



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA LITORAL NORTE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
ÊNFASE BIOLOGIA MARINHA E COSTEIRA

CHRISTCHELLYN KLEGIN RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *ORTHOSTICHELLA RIGIDA* (MÜLL. HAL.) B.H. ALLEN &
MAGILL (BRYOPHYTA) FRENTE A MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

OSÓRIO

2018

CHRISTCHELLYN KLEGIN RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *ORTHOSTICHELLA RIGIDA* (MÜLL. HAL.) B.H. ALLEN &
MAGILL (BRYOPHYTA) FRENTE A MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Ênfase em Biologia Marinha e Costeira da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadores: Dra. Juçara Bordin e Dr. Enio Lupchinski Junior

OSÓRIO

2018

Catálogo de Publicação na Fonte – CIP

R696a Rodrigues, Christchellyn Klegin

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Orthostichella rigida* (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill (Bryophyta) frente a micro-organismos patogênicos. / Christchellyn Klegin Rodrigues – Osório, 2018.

79f.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Juçara Bordin

Coorientador: Prof. Dr. Enio Lupchinski Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso Superior Bacharelado em Ciências Biológicas: Ênfase em Biologia Marinha e Costeira. Unidade de Litoral Norte, Osório, 2018.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Micro-organismos patogênicos. 3. Bryophyta. 4. Trabalho de Conclusão de Curso. I. Bordin, Juçara. II. Lupchinski, Enio. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Simone Semensatto. CRB10/1778

CHRISTCHELLYN KLEGIN RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *ORTHOSTICHELLA RIGIDA* (MÜLL. HAL.) B.H. ALLEN &
MAGILL (BRYOPHYTA) FRENTE A MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Ênfase em Biologia Marinha e Costeira da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadores: Dra. Juçara Bordin e Dr. Enio Lupchinski Junior

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juçara Bordin
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Orientador: Prof Dr. Enio Lupchinski Júnior
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Prof. Dra. Patrícia Valente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Vanessa Ochi Agostini
Universidade Federal do Rio Grande

OSÓRIO

2018

RESUMO

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma estratégia antiga utilizada por praticamente todas as populações do mundo. Diversos extratos de plantas medicinais têm efeitos antimicrobianos, isso por que existe uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo secundário, que são biologicamente ativos. A pesquisa de produtos naturais de origem vegetal que tenham ação antimicrobiana se justifica uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos tem contribuído para o surgimento de micro-organismos resistentes, principalmente os causadores de doenças com alta mortalidade. Os táxons mais investigados são as angiospermas, enquanto poucos dados estão disponíveis atualmente sobre outros grupos de plantas, incluindo-se as briófitas. Representante deste grupo, *Orthostichella rigida* (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill é um musgo da família Neckeraceae que, no Brasil, possui distribuição restrita ao Domínio da Mata Atlântica, o qual apresenta boa parte do seu território na zona costeira. Apesar de existirem alguns estudos que versem sobre o uso de briófitas como fonte de compostos bioativos, há a necessidade de novas pesquisas que visem a elucidação da existência e potencialidades de tais compostos bioativos, especialmente no Brasil. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo a elucidação das potencialidades antimicrobianas dos extratos etanólicos da espécie de musgo *Orthostichella rigida*, coletada no Litoral Norte do RS, Brasil, perante as principais bactérias patogênicas de origem alimentar *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, bem como perante os principais patógenos fúngicos responsáveis por micoses oportunistas, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, levando-se em consideração a sazonalidade, ou seja, o período da coleta das amostras vegetais, para que se pudesse traçar um perfil, em que definiu o comportamento dos extratos frente as distintas estações do ano. A atividade antimicrobiana foi determinada a partir da concentração inibitória mínima – CIM e, para tanto, analisou-se a concentração mínima necessária para impedir o crescimento microbiano (ação bacteriostática/fungiostática); e a concentração bactericida/fungicida mínima – CBM/CFM, concentração mínima necessária para que ocorra a morte microbiana (ação bactericida/fungicida), todos em triplicata. A influência das estações foi determinada a partir dos valores absolutos de CIM e CBM/CFM e a partir das médias das triplicatas destes mesmos resultados. Foram observadas atividades antimicrobianas substanciais para os extratos etanólicos de *O. rigida*, uma vez que as atividades bacteriostática e bactericida ocorreram em concentrações que variaram entre 19,53 µg/mL - 156,25 µg/mL entre todos os micro-organismos avaliados. Os extratos do verão, outono e inverno foram os que obtiveram os menores valores absolutos de CIM e CBM/CFM, logo as melhores atividades antimicrobianas para todos os micro-organismos testados. A primavera apresentou uma menor atividade antimicrobiana quando comparada às outras estações (P<0,05). *O. rigida* é uma espécie vegetal ainda não referenciada em publicações científicas de interesse biotecnológico clínico, mas que demonstrou ter potencial promissor para novos estudos e possível aplicação como antimicrobiano de origem natural.

Palavras chave: Atividade antimicrobiana. CIM/CBM. Bryophyta. *Orthostichella rigida*

ABSTRACT

The use of medicinal plants in the treatment of diseases is an old strategy used by practically all the populations of the world. Several extracts of medicinal plants have antimicrobial effects, that is why there is a wide range of natural organic compounds of vegetal origin, products of the secondary metabolism, that are biologically active. The research of natural products of plant origin that have an antimicrobial action is justified since the indiscriminate use of antibiotics has contributed to the emergence of resistant microorganisms, mainly those causing diseases with high mortality. The most investigated taxa are the angiosperms, while few data are currently available on other groups of plants, including bryophytes. Representing this group, *Orthostichella rigida* (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill is a moss from Neckeraceae family that, in Brazil, it has a restricted distribution to the Domain of the Atlantic Forest, which has a large part of its territory in the coastal zone. Although there are some studies about the use of bryophytes as a source of bioactive compounds, there is a need for new research aimed at elucidating the existence and potentials of such bioactive compounds, especially in Brazil. The objective of this work was to elucidate the antimicrobial potentials of the ethanolic extracts of the *Orthostichella rigida* moss species, collected on the north coast of RS, Brasil, against the main foodborne pathogenic bacteria *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, as well as against the main pathogens fungi responsible for opportunistic mycoses, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, taking into account the seasonality, that is, the period of collection of the plant samples, so that a profile could be drawn, in which it defines the behavior of the extracts fronts to the different seasons. The antimicrobial activity was determined from the minimum inhibitory concentration - MIC and, for this purpose, the minimum concentration required to prevent microbial growth (bacteriostatic action) was analyzed; and minimum bactericidal concentration - CBM/CFM, minimum concentration required for microbial death (bactericidal action), all in triplicate. The influence of the stations was determined from the absolute values of MIC and CBM/CFM and from the means of the triplicates of these same results. Substantial antimicrobial activities were observed for the ethanolic extracts of *O. rigida* as bacteriostatic and bactericidal activity occurred in concentrations ranging from 19.53 µg/mL - 156.25 µg/mL among all microorganisms evaluated. The extracts from summer, autumn and winter were the ones that obtained the lowest absolute values of MIC and CBM/CFM, thus the best antimicrobial activities for all microorganisms tested. The spring presented a lower antimicrobial activity when compared to the other seasons ($P < 0.05$). *O. rigida* is a plant species not yet referenced in scientific publications for clinical biotechnological interest, but has been shown to have promising potential for new studies and possible application as an antimicrobial of natural origin.

