benefício para uma redução da inflamação. A expressão de óxido nítrico sintase é reforçada pelo tratamento com LPS e, conseqüentemente, a concentração de NO produzida é aumentada (132).

Posto isto, procedeu-se à avaliação das potenciais capacidades anti-inflamatórias dos extratos e compostos flavonoides, analisando-se a sua interferência na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

No que concerne ao extrato RAB, os dados obtidos nas Figuras 8 e 9 mostraram que, apesar de ter um baixo nível de toxicidade a qualquer uma das concentrações testadas (sendo por isso pouco citotóxico para a linhagem de macrófagos utilizada), não conseguiu interferir com a produção de óxido nítrico. Na verdade, apenas houve uma inibição de cerca de 68% à concentração de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo a CMI de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus* ATCC 29213.

Quanto ao extrato RAB-DCM, verificaram-se percentagens de inibição de óxido nítrico elevadas (>60%), mas com baixa viabilidade celular. Às concentrações inferiores a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em que existiu forte viabilidade dos macrófagos, corresponde uma inibição da produção de NO entre 40–60%, onde se inclui a CMI de 26,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtida para *S. aureus* ATCC 29213.

Por conseguinte, estes resultados preliminares refletem que o extrato RAB-DCM será o extrato mais capaz de reduzir os níveis de nitrito sem interferir na viabilidade celular, um resultado alinhado com os obtidos para a atividade antimicrobiana e viabilidade em HDFa.

A análise detalhada das Figuras 10 e 11 permite concluir que as braquidinas A, B e C, isoladas da fração não polar e colocadas individualmente em contacto com macrófagos estimulados por LPS, apresentaram elevadas taxas de inibição da produção de NO entre as concentrações de 100,0 e 50,0 $\mu\text{M}/\text{L}$. Nas restantes concentrações, ocorreu uma marcada redução da viabilidade metabólica dos macrófagos. A inibição da produção de NO das Br A e B, como resultado preliminar, poderiam revelar potencial atividade anti-inflamatória sem citotoxicidade contra os macrófagos, dado que as concentrações mínimas inibitórias obtidas para *S. aureus* ATCC 29213 foram, respetivamente, 50,0 e 60,0 $\mu\text{M}/\text{L}$. Apesar de esta bactéria possuir mecanismos de resistência ao NO, como a produção de lactato desidrogenase, o interesse na propriedade de inibição da produção de NO por estes compostos prende-se no facto de auxiliarem na redução da inflamação gerada nas infeções bacterianas (23).

5. Conclusão

Os compostos antimicrobianos têm sido usados há décadas para tratar doenças infecciosas, permitindo reduzir o número de casos de infecções e de óbitos. No entanto, a resistência antimicrobiana têm representado, globalmente, um momento de grande fragilidade para os sistemas de saúde. O seu custo e citotoxicidade tem conduzido à procura de novas estratégias terapêuticas (133).

No presente estudo foi possível cumprir com todos os objetivos propostos, tendo-se avaliado os efeitos antimicrobianos de extratos e compostos flavonoides diméricos em leveduras e bactérias. Embora a atividade dos extratos RAB e RAB-DCM não tenha sido eficaz contra as três leveduras testadas (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans*) e contra a bactéria Gram-negativo *E. coli*, o extrato RAB-DCM foi o que apresentou melhor atividade contra a bactéria Gram-positivo *S. aureus*. A atividade isolada dos compostos constituintes desse extrato mostrou forte atividade em *S. aureus* ATCC 29213, sendo que a braquidina C mostrou ser a mais eficiente, com uma CMI de 12,5 µM/mL.

Apesar de ainda não existirem estudos que mostrem os mecanismos de ação de braquidinas em bactérias, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que um dos principais alvos podem ser as enzimas bacterianas. Em *S. aureus*, existiu uma forte inibição da DNase e da catalase, duas enzimas essenciais para a sobrevivência desta bactéria perante as estratégias de defesa dos hospedeiros (23).

Em suma, as braquidinas extraídas das raízes de *Arrabidaea brachypoda* poderão vir a ser novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas, podendo ser constituintes de cremes, géis ou outras formas de administração.

Como perspetivas futuras, tenciona-se realizar testes *in vitro* que determinem a sua capacidade antioxidante, pelo método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e avaliem o efeito sinérgico de agentes antibacterianos com as braquidinas, de forma a perceber se o seu uso combinado pode melhorar a atividade antimicrobiana por sinergia, o que pode, como mencionado na secção introdutória, representar uma estratégia de tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Este estudo complementar traria mais dados sobre a possibilidade do uso destes compostos naturais, não em substituição de antimicrobianos disponíveis para terapêutica, mas sim no seu uso combinado. Desta forma, seria possível diminuir a toxicidade associada a agentes antibacterianos (82).