Key words: Antimicrobial activity. MIC / MBC. Bryophyta. *Orthostichella rigida*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	17
Figura 2.....	19
Figura 3.....	19
Figura 4.....	21
Figura 5.....	22
Figura 6.....	22
Figura 7.....	27
Figura 8.....	29
Figura 9.....	31
Figura 10.....	32
Figura 11.....	34
Figura 12.....	36
Figura 13.....	41
Figura 14.....	44
Figura 15.....	45
Figura 16.....	46
Figura 17.....	48
Figura 18.....	50
Figura 19.....	51
Figura 20.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.....	54
Gráfico 2.....	55
Gráfico 3.....	56
Gráfico 4.....	57
Gráfico 5.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	52
Tabela 2.....	52
Tabela 3.....	53
Tabela 4.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	15
2.2 FITOQUÍMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA EM PLANTAS	17
2.3 BRIÓFITAS.....	19
2.2.3 <i>Orthostichella rigida</i>.....	21
2.2.3 Compostos bioativos e atividade biológica em briófitas.....	23
2.4 BACTÉRIAS E FUNGOS.....	24
2.4.1 Patogenicidade.....	26
2.5 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE ORIGEM ALIMENTAR.....	27
2.5.1 Bactérias Gram – negativas	29
2.5.1.1 <i>Salmonella enteritidis</i>	29
2.5.1.2 <i>Escherichia coli</i>	30
2.5.2 Bactérias Gram – positivas.....	32
2.5.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	32
2.5.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.6 PATÓGENOS FÚNGICOS OPORTUNISTAS.....	35
2.6.1 Fungos leveduriformes	36
2.6.1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	36
2.6.1.2 <i>Candida albicans</i>	37
2.7 TERAPIA ANTIMICROBIANA	39
2.8 MÉTODO DE AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 MATERIAL VEGETAL	44
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	44
3.2.1 Diluição dos extratos	45
3.3 MICRO-ORGANISMOS	46
3.3.1 Estocagem e manutenção da cepas microbianas	46
3.3.2 Substância empregada como padrão antimicrobiano.....	46
3.3.3 Padronização da suspensão bacteriana.....	47
3.3.4 Padronização da suspensão fúngica.....	47
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	47

3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47
3.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	48
3.4.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	48
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 CRITÉRIOS PARA ACEITAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	51
4.2 FATORES QUE INFLUÊNCIAM A ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS.....	58
4.3 EFEITO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO UTILIZADA.....	61
4.4 EFEITO DE DIFERENTES COMPONENTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS	62
4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS OBSERVADAS	63
5. CONCLUSÃO.....	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos possuem uma ampla distribuição, uma vez que podem habitar os mais diversos locais, desde diferentes ecossistemas até a microbiota natural do corpo humano, onde estabelecem relações em diferentes graus de parasitismo, mutualismo e comensalismo (BRASIL, 2000). Em geral, são poucos micro-organismos que causam doenças em um hospedeiro, uma vez que as relações entre o corpo humano e os micro-organismos em muitos casos são benéficas e necessárias. Porém, a microbiota normal do corpo está distribuída em regiões distintas e específicas, e a presença de um tipo particular de micro-organismo em uma parte do corpo, onde ele normalmente não é encontrado, pode levar ao surgimento de doenças (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os principais meios de transmissão de um micro-organismo patogênico para um hospedeiro são os veiculados por meio da água ou do alimento. Neste caso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define as DTHA (Doenças de Transmissão Hídricas e Alimentares) como uma “doença de natureza infecciosa ou tóxica causada por ou através de consumo de alimentos ou água contaminados” (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Entre os micro-organismos responsáveis por infecções alimentares, destacam-se, dentre outros, *Salmonella enteritidis* (Gaertner 1888) Castellani & Chalmers 1919 e *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885), (BRASIL, 2010). Já as intoxicações alimentares são causadas principalmente por *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 e *Listeria monocytogenes* (Murray *et al.* 1926) Pirie 1940 (BRASIL, 2010). Segundo estimativas da Agência das Nações Unidas, o número de mortes ao ano por DTHA, em todo o mundo, é de 420 mil (WHO, 2015).

Outros micro-organismos patogênicos, alvos de estudos, são os patógenos fúngicos oportunistas. Na maioria dos casos esses organismos podem ser colonizadores benignos ou saprófitas ambientais, só causando infecções sérias quando há uma diminuição das defesas do hospedeiro, como por exemplo àqueles indivíduos acometidos com a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (TORTORA *et al.*, 2017).

Toda a infecção fúngica é chamada de micose, que por sua vez pode ser classificada como sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista, dependendo do modo de entrada no hospedeiro e o grau de envolvimento tecidual (TORTORA *et al.*, 2017). As micoses oportunistas são mais frequentemente causadas pelos fungos *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. e *Aspergillus* spp. (TORTORA *et al.*, 2017).

No mundo, estima-se que cerca de 11,5 milhões de infecções graves e micoses superficiais são recorrentes de fungos patogênicos, causando 1,5 milhão de mortes por ano (GIACOMAZZI *et al*, 2016). Estes micro-organismos, tanto os patógenos de origem alimentar quanto os patógenos fúngicos oportunistas, são responsáveis por sérias doenças e, como já mencionado, são responsáveis por uma alta mortalidade em todo mundo, aproximadamente dois milhões de mortes por ano (WHO, 2015; GIACOMAZZI *et al*, 2016).

A forma de tratar as enfermidades causadas por micro-organismos patogênicos é utilizando antimicrobianos. Os antimicrobianos são substâncias que têm a capacidade de inibir o crescimento e/ou destruir micro-organismos, estes por sua vez podem ser de origem animal, vegetal ou sintética (SÁEZ-LLORENS, 2000). Dentre os antimicrobianos disponíveis no mercado, cita-se a ciprofloxacina altamente ativa contra as enterobactérias, e o itraconazol, que apresenta um amplo espectro de ação antimicótica (TRABULSI, 2008).

Assim como o advento dos antimicrobianos trouxe muitos aspectos positivos, tratando com eficiência as enfermidades causadas por micro-organismos patogênicos, o seu uso indiscriminado, tanto na medicina quanto na agricultura, tem elevado o surgimento de micro-organismos patogênicos resistentes, bem como tem causado efeitos adversos aos pacientes e grande impacto ambiental. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou, em 2017, um catálogo de “agentes patogênicos prioritários” com 12 famílias de bactérias resistentes aos antibióticos que representam a maior ameaça para a saúde humana, entre elas estão *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. Desta maneira, há a necessidade da descoberta de novos antimicrobianos, que apresentem atividade comparável às dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental (NASCIMENTO, 2000).

Dentre as possíveis fontes de compostos de interesse farmacológico para a formulação de antimicrobianos, as de origem vegetal vêm ganhando destaque entre os pesquisadores. É observado o antigo uso de plantas medicinais ao longo da história da humanidade, cujas funções foram passadas de geração em geração e estabelecidas no uso popular, e hoje servem como embasamento para o desenvolvimento de fitomedicamentos com ação antimicrobiana (BRASIL, 2006, 2009b). Existe uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, que são biologicamente ativos. A

quantidade e qualidade desses metabólitos são influenciadas por vários fatores ambientais como sazonalidade, umidade, temperatura dentre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Os táxons mais investigados são as angiospermas, enquanto poucos dados estão disponíveis atualmente sobre outros grupos de plantas, incluindo as briófitas (ASAKAWA, 1982; MARKHAM, 1988). *Orthostichella rigida* (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill é um musgo, pertencente a família Neckeraceae, a qual não foi referenciada em trabalhos acadêmicos.

Há relatos na literatura sobre a utilização de briófitas na medicina tradicional, principalmente na China e na Europa, porém o seu uso como fonte de compostos bioativos de interesse farmacológico por muito tempo foi negligenciado, fato este que pode ser explicado pelo tamanho reduzido da planta e, conseqüentemente, menor biomassa (ASAKAWA, 1981). Estudos recentes comprovaram o efeito biológico das briófitas, cujos extratos apresentaram alta atividade antimicrobiana em espécies patogênicas (CASTALDO, 1988).

A pesquisa de produtos naturais de origem vegetal que tenham ação antimicrobiana se justifica uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos tem contribuído para o surgimento de micro-organismos resistentes, principalmente os causadores de doenças com alta mortalidade, constituindo-se assim como um importante problema de saúde pública. Vale ressaltar a importância de pesquisar os compostos oriundos de briófitas, uma vez que estas por muito tempo foram desconsideradas dos ensaios para a obtenção de medicamentos e outros produtos de interesse farmacológico. Apesar de existirem alguns estudos que versem sobre o uso de briófitas como fonte de compostos bioativos, há a necessidade de novas pesquisas que visem a elucidação da existência e potencialidades de tais compostos bioativos, especialmente no Brasil. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo a elucidação das potencialidades antimicrobianas dos extratos etanólicos da espécie de musgo *Orthostichella rigida* (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill perante as principais bactérias patogênicas de origem alimentar *Salmonella enterica* Le Minor & Popoff 1987 sorovar enteritidis, *Staphylococcus aureus* (Rosenbach 1884), *Listeria monocytogenes* (Murray *et al.*, 1926) Pirie, 1940 e *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885), bem como frente aos principais patógenos fúngicos responsáveis por micoses oportunistas, *Candida albicans* (Berkhout, 1923) e *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill, levando-se em consideração a sazonalidade, ou seja, o período da coleta das amostras vegetais, para que se possa traçar um perfil temporal, para o qual se descreva a ação dos extratos frente às distintas estações do ano.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana, sendo estas utilizadas por diferentes civilizações, as quais foram transmitidas de geração a geração (RATES, 2001)

A Organização Mundial de Saúde (OMS), define planta medicinal como sendo:

“Todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos.”

Em contrapartida, a Anvisa (2004) define como fitoterápico:

“Todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos.”

Desta maneira, um medicamento fitoterápico (*i.e.*, fitomedicamento) pode ser obtido a partir de plantas medicinais, porém através da tecnologia farmacêutica para ser industrializado, caracterizado por apresentar diversas substâncias químicas (*i.e.*, fitoquímicos) responsáveis pelos efeitos terapêuticos e/ou colaterais, os quais são definidos e conhecidos cientificamente.

Seguindo orientação da Organização Mundial de Saúde (OMS), o Ministério da Saúde criou, em 1998, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde, que define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Para tanto foi criado, em 2008, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o intuito de desenvolver uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular à base de plantas medicinais (BRASIL, 2006, 2009b).

A este respeito, os dois tópicos mais relevantes no desenvolvimento de fitomedicamentos são agentes anticancerígenos e antibióticos. Entre os anos de 1980 e 2010 cerca de 65% dos antibióticos e 35% dos agentes anticancerígenos registrados foram oriundos de produtos naturais ou derivados semissintéticos (ASAKAWA, 2012). Em se tratando especificamente de medicamentos derivados de plantas, estima-se que 90 espécies

de plantas são utilizadas como fonte de compostos farmacologicamente ativos, e que juntas são responsáveis por cerca de 25% dos medicamentos existentes no mercado mundial (CALIXTO, 2000). Entre os vegetais os táxons mais investigados são as angiospermas, enquanto poucos dados estão disponíveis atualmente sobre outros grupos de plantas, incluindo-se as briófitas (ASAKAWA, 1982; MARKHAM, 1988).

Embora não sejam aplicadas diretamente na nutrição humana, as briófitas começaram a ser usadas como plantas medicinais há mais de 400 anos na China, Europa, Índia, Ásia e América do Norte (ASAKAWA, 1990). As primeiras briófitas medicinais foram notadas no primeiro século e, subsequentemente, um número relativamente grande de espécies do Filo Bryophyta foram reconhecidas pelo seu uso medicinal desde o século XVI (DROBNIK & STEBEL 2014, 2015). Em 1600, Caspar Schwenckfeld listou seis nomes botânicos para as briófitas, que especificavam pelo menos quatro espécies usadas como remédio na medicina popular (DROBNIK & STEBEL 2015). Na Ásia, já foram estudadas 500 espécies briófitas com relação à sua química, farmacologia e aplicação como cosméticos e medicamentos, enquanto na China como medicamento para várias doenças, inclusive para doenças de origem bacteriana (ASAKAWA, 2013).

Há exemplos de briófitas utilizadas na medicina popular, pode-se citar o musgo *Polytrichum* spp., cuja ação diurética foi conhecida na Europa do século XVII e usada independentemente na medicina tradicional chinesa e guatemalteca (DROBNIK & STEBEL 2015). Os musgos *Sphagnum* spp., um dos gêneros mais estudados, foram usados para curativos já em 1882. Apesar dos numerosos estudos bioquímicos consolidando os múltiplos efeitos positivos de cura pelo *Sphagnum* spp., eles só foram finalmente aceitos e descritos na década de 1990 (DROBNIK & STEBEL, 2017), o que facilitou a aplicação efetiva de esfagano (um componente do *Sphagnum* sp.) para infecções da pele e feridas.

Desta forma, devida à demanda crescente de produtos naturais, fica evidente a utilização de briófitas como fonte de compostos naturais de interesse farmacológico, bem como a utilização das plantas vasculares, visando a descoberta de novos agentes antibióticos e anticancerígenos provenientes dos extratos vegetais, com o objetivo de descobrir compostos com atividade comparável as dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental (NASCIMENTO, 2000).

2.2 FITOQUÍMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA EM PLANTAS

Fitoquímica se define como “química vegetal”, que se desdobra em química orgânica vegetal e bioquímica vegetal. A primeira trata dos chamados metabólitos primários produzidos pelas plantas (proteínas, lipídeos, carboidratos), enquanto que a segunda estuda os metabólitos secundários (alcalóides, terpenos, flavonóides, lignanas, taninos, glicosídeos) (SIMÕES, 2004). Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, é biologicamente ativa. Estimava-se, já na primeira metade dos anos 1990, que o número de componentes com atividade biológica comprovada fosse de cerca de 2.793 compostos (HARBONE & BAXTER, 1993).