Além do estudo da ação destes compostos em células planctónicas, seria também pertinente avaliar a inibição de biofilmes de *S. aureus*, quer pela sua aplicação isolada, quer em conjunto com antibacterianos conhecidos, dado que é um fator que dificulta o tratamento de infeções recorrentes.

6. Referências Bibliográficas

1. Da Rocha CQ, Queiroz EF, Meira CS, Moreira DRM, Soares MBP, Marcourt L, et al. Dimeric flavonoids from Arrabidaea brachypoda and assessment of their anti- Trypanosoma cruzi activity. *J Nat Prod.* 2014;77(6):1345–50.
2. Rocha VPC, Da Rocha CQ, Queiroz EF, Marcourt L, Vilegas W, Grimaldi GB, et al. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from arrabidaea brachypoda. *Molecules.* 2019;24(1).
3. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017;57(13):2857–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
4. Prevention C for DC and. About Antimicrobial Resistance [Internet]. Antimicrobial Resistance. 2022 [cited 2023 Mar 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
5. Prevention C for DC and. Glossary of Terms Related to Antibiotic Resistance [Internet]. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS). 2019 [cited 2023 Mar 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/narms/resources/glossary.html>
6. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am* [Internet]. 2020;30(4):619–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
7. Khan A, Miller WR, Arias CA. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2018;16(4):269–87. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1456919>
8. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2021;27:101–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
9. Kahn LH. Antimicrobial resistance: A One Health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2017;111(6):255–60.
10. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629–55.
11. Control EC for DP, Organization WH. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023

- 2021 data. 2023.
12. Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S. Vancomycin resistant enterococci: A brief review. *J Pak Med Assoc.* 2018;68(5):768–72.
 13. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):744–58.
 14. Vieira L, Neto P, Salaroli M, Annibale TD, Villas G, Cristina R, et al. Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;23:33–7.
 15. Smith HZ, Kendall B. Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
 16. Kwiecinski JM, Horswill AR. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol.* 2020;53:51–60.
 17. Lindsay JA, Holden MTG. Staphylococcus aureus: Superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 2004;12(8):378–85.
 18. Dezfulian A, Salehian MT, Amini V, Dabiri H, Azimirad M, Aslani MM, et al. Catalase-negative Staphylococcus aureus isolated from a diabetic foot ulcer. *Iran J Microbiol.* 2010;2(3):165–7.
 19. Zarringhalam M, Zarringhalam J, Shadnoush M, Rezazadeh S, Tekieh E. Inhibitory effect of black and red pepper and thyme extracts and essential oils on Enterohemorrhagic Escherichia coli and DNase activity of Staphylococcus aureus. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(3):363–9.
 20. Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, et al. Staphylococcus aureus toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins (Basel).* 2021;13(10):1–22.
 21. Kong C, Neoh HM, Nathan S. Targeting Staphylococcus aureus toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins (Basel).* 2016;8(3):1–21.
 22. Pinchuk I V., Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010;2(8):2177–97.
 23. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence [Internet].* 2021;12(1):547–69. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
 24. Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell*

- Infect Microbiol. 2012;2(April):52.
25. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):1–103.
 26. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(5):588–95.
 27. Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6–7):324–30.
 28. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2013;358:3–32. Available from: http://books.google.com/books?id=_DDwCqx6wpcC&printsec=frontcover&dq=unwritten+rules+of+phd+research&hl=&cd=1&source=gbs_api%255Cnpapers2://publication/uuid/48967E01-55F9-4397-B941-310D9C5405FA%255Cnhttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.p
 29. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(3):207–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2298>
 30. da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence.* 2012;3(1):18–28.
 31. Bintsis T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol.* 2017;3(3):529–63.
 32. Lee DS, Lee SJ, Choe HS, Giacobbe DR. Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
 33. Falagas ME, Polemis M, Alexiou VG, Marini-Mastrogiannaki A, Kremastinou J, Vatopoulos AC. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* urinary isolates from primary care patients in Greece. *Med Sci Monit.* 2008;14(2):75–9.
 34. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathog* [Internet]. 2019;11(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>