Os metabólitos secundários são compostos químicos, produtos do metabolismo secundário das plantas, variáveis entre as categorias taxonômicas, proporcionando singularidade a cada espécie. Esses metabólitos possuem atividades biológicas envolvidas nos mecanismos de adaptação da planta a seu meio, como por exemplo proteção ao pastejo por insetos e herbívoros, além de oferecerem proteção às doenças vegetais e não apresentarem funções diretamente relacionadas ao crescimento e desenvolvimento da planta, como é visto nos metabólitos primários (ASAKAWA, 2007). A quantidade e qualidade desses metabólitos são influenciadas por vários fatores ambientais como sazonalidade, umidade, temperatura, dentre outros (Figura 1) (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

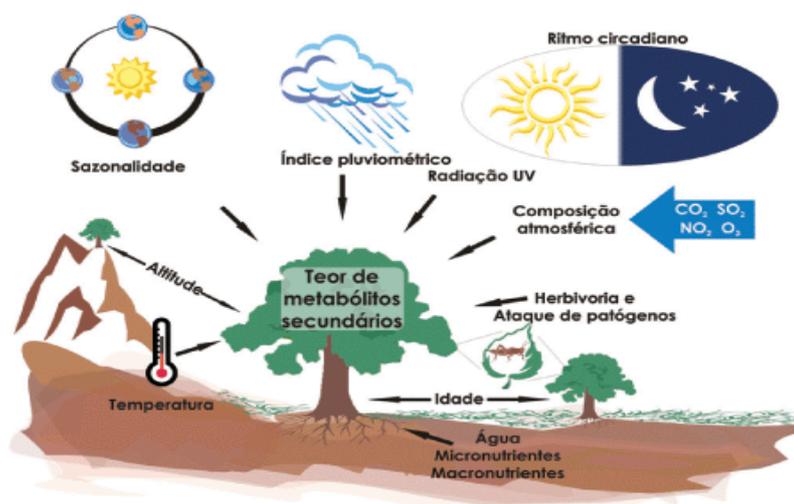


Figura 1. Fatores que alteram quantitativamente e qualitativamente os metabólitos secundários (GOBBO- NETO & LOPES, 2007).

A atividade antimicrobiana se destaca dentre as atividades biológicas de origem vegetal existentes. Uma vez que o potencial antimicrobiano das plantas está diretamente relacionado à composição química de cada espécie, se faz necessário a identificação e

caracterização dessas substâncias para que se possa comprovar sua eficácia na ação antimicrobiana (BURT, 2004). Para tanto, utilizam-se os óleos essenciais e extratos vegetais como objetos de pesquisas, afim de testar o uso potencial destes como antimicrobianos na terapêutica de doenças infecciosas (AL-REZA, 2010). Os princípios ativos dos óleos e extratos vegetais podem ser encontrados em todo tecido vivo de plantas e são, geralmente, quimicamente constituídos de fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, assim como o tanino, cumarina, terpenóides, alcalóides, lectinas e polipeptídios (ASAKAWA, 1982).

Os estudos sobre atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas têm sido relatados em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil, orientados pelo seu uso na medicina tradicional na tentativa de se encontrar extratos com atividades biológicas e com ações terapêuticas contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos filamentosos (HOLETZ, 2002). Como revisão, pode-se citar o estudo de Wiest *et al.* (2009) frente aos isolados de *Salmonella* spp. que testou extratos aquosos, alcoólicos e hidroalcoólicos de 86 plantas “superiores”, em que 58% apresentaram algum fator inibidor sobre o micro-organismo; e um levantamento bibliográfico de Silva (2011), o qual analisou 44 trabalhos publicados de 1991 a 2010, referentes à atividade antimicrobiana de plantas medicinais “superiores” frente à *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dentre outros, para os quais também foi observado algum grau de atividade antimicrobiana.

A forma de ação dos princípios ativos de extratos vegetais sobre as células bacterianas é muito similar ao dos antimicrobianos convencionais, ou seja, (i) desintegração da membrana citoplasmática, (ii) desestabilização da força próton motriz (FPM), (iii) fluxo de elétrons, (iv) transporte ativo e (v) coagulação do conteúdo da célula, representados na Figura 2 (BURT, 2004).

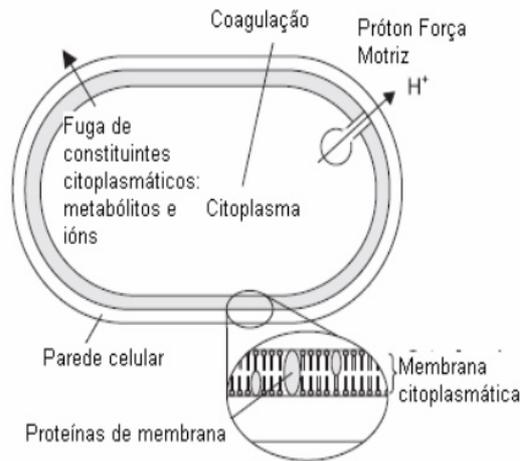


Figura 2. Locais e mecanismo de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana (BURT, 2004).

Para as células fúngicas a forma de ação se dá por meio da ruptura da membrana celular, inibição de síntese de DNA/RNA, inibição da síntese de ergosterol, inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos e na inibição da formação de microtúbulos (Figura 3) (MADIGAN *et al.*, 2010).

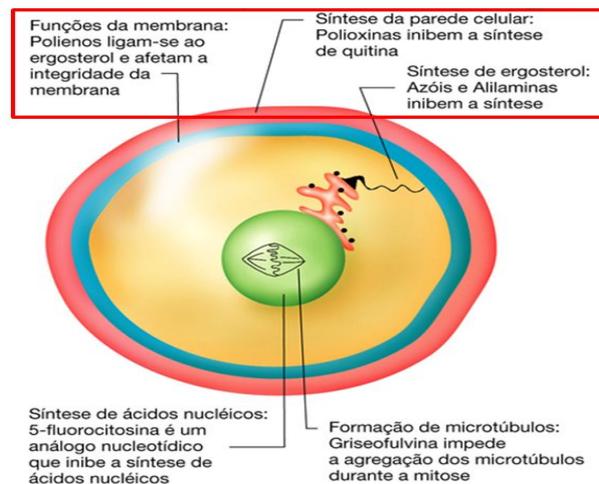


Figura 3. Locais e mecanismo de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula fúngica (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.3 BRIÓFITAS

As briófitas são pequenas plantas terrestres, criptogâmicas e avasculares, ou seja, não possuem vasos de transporte, como o xilema e o floema (VANDERPOORTEN & GOFFINET 2009), podendo viver em diferentes tipos de substrato, como em troncos e ramos de árvores (corticólicas), folhas (epífilas), troncos em decomposição (epíxilas) solo (terrícolas) ou rochas (rupícolas). Ocorrem, normalmente, em lugares úmidos, mas possuem uma alta tolerância a lugares inóspitos, sendo encontradas desde o Ártico e Antártica até

desertos e ambientes submersos (DELGADILLO & CÁRDENAS, 1990). São plantas pioneiras na colonização de ambientes alterados e atuam no combate à erosão do solo e na manutenção da umidade dos ecossistemas, pois acumulam a água da chuva (PÓCS, 1982; SCHOFIELD, 2001). Estão incluídas no grupo das criptógamas, por não produzirem sementes, flores nem frutos. Possuem um ciclo de vida com alternâncias de gerações, onde a geração gametofítica haplóide (n) é dominante e a geração esporofítica diplóide (2n) é dependente da gametofítica (VANDERPOORTEN & GOFFINET, 2009).

Briófita é um termo artificial utilizado para designar o conjunto de três diferentes grupos vegetais que juntos formam um clado parafilético e se subdividem em três linhagens: as hepáticas, mais basais e representadas pela Divisão Marchantiophyta, os musgos, representados pela Divisão Bryophyta e os antóceros, grupo mais derivado e constituinte da Divisão Anthocerothophyta (GOFFINET & SHAW, 2009). De acordo com Goffinet & Shaw (2009), as briófitas correspondem, em número de espécies, ao segundo maior grupo de plantas terrestres existentes, com cerca de 18.000 espécies descritas, sendo cerca de 100 espécies de antóceros, 5.000 de hepáticas e 13.000 de musgos, atrás somente das angiospermas. A maior diversidade encontra-se na Região Neotropical, com cerca de 4.000 espécies (GRADSTEIN *et al.* 2001).

No Brasil, estima-se que a brioflora apresente cerca de 1.534 espécies, sendo que a maior riqueza é encontrada na Floresta Atlântica, sendo reconhecidas 1.337 espécies (COSTA & PERALTA, 2015). O Domínio da Floresta Atlântica cobre cerca de 15% do território nacional, ocorrendo deste o estado do Rio Grande do Sul, até o estado do Rio Grande do Norte, são cerca de 17 estados brasileiros. É um complexo de ecossistemas de grande importância, pois abriga uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil; estima-se que este domínio abrigue cerca de 20.000 espécies de plantas, das quais 30% são endêmicas (MITTERMEIER *et al.*, 2004). Assim sendo, o Domínio da Mata Atlântica, é a região mais rica região do Brasil em termos de diversidade de briófitas, com cerca 71% dos táxons reconhecidos para o país, 30% para o neotrópico e 6% para o mundo (STEHMANN *et al.*, 2009). No total existe 242 espécies endêmicas da Mata Atlântica o que corresponde a 13% da brioflora conhecida para o País (COSTA & PERALTA, 2015).

Quando se faz uma análise de diversidade por região, temos que a Região Sul é a segunda com maior em número de espécies de briófitas, um total de 843, sendo que no Estado do Rio Grande do Sul são encontradas cerca de 569 espécies (COSTA & PERALTA,

2015). No Litoral Norte do Rio Grande do Sul são conhecidas até o momento 47 espécies de briófitas agrupadas em 27 famílias, sendo que as espécies de musgos ocorrem em maior número com 30 espécies identificadas, e 17 de hepáticas (WEBER *et al.*, 2014; CHILANTI & BORDIN, 2016).

2.2.3 *Orthostichella rigida*

Orthostichella rigida (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill (Figura 4) é um musgo, predominantemente epifítico e que, frequentemente, cresce em massas densas e pendentes. Pertencente à Divisão Bryophyta, Classe Bryopsida, Ordem Hypnales.

Existe uma problemática com relação à posição taxonômica do gênero *Orthostichella*, sendo que alguns autores o colocam na Família Meteoriaceae, outros na Lembophyllaceae e ainda outros na Neckeraceae (ALLEN & MAGILL, 2007). Esta distinção é ocasionada devido ao fato de que estas famílias apresentaram características morfológicas muito semelhantes, sendo todas pertencentes à Ordem Hypnales (BUCK & GOFFINET, 2000). Segundo Allen & Magill (2007), as características gametofíticas mostram variações significativas em *Orthostichella*, o que justificaria a dúvida sobre a qual família realmente este gênero pertence: tamanho relativo da planta; forma de folha; postura da folha; desenvolvimento da costa; e forma do ápice da folha.

No presente estudo, seguiremos a classificação descrita por Goffinet *et al.* (2009) e Allen & Magill (2007) que reconhecem o gênero *Orthostichella* pertencente à Família Neckeraceae, a qual é reconhecida como a maior da ordem, a qual compreende 37 gêneros, que juntos somam 140 espécies aceitas (GOFFINET & SHAW *et al.*, 2009). A espécie citada faz parte do gênero *Orthostichella*, o qual compreende outras nove espécies (ALLEN & MAGILL, 2007).

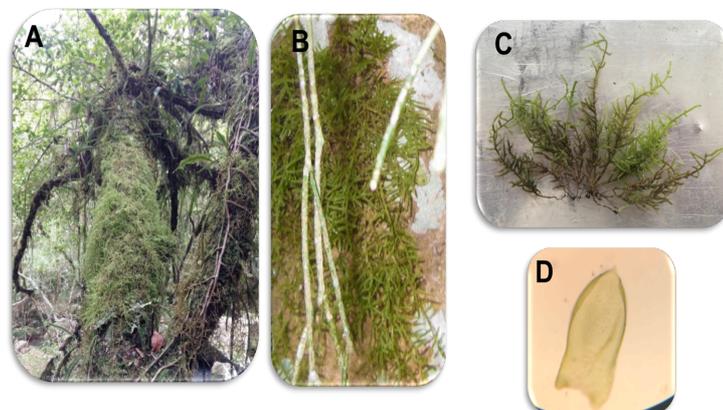


Figura 4. (A-B) *Orthostichella rigida* (Müll. Hal.) B.H. Allen & Magill em seu hábito pendente; (C) Gametófitos ramificados; (D) Filídios ecostados. Foto: Autora.

Em termos de distribuição, *O. rigida* encontra-se mundialmente distribuída na Região Neotropical e Paleártica (Figura 5) (ALLEN & MAGILL, 2007).



Figura 5. Mapa de distribuição mundial de *Orthostichella rigida* de acordo com o Global Biodiversity Information Facility (GBFI).

No Brasil, de acordo com Vilas Bôas-Bastos (2018), esta espécie é naturalizada com ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, exclusivamente no Domínio Fitogeográfico Mata Atlântica (Figura 6).



Figura 6. Mapa de distribuição nacional de *Orthostichella rigida* de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (Vilas Bôas-Bastos, 2018 – Flora do Brasil 2020).

2.2.3 Compostos bioativos e atividade biológica em briófitas

A utilização de briófitas como fonte de compostos bioativos por muito tempo foi negligenciada por apresentarem um tamanho reduzido e, conseqüentemente, menor biomassa (ASAKAWA, 1981). No entanto, observações em campo mostraram que briófitas são raramente atacadas por patógenos, o que sugere a presença de um metabolismo químico com metabólitos secundários que as permitem evitar o ataque destes patógenos (ASAKAWA, 2007). Outros detalhes que tornam este grupo altamente bioativo é o fato de apresentarem características reprodutivas exclusivas, com uma eficiente plasticidade fenotípica, bem como estruturais evidenciadas pela sua alta tolerância à dessecação e resistência aos ambientes extremos (CARRIÓN, 2003). Estudos demonstraram, efetivamente, que os musgos e as hepáticas são uma fonte rica de compostos secundários os quais estão ligados ao sistema de defesa, desenvolvido ao longo de milhões de anos de evolução, uma vez que os mesmos possuem datação do Ordoviciano Médio, cerca de 475 milhões de anos atrás (XIE & LOU, 2009).