35. Le Bouguéne C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(6–7):471–8.
36. Lüthje P, Brauner A. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Adv Microb Physiol*. 2014;65:337–72.
37. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):6235–54.
38. Bajaj P, Singh NS, Viridi JS. *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. *Front Microbiol*. 2016;7(MAR):1–14.
39. Faife SL, Zimba T, Sekyere JO, Govinden U, Chenia HY, Simonsen GS, et al. β -lactam and fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae from imported and locally-produced chicken in Mozambique. *J Infect Dev Ctries*. 2020;14(5):471–8.
40. Jamborova I, Dolejska M, Vojtech J, Guenther S, Uricariu R, Drozdowska J, et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(2):648–57.
41. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017;17(12):e383–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)
42. BAID S. Combatting Antifungal Resistance. American Society For Microbiology. 2022.
43. Lockhart SR, Guarner J. Emerging and reemerging fungal infections. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):177–81.
44. Benedict K, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(12):403e411.
45. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012;4(165).
46. Spallone A, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2021;35(2):261–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.014>
47. Ray SK, Mukherjee S. COVID-19-Associated Mucormycosis, A New Incident in Recent Time: Is An Emerging Disease in The Near Future Impending? *Avicenna J Med*. 2021;11(04):210–6.

48. Lewis White P. Diagnosis of invasive fungal disease in coronavirus disease 2019: approaches and pitfalls. *Curr Opin Infect Dis.* 2021;34(6):573–80.
49. Division AR, Diseases C of NT, Partnership GC and. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022.
50. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(2):208–17.
51. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* – Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;117(December 2017):128–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
52. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2017;18(5):63–75.
53. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(May):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
54. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence* [Internet]. 2022;13(1):89–121. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
55. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(1):85–93.
56. Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2012;13:963–76.
57. Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol.* 2021;131(1):11–22.
58. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Bonifacio BV, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* Biofilm growth and Dispersal: Contributions to Pathogenesis. *Physiol Behav.* 2019;176(5):139–48.
59. Song JL, Harry JB, Eastman RT, Oliver BG, White TC. The *Candida albicans* Lanosterol 14- α -Demethylase (ERG11) Gene Promoter Is Maximally Induced after Prolonged Growth with Antifungal Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1136–44.
60. Song J, Liu X, Li R. Sphingolipids: Regulators of azole drug resistance and fungal pathogenicity. *Mol Microbiol.* 2020;114(6):891–905.

61. Jamiu AT, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med Mycol.* 2021;59(1):14–30.
62. Cooper CR. Yeasts pathogenic to humans. Vol. 1, *The Yeasts*. Elsevier B.V.; 2011. 9–19 p.
63. Wiederhold NP. Emerging Fungal Infections: New Species, New Names, and Antifungal Resistance. *Clin Chem.* 2021;68(1):83–90.
64. Gabriel C, Grenho L, Cerqueira F, Medeiros R, Dias AM, Ribeiro AI, et al. Inhibitory Effect of 5-Aminoimidazole-4-Carbohydrazonamides Derivatives Against *Candida* spp. Biofilm on Nanohydroxyapatite Substrate. *Mycopathologia.* 2019;184(6):775–86.
65. Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: Biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol.* 1994;41(5):295–310.
66. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):515–21.
67. Gong J, Xiao M, Wang H, Kudinha T, Wang Y, Zhao F, et al. Genetic differentiation, diversity, and drug susceptibility of *Candida krusei*. *Front Microbiol.* 2018;9(NOV):1–10.
68. Gómez-Gaviria M, Mora-Montes HM. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. *Infect Drug Resist.* 2020;13:1673–89.
69. Fritsch LN, Dias ALT, Silva NC, Fernandes GJM, de Andrade Oliveira Ribeiro FB. Comparative analysis of biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida krusei* in different types of contact lenses. *Arq Bras Oftalmol.* 2022;85(3):235–9.
70. Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans* [Internet]. 1st ed. Vol. 87, *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Inc.; 2014. 1–41 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800261-2.00001-3>
71. Momin M, Webb G. The environmental effects on virulence factors and the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12).
72. Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, Loyse A, Shroufi A, Denning DW, et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(12):1748–55.
73. May RC, Stone NRH, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus*: From environmental

- saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(2):106–17.
74. Bahn YS, Sun S, Heitman J, Lin X. Microbe profile: *Cryptococcus neoformans* species complex. *Microbiol (United Kingdom)*. 2020;166(9):797–9.
 75. Zhao Y, Lin X. *Cryptococcus neoformans*: sex, morphogenesis, and virulence. *Infect Genet Evol*. 2021;89:104731.
 76. Ballou ER, Alspaugh JA, Nichols CB. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Top Curr Genet*. 2012;22:197–223.
 77. Janbon G. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res*. 2004;4(8):765–71.
 78. McFadden D, Zaragoza O, Casadevall A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol*. 2006;14(11):497–505.
 79. Alspaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet Biol*. 2015;78(919):55–8.
 80. Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*. 2014;31(2):47–60.
 81. Curi ALL, Lazera M, Vasconcelos-Santos DV. Cryptococcosis. *Intraocular Inflamm*. 2016;30(1):1277–83.
 82. Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B, Cock IE. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? *Pharmacogn Rev*. 2017;1(22):57–72.
 83. Rocha MFG, Sales JA, da Rocha MG, Galdino LM, de Aguiar L, Pereira-Neto W de A, et al. Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: a possible alternative for the control of fungal biofilms. *Biofouling*. 2019;35(3):320–8.
 84. Wang JF, Liu SS, Song ZQ, Xu TC, Liu CS, Hou YG, et al. Naturally Occurring Flavonoids and Isoflavonoids and Their Microbial Transformation: A Review. *Molecules*. 2020;25(21).
 85. Parshikov IA, Sutherland JB. Biotransformation of Steroids and Flavonoids by Cultures of *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;176(3):903–23.
 86. Jin YS. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2019;29(19):126589.
 87. Sagrera G, Bertucci A, Vazquez A, Seoane G. Synthesis and antifungal activities of natural and synthetic biflavonoids. *Bioorganic Med Chem [Internet]*. 2011;19(10):3060–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.010>

88. Bagla VP, McGaw LJ, Elgorashi EE, Eloff JN. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):2–7.
89. Zeng D, Debabov D, Hartsell TL, Cano RJ, Adams S, Schuyler JA, et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(12):1–16.
90. Tânia T. de Oliveira , Rosimar Regina da Silva WC DTJN. Flavonóides e Aterosclerose. *Biologia (Bratisl)*. 2010;42(1):49–54.
91. Menezes JCJMDS, Campos VR. Natural biflavonoids as potential therapeutic agents against microbial diseases. *Sci Total Environ*. 2021;769.
92. Chaves OA, Lima CR, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, de Freitas CS, Vazquez L, et al. Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases. *Int J Biol Macromol*. 2022;222(August):1015–26.
93. Górnaiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. Vol. 18, *Phytochemistry Reviews*. 2019. 241–272 p.
94. Šamec D, Karalija E, Dahija S, Hassan STS. Biflavonoids: Important Contributions to the Health Benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Plants*. 2022;11(10).
95. Jung HJ, Park K, Lee IS, Kim HS, Yeo SH, Woo ER, et al. S-Phase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(10):1969–71.
96. Hyun JJ, Woo SS, Yeo SH, Hyun SK, Lee IS, Woo ER, et al. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Arch Pharm Res*. 2006;29(9):746–51.
97. Gao M, Wang H, Zhu L. Quercetin Assists Fluconazole to Inhibit Biofilm Formations of Fluconazole-Resistant *Candida Albicans* in In Vitro and in Vivo Antifungal Managements of Vulvovaginal Candidiasis. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40(3–4):727–42.
98. Gonçalves E, Felício JD, Pinto MM. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Brazilian J Med Biol Res*. 2001;34(11):1453–6.
99. Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M, Resnik SL. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chem [Internet]*. 2011;124(4):1411–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.100>
100. Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, et al. Natural products –

- Antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res.* 2009;11(7):621–38.
101. Cane HPCA, Saidi N, Yahya M, Darusman D, Eridawati E, Safrida S, et al. Macrophylloflavone: A New Biflavonoid from *Garcinia macrophylla* Mart. (Clusiaceae) for Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Type 2 Diabetes Mellitus Activities. *Sci World J.* 2020;2020.
 102. Mkounga P, Fomum ZT, Meyer M, Bodo B, Nkengfack AE. Globulixanthone F, a new polyoxygenated xanthone with an isoprenoid group and two antimicrobial biflavonoids from the stem bark of *Symphonia globulifera*. *Nat Prod Commun.* 2009;4(6):803–8.
 103. Linden M, Brinckmann C, Feuereisen MM, review, Schieber A. Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Food Res Int.* 2020;133(February).
 104. Makhafola TJ, Samuel BB, Elgorashi EEJNE. Ochnaflavone and ochnaflavone 7-O-methyl ether two antibacterial biflavonoids from *Ochna pretoriensis* (Ochnaceae). *Nat Prod Commun.* 2012;7(12):1601–4.
 105. Lee J, Kim M, Jeong SE, Park HY, Jeon CO, Park W. Amentoflavone, a novel cyanobacterial killing agent from *Selaginella tamariscina*. *J Hazard Mater [Internet].* 2020;384(October 2019):121312. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121312>
 106. da Silva TBC, Costa CODS, Galvão AFC, Bomfim LM, Rodrigues ACB d. C, Mota MCS, et al. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. *BMC Complement Altern Med [Internet].* 2016;16(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1166-1>
 107. Salgado C, Morin H, Aquino NC, Neff L, da Rocha CQ, Vilegas W, et al. In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic. *Molecules.* 2021;25:5219.
 108. Resende FA, Nogueira CH, Espanha LG, Boldrin PK, Oliveira-Höhne AP, Santoro de Camargo M, et al. In vitro toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017;90:29–35.
 109. Weinstein M. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vol. 8, *Journal of Services Marketing.* 2021. 18–260 p.
 110. Institute CMC and LS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standards– 6th ed. Document M7–A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards*

- Institute. Vol. 32. Wayne: PA; 2006.
111. Institute. CMC and LS. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3. Wayne: PA.; 2008.
 112. Gerceker D, Karasartova D, Elyürek E, Barkar S, Kiyani M, Özsan TM, et al. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. *J Gen Appl Microbiol.* 2009;55(4):291–4.
 113. Carvalho RS, Carollo CA, de Magalhães JC, Palumbo JMC, Boaretto AG, Nunes e Sá IC, et al. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. *South African J Bot [Internet].* 2018;114:181–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.010>
 114. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):564–82.
 115. Scheffer JJC. Plants as source of new drugs. *Pharm Weekbl.* 1991;126(13):305.
 116. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am [Internet].* 2016;30(1):103–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>
 117. Donadio G, Mensitieri F, Santoro V, Parisi V, Bellone ML, De Tommasi N, et al. Interactions with microbial proteins driving the antibacterial activity of flavonoids. *Pharmaceutics.* 2021;13(5).
 118. Osonga FJ, Akgul A, Miller RM, Eshun GB, Yazgan I, Akgul A, et al. Antimicrobial activity of a new class of phosphorylated and modified flavonoids. *ACS Omega.* 2019;4(7):12865–71.
 119. Gregoire N, Chauzy A, Buyck J, Rammaert B, Couet W, Marchand S. Clinical Pharmacokinetics of Daptomycin. *Clin Pharmacokinet [Internet].* 2021;60(3):271–81. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00968-x>
 120. Tally FP, Zeckel M, Wasilewski MM, Carini C, Berman CL, Drusano GL, et al. Daptomycin: A novel agent for Gram-positive infections. *Expert Opin Investig Drugs.* 1999;8(8):1223–38.
 121. Rolston KV, Wang W, Neshler L, Smith JR, Rybak MJ, Prince RA. Time-kill determination of the bactericidal activity of telavancin and vancomycin against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from cancer patients. *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet].* 2017;87(4):338–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.12.010>
 122. Liapikou A, Dimakou K, Toumbis M. Telavancin in the treatment of *Staphylococcus aureus*

- hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: Clinical evidence and experience. *Ther Adv Respir Dis*. 2016;10(4):368–78.
123. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care*. 2017;21(1):211.
 124. McCallum N, Berger-Bächli B, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(2–3):118–29.
 125. Gündoğan N, Citak S, Turan E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control*. 2006;17(5):389–92.
 126. Kolarevic A, Pavlovic A, Djordjevic A, Lazarevic J, Savic S, Kocic G, et al. Rutin as Deoxyribonuclease I Inhibitor. *Chem Biodivers*. 2019;16(5).
 127. Peetermans M, Verhamme P, Vanassche T. Coagulase activity by *staphylococcus aureus*: A potential target for therapy? *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(4):433–43.
 128. Mikłasińska-Majdanik M, Kępa M, Wojtyczka RD, Idzik D, Wąsik TJ. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* clinical strains. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10).
 129. Park B, Nizet V, Liu GY. Role of *Staphylococcus aureus* catalase in niche competition against *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2008;190(7):2275–8.
 130. Oh YJ, Hong J. Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. *Food, Sci Technol*. 2022;153:112565.
 131. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem*. 2018;120(4):303–11.
 132. Mantzaris K, Tsolaki V, Zakyntinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
 133. Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb Ecol*. 2017;74(4):1001–8.