Nas briófitas, que são as plantas terrestres mais simples, as barreiras anatômicas são menos efetivas e, como consequência, a síntese de moléculas particulares, metabólitos secundários com atividade antimicrobiana: a chamada "barreira química" (HARBORNE, 1988) é o mecanismo de defesa mais eficaz. Desta maneira, as briófitas são um rico depósito de componentes biologicamente ativos, como terpenóides, flavonóides, glicosídeos, taninos e outros compostos aromáticos (XIE & LOU, 2009). Nos últimos anos, mais de 400 novos compostos químicos foram isolados das briófitas e estruturalmente elucidados (ASAKAWA, 2013).

De acordo com Schuster (1984), a primeira publicação sobre química de briófitas foi a dissertação de Lohmann em 1903, a qual estudou o efeito de óleos essenciais de hepáticas como inibidoras de apetite em caracóis, e dois anos depois um artigo de Karl Muller sobre óleos essenciais em hepáticas. Após esses trabalhos, passou-se um período de quase 50 anos sem trabalhos relativos à química de hepáticas e musgos, retornando apenas na década de 1950, quando um grupo japonês começou a estudar os óleos essenciais em hepáticas e em 1963, com o estudo da química de briófitas (SCHUSTER, 1984). O longo período de abandono pode ser atribuído, principalmente, à dificuldade na coleta e aquisição de grandes quantidades de material (biomassa vegetal), aos procedimentos laboriosos necessários para a obtenção de substâncias puras e seu escasso ou nulo uso na dieta humana (ZINSMEISTER *et al.*, 1991).

Na década de 1950, o notável efeito antibacteriano de algumas espécies (*Anomodon rostratus* (Hedwig) Schimpe, *Orthotrichum rupestre* Schleich e *Plagiomnium cuspidatum* (Hedwig) T. J. Koponen) (MCCLEARY, 1960) atraiu interesse científico, e alguns anos depois, o primeiro estudo extensivo sobre este tópico, incluindo a análise de 50 espécies, foi publicado (MCCLEARY, 1966). Em um estudo abrangente publicado em 1979, a atividade antibiótica de 52 espécies foi examinada em oito cepas bacterianas; 56% das espécies testadas eram ativas contra, pelo menos, uma das bactérias de teste (BANERJEE, 1979). Desde então, várias espécies dos gêneros *Bazzania*, *Conocephalum*, *Diplophyllum*, *Dumortiera*, *Marchantia*, *Metzgeria*, *Lunularia*, *Pellia*, *Plagiochila*, *Porella*, *Radula* e *Riccardia* foram relatadas como tendo atividade antimicrobiana (KIM, 2007; BAEK, 2004).

Outros estudos foram realizados, com destaque para os que testaram potencial antifúngico (Wu, 2008), antibacteriano e antiviral (VAN HOOFF, 1981; SINGH, 2006) e antioxidante (CIOFFI, 2011) em hepáticas e musgos. Há também evidências na literatura que confirmam a atividade antibiótica produzida pelas briófitas contra fungos e células procarióticas. Isso é bem conhecido para *Conocephalum conicum* (L.) Dum, *Mnium undulatum* Hedw. e *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warns, cujos extratos apresentaram alta atividade antimicrobiana contra espécies bacterianas patogênicas (CASTALDO, 1988).

No Brasil, são conhecidos apenas dois estudos sobre a fitoquímica e/ou atividade biológica em briófitas: PINHEIRO *et al.* (1989), os quais analisaram as briófitas como fonte de compostos antibióticos e, recentemente, COSTA *et al.* (2018), que analisaram a diversidade de metabólitos secundários em *Syzygiella rubricaulis* (Nees) Steph em populações do México, Venezuela, Equador e Brasil, verificando a existência de 50 diferentes componentes.

2.4 BACTÉRIAS E FUNGOS

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA), micro-organismo é todo organismo uni ou pluricelular, não visível a olho nu, que ocorra na natureza como célula isolada ou agregados de células. Desta maneira, esta definição acaba considerando táxons filogeneticamente distintos, incluindo as bactérias, arqueas, fungos, protozoários e vírus. Estes organismos habitam os mais diversos locais, desde diferentes ecossistemas até a microbiota natural do corpo humano, onde estabelecem relações em diferentes graus de parasitismo, mutualismo e comensalismo (BRASIL, 2000). Atualmente, a classificação

filogenética de micro-organismos, sugerida por (WOESE *et al.*, 1990), aloca os diferentes grupos em três grandes Domínios: Archaea, Bacteria e Eucarya.

Os organismos inseridos no Domínio Bacteria, são seres procariotos, unicelulares que não apresentam membrana nuclear, mitocôndria, complexo de Golgi, ou retículo endoplasmático; se reproduzem por divisão assexuada. As espécies de bactérias podem ser divididas em dois grupos principais, as chamadas Gram-positivas e Gram-negativas. Esta distinção é baseada na reação de coloração de Gram, esta técnica confere diferentes cores a diferentes tipos de células, desta maneira após a coloração as bactérias Gram-positivas coram-se em roxo-violeta, enquanto as bactérias Gram-negativas, em cor-de-rosa (MADIGAN *et al.*, 2016). Esta diferença de coloração é explicada pela diferença na estrutura da parede celular das células Gram-positivas e Gram-negativas, a primeira possui uma parede celular com uma camada bem espessa de peptidoglicano, enquanto a segunda é constituída de uma parede celular com uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa sobreposta (MURRAY *et al.*, 2014).

Em relação ao número de espécies de bactérias, não há nenhuma estimativa precisa, porém, os taxonomistas microbianos já caracterizaram mais de 10 mil espécies e creem que sua diversidade filogenética seja, sem dúvidas, superior a todas as espécies de plantas e animais juntas (MADIGAN *et al.*, 2016). Estima-se que existam mais de 80 filos de bactérias, porém cerca de 90% das espécies descritas estão classificadas em apenas quatro filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. O primeiro filo é o maior e metabolicamente mais diverso e é nele que estão classificadas a maioria das bactérias conhecidas que possuem interesse médico, industrial e agrícola, este filo é caracterizado por contemplar apenas bactérias Gram-negativas. Os dois seguintes, Actinobacteria e Firmicutes somados ao Filo Firmicutes compreendem as bactérias Gram-positivas e juntos somam quase metade das espécies de bactérias já caracterizadas. Por último, os Bacteroidetes contém cerca de 700 espécies e são caracterizadas por serem bacilos Gram-negativos e normalmente sacarolíticas e aeróbias ou fermentativas (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os fungos estão inseridos no Domínio Eucarya, desta maneira, diferentemente das bactérias, são organismos eucariotos que podem ser unicelulares ou multicelulares, são amplamente disseminados e consistem em bolores, cogumelos e leveduras. Morfologicamente, podem ser agrupados em leveduras e fungos filamentosos, o primeiro são fungos unicelulares, geralmente esféricos ou ovais, enquanto o segundo consiste em

organismos multicelulares que possuem longos filamentos de células conectadas denominadas hifas (TORTORA *et al.*, 2017).

Estes organismos podem ser alocados, de acordo com aspectos filogenéticos em cinco filos fúngicos distintos: Chytridiomycota, conhecidos como quitrídios, degradam matéria orgânica e são parasitas de animais, plantas e protistas; Zygomycota, conhecidos principalmente por seu papel na deterioração de alimentos; Glomeromycota, fungos importantes em algumas associações micorrízicas; Ascomycota, constitui um grande grupo e muito diverso de fungos que variam de espécies unicelulares, como as leveduras até as espécies que crescem em forma de filamentos como o bolor; e os Basidiomycota, com mais de 30.000 espécies descritas, correspondem aos cogumelos, dos quais alguns são comestíveis e outros venenosos para os seres humanos. Este filo inclui também as ferrugens e um importante grupo fúngico patógeno humano, *Cryptococcus* spp. (MADIGAN *et al.*, 2016).

Quanto às Archaeas, as mesmas possuem características semelhantes tanto a procariotos como eucariotos, mas também possuem características próprias. Dentre suas características distintivas, temos a composição de sua membrana citoplasmática, e a ausência de peptideoglicano em suas paredes celulares, propriedade comum a todas as bactérias (Kandler & König, 1998). Originalmente, o Domínio *Archaea* foi dividido em dois filos formalmente aceitos até hoje: Euryarchaeota e Crenarchaeota. Euryarchaeota é um filo fenotipicamente heterogêneo, composto por organismos com fisiologias bastante distintas, tais como archaeas metanogênicas, termoacidófilas, halófilas, além de algumas hipertermófilas (Forterre *et al.*, 2002). O Filo Crenarchaeota continha apenas organismos termófilos e foi considerado inicialmente como um filo mais ancestral e homogêneo (Madigan *et al.*, 2010).

2.4.1 Patogenicidade

A capacidade de um micro-organismo de causar doenças no seu hospedeiro é denominada patogenicidade e se inicia com a exposição e aderência dos micro-organismos às células hospedeiras, seguida pela invasão, infecção e, finalmente, pela doença. Cada patógeno apresentará propriedades únicas que irão determinar a sua patogenicidade, bem como as diferenças de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro ao micro-organismo (MADIGAN *et al.*, 2016). Em geral, poucos são os micro-organismos patogênicos, uma vez que muitos deles são benéficos e necessários para o organismo humano. Estima-se que o corpo humano contenha um número estimado de 1×10^{14} células bacterianas (ou 10 vezes

mais células bacterianas do que células humanas). A microbiota normal do corpo está distribuída em regiões distintas no corpo, e a presença de um tipo particular de micro-organismo em uma parte do corpo onde ele normalmente não é encontrado pode acarretar no surgimento de doença (MADIGAN *et al.*, 2016).

O organismo possui sistema imune inato que tem como alvo patógenos comuns, independentemente de sua identidade e um sistema imune adaptativo, tendo como alvo patógenos específicos. Quando o sistema imunológico do corpo humano está comprometido, os micro-organismos, que fazem parte da microbiota normal do corpo, podem torna-se patogênicos, sendo considerados oportunistas, ou seja, causam doenças em indivíduos imunocomprometidos, por sua vez os patógenos que causam doenças em indivíduos saudáveis, ou seja, que não possuem seu sistema imunológico comprometido, os chamados imunocompetentes, são considerados patógenos primários (TORTORA *et al.*, 2017).

As principais fontes, ou reservatórios, que se encontram esses micro-organismos patogênicos incluem, o próprio corpo humano, como citado anteriormente, animais domésticos e silvestres ou, ainda, reservatórios inanimados, como a água e o solo. Cada fonte fornece ao patógeno condições adequadas de sobrevivência e multiplicação, assim como a oportunidade de ser transmitido. A transmissão de um patógeno para um hospedeiro suscetível pode se dar por três vias: (i) por contato, neste caso transmissão se dá pelo contato físico entre o patógeno e um hospedeiro; (ii) por veículos, dispersão do agente infeccioso por um meio como a água, alimento ou ar; e (iii) por vetores, neste caso os artrópodes são o grupo mais importante, pois são os principais responsáveis por transportar patógenos de um hospedeiro a outro (MADIGAN *et al.*, 2016).

2.5 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE ORIGEM ALIMENTAR

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define as DTHA (Doenças de Transmissão Hídricas e Alimentares) como “doenças de natureza infecciosa ou tóxica causadas por ou através de consumo de alimentos ou água contaminados” (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Desta maneira, as doenças transmissíveis por alimentos podem ser classificadas em infecções alimentares, intoxicações alimentares, ou ainda toxinfecção alimentar, caso em que algumas doenças transmissíveis por alimentos se enquadram em ambas as categorias (BASSAN *et al.*, 2008).

A intoxicação alimentar é uma doença resultante da ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. Não é necessário que os micro-organismos produtores de

toxinas cresçam no hospedeiro, e estes muitas vezes nem estão vivos quando o alimento contaminado é consumido; a ingestão e a atividade da toxina é o que desencadeia a doença, exemplo disso são as infecções estafilocócicas. Contrariamente à intoxicação alimentar, a infecção alimentar é uma infecção microbiana resultante da ingestão de alimento contaminado, contendo quantidades suficientes de patógenos viáveis capazes de promover a colonização e o crescimento do micro-organismo no hospedeiro, finalmente resultando em doença, como por exemplo os casos de listerioses. Por fim, a toxinfecção causada por alimentos é a ingestão de alimentos com certa quantidade de micro-organismos causadores de doenças, os quais depois de ingeridos liberam toxinas, como no caso das salmoneloses (BARBOSA, 2009). Entre os micro-organismos responsáveis por infecções alimentares, destacam-se *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* (BRASIL, 2009). Já as intoxicações alimentares são causadas por *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (cepa emética) e *Clostridium botulinum* (BRASIL, 2009). A espécie *Salmonella enteritidis* é o patógeno entérico de origem alimentar mais frequentemente descrito na literatura nas ocorrências de toxinfecções em seres humanos (BASSAN *et al.*, 2008).

O Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por alimentos (VE-DTA) foi implantado no Brasil, em 1999, devido ao aumento dos casos de DTHA no País. O mesmo tem como objetivo obter mais informações a respeito das DTHA no território brasileiro, além de subsidiar medidas de prevenção e controle contribuindo então para melhoria da qualidade de vida da população (BRASIL, 2014). Segundo estimativas da Agência das Nações Unidas, o número de mortes ao ano por DTHA, em todo o mundo, é de 420 mil. Nas Américas, por exemplo, são nove mil mortes e a estimativa é de que 600 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente. Apesar destes dados, estima-se que muitos casos de DTHA passam despercebidos, ou seja, não são declarados ou investigados (WHO, 2015). O Rio Grande do Sul é considerado o Estado que mais tem investigado e notificado de forma eficaz seus surtos alimentares (BRASIL, 2014).

No Brasil, entre os anos de 2000 e 2011 foram notificados 8.663 surtos de doenças veiculadas por alimentos com 163.425 pessoas doentes e 112 óbitos (BRASIL, 2011). Em um estudo comparativo entre os anos de 2015 e 2016, em que foram identificados 673 e 543, respectivamente, pôde-se observar uma redução de 19,3% dos surtos epidemiológicos entre estes períodos (BRASIL, 2017). Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, entre os anos de 2000 e 2015, foram confirmados 1.148 surtos de DTHA envolvendo cerca de 25.372

indivíduos e deixando 10 mortes. (RIO GRANDE DO SUL, 2016). Os agentes etiológicos de maior incidência foram *Salmonella* spp., seguido de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, e, os principais alimentos envolvidos nestes surtos foram maionese à base de ovos e produtos cárneos (RIO GRANDE DO SUL, 2016).

2.5.1 Bactérias Gram – negativas

2.5.1.1 *Salmonella enteritidis*

Salmonella é um gênero do Filo Proteobacteria composto por duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Esta última inclui seis subespécies, que juntamente com *Salmonella bongori* englobam cerca de 2.610 serovares (TINDALL *et al.*, 2005). Seu hábitat normal é o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais, sendo também comuns em esgotos, uma vez que sua presença no trato intestinal possibilita a sua eliminação pelas fezes. Todas as *Salmonella* são consideradas patogênicas em algum grau, causando a febre tifoide, causada pela *Salmonella enterica* serovar Typhy, as febres entéricas causadas pela *Salmonella enterica* serovar Parathyphy e a salmonelose, causada principalmente pelas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, ilustrada abaixo (Figura 7) (FRANCO & LANDGRAF, 2005).



Figura 7. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.
Foto: James Archer.

A salmonelose causada pela *Salmonella enteritidis* passou a ser, a partir das décadas de 70 e 90, uma das principais zoonoses da Europa e Estados Unidos da América, e Brasil, respectivamente (SILVA, 2002; PERESI, 1998). Caracterizada por ser uma doença gastrointestinal decorrente da ingestão de alimentos contaminados de origem animal, principalmente carnes, aves, ovos e leite ou por meio do manuseio de animais ou produtos animais contaminados pela bactéria; já foram relatados cerca de 1,4 milhões de casos, com cerca de 400 óbitos (KNODLER, 2010). Já a febre tifoide, considerada a doença mais grave, causada por membros do gênero, com mais de 21 milhões de casos registrados e com 200.000 mortes anuais em todo o mundo (DEVI, 2010); diferentemente das *Salmonella* spp. que causam salmonelose, esse patógeno não é encontrado em animais, eles são patógenos humanos estritos, desta maneira estas infecções são transmitidas de pessoas para pessoas, disseminado principalmente pelas fezes (MURRAY *et al.*, 2014).

Nos Estados Unidos estima-se que o gênero *Salmonella* seja responsável por um milhão dos casos de doenças transmitidas por alimentos DTHA notificados, sendo que 28% dos casos resultam em óbitos em decorrência das DTHA (SCALLAN *et al.*, 2011). No Brasil, segundo dados epidemiológicos da Anvisa, o serovar *S. enteritidis* possui a maior taxa de prevalência nos surtos de salmonelose em humanos (MICRO-ORGANISMO, 2011). Quanto aos surtos alimentares confirmados laboratorialmente de 1999 a 2009 no País, cerca de 42,5% destes tiveram como agente etiológico bactérias do gênero *Salmonella*, frequência muito provavelmente subestimada (BARBOSA, 2009). Um outro estudo mostra que *Salmonella* é o principal agente identificado em DTHA, responsável por 19,16% dos casos entre 2000 a 2011, com 1660 casos confirmados (BRASIL, 2011).

2.5.1.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (Figura 8) é uma enterobactéria, pertencente ao Filo Proteobacteria, sendo a mais comum e importante dentre as sete espécies que compõe o gênero *Escherichia* spp. (LEVINSON, 2010). Esta espécie é encontrada normalmente nos intestinos dos animais e do homem, exercendo a função de suprimir bactérias nocivas e participa da síntese de diversas vitaminas, representando cerca de 80% da microbiota intestinal aeróbia (FRANCO & LADGRAF, 2005). Por ser encontrada naturalmente nos intestinos humanos e de animais, estes micro-organismos acabam sendo eliminados pelas fezes, desta maneira o contágio por *E. coli* se dá através da ingestão de água ou alimentos que não foram processados e tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção (ALVES, 2012).



Figura 8. Modelo 3D da Bactéria *Escherichia coli*. Foto: James Archer.

Apesar de alguns sorotipos de *E. coli* serem considerados comensais para humanos e animais, outros estão associados a uma variedade de doenças, incluindo gastroenterite e infecções extra intestinais como infecções do trato urinário (ITU), meningites e sepses (MURRAY *et al.*, 2014). Estas linhagens patogênicas são agrupadas, com base no tipo de toxina que produzem e nas doenças específicas que acarretam, em seis grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), comumente conhecida como causadora da diarreia dos viajantes; *E. coli* enteropatogênica (EPEC), que causa diarreia aquosa em crianças; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que causa diarreia sanguinolenta, esse grupo inclui a *E. coli* STEC, produtora de shigatoxina; *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), que causa diarreia aquosa persistente; *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), que causa febre e diarreias profusas contendo muco e sangue; e por fim, *E. coli* difusamente adesiva (DAEC), que tem sido associada em alguns estudos, de forma não consistente, com diarreia (TORTORA *et al.*, 2017). Essa bactéria possui diversos fatores de virulência, dentre eles: os pili, endotoxina e exotoxinas (enterotoxinas) (FREMAUX *et al.*, 2008).

De acordo com uma nota divulgada pelo Ministério da Saúde (2011), o surto mais recente atribuído a *E. coli* é o caso ocorrido em 2011 na Europa causado pela estirpe *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), em que aparentemente se iniciou na Alemanha e se espalhou rapidamente pelos países do continente europeu e em muitos casos evoluía para casos de

Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS). Foram registrados casos em 16 países da Europa e América do Norte, totalizando-se 3167 casos de EHEC com 16 casos de óbito e 908 casos de HUS sendo que desses, 34 resultaram em óbito. Após investigação epidemiológica, o alimento identificado como veiculador do surto foi o broto de feijão que normalmente é consumido cru (FAO/WHO, 2011). No Brasil, de acordo com dados de 2000 a 2014 do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA), na maioria dos casos (51,34%) o agente etiológico não foi identificado, porém entre as bactérias identificadas *E. coli* ocupa o terceiro lugar com 6,33% dos casos. Um estudo realizado por Welker *et al.* (2010) no período que compreendeu os anos de 2006 e 2007, no Rio Grande do Sul, verificou-se que na maioria dos casos de surtos de DTHA *E. coli* foi a responsável, totalizando-se 126 casos.

2.5.2 Bactérias Gram – positivas

2.5.2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (Figura 9) pertence ao Filo Firmicutes e encontra-se disseminada na natureza, como por exemplo no solo, silagem, montes de esterco, pasto, fardos úmidos de feno, locais de processamento de alimentos, carnes cruas e fezes animais e humanas. O gênero *Listeria* compreende