Esta dissertação deu origem a um trabalho apresentado sob Comunicação em Póster no XXVIII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, decorrido nos dias 24–26 de Julho de 2023, em Aveiro.

O tema foi “Química Sem fronteiras Com diversidade” e o resumo encontra-se disponível no Livro de Resumos que pode ser consultado no seguinte link: <https://xxviiienspq.events.chemistry.pt/>



P129

Antimicrobial and anti-inflammatory activity of an extract of *Arrabidaea brachypoda* containing dimeric flavonoids

L. Lopes^{1,2}, C. Campos², R. Gil da Costa^{2,3}, C. da Rocha⁴, H. Brito⁴, F. Silva⁵, E. Pinto⁶, R. Medeiros^{2,7}, F. Cerqueira^{2,7}

¹School of Health Polytechnic Institute of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 4300 - 072, Porto, Portugal; ²Molecular Oncology and Viral Pathology GRP—IC, Portuguese Institute of Oncology of Porto (IPO Porto), Rua António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal; ³Pos-Graduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís 66000-006, MA, Brazil; ⁴Chemistry Department, Federal University of Maranhão, São Luís 66000-006, MA, Brazil; ⁵Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ⁶REQUIMTE/LAQV, Group of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba 3000-640, Coimbra, Portugal; ⁷Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR/CIIMAR), University of Porto, 4450-208 Matosinhos, Portugal and Laboratory of Microbiology, Biological Sciences Department, Faculty of Pharmacy of University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal
[†]FP-13/D, FP-BHS, Universidade Fernando Pessoa, Praça 9 de Abril, 349, 4249-004 Porto, Portugal
*10170389@ess.ipp.pt

Plants from *Arrabidaea* genus are used in folk medicine.¹ Previously, we reported the effect of dimeric flavonoids obtained from the roots of *Arrabidaea brachypoda* against protozoa from Trypanosomatidae family.^{1,2} In this work the antifungal and antibacterial activity of an aqueous ethanol extract and its nonpolar fraction were tested. Neither the extract nor the nonpolar fraction was active against the yeasts (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258 and *Cryptococcus neoformans* CECT 1078) or Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922), even in the maximum concentration tested (1024 µg/ml). However, both inhibited the growth of Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. The nonpolar fraction was more active than the extract (Minimal Inhibitory Concentration - MIC of 27 ± 5 and 128 ± 0 µg/ml, respectively) and, for MIC values, its effect seems to be bacteriostatic. Preliminary results showed that the nonpolar fraction of the extract, for concentrations near MIC values, inhibited RAW264.7 macrophages Nitric Oxide (NO) production (Griess Assay) and seems not significantly affect the viability (MTT assay) of the Primary Dermal Human Fibroblast (HDF) cell line. In conclusion, the nonpolar fraction of the hydroethanolic extract of *Arrabidaea brachypoda* containing dimeric flavonoids has antibacterial activity, as it inhibits the growth of *S. aureus* methicillin sensitive strain (MSS) ATCC 29213. Also, and based on preliminary results, by inhibiting NO production the fraction has potential anti-inflammatory activity without significant cytotoxicity against HDF cell line. All these results highlight the possible antimicrobial and anti-inflammatory activity of the fraction containing dimeric flavonoids, so the effect of isolated compounds should be tested.

Acknowledgements

We thank the: Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Portuguese Institute of Oncology of Porto, CAPES - finance code 001; National funds through FCT within the scope of Base Funding UIDB/04423/2020 and UIDP/04423/2020 (Group of Marine Natural Products and Medicinal Chemistry - CIIMAR).

References

1. C.Q. da Rocha, E.F. Queiroz, C.S. Meira, D. R. Moreira, M. B. Soares, L. Marcourt, W. Vilegas and J.L. Wolfender. *J Nat Prod.* 2014, 77, 1345-1350.
2. V.P.C. Rocha, C. Q. da Rocha, E. F. Queiroz, L. Marcourt, W. Vilegas G.B. Grimaldi, P. Furrer, E. Allemann, J.L. Wolfender and M.B.P. Soares. *Molecules*, 2018, 24:1. doi: 10.3390/molecules24010001.

Este trabalho deu origem à elaboração de dois artigos científicos:

- Artigo de Revisão intitulado "Antimicrobial activity of Dimeric Flavonoids" na Revista científica *Compounds* (ISSN 2673-6918), em processo de submissão;
- Artigo Científico intitulado "Antimicrobial activity of Brachydins from *Arrabidea bracypoda*" título provisório; em preparação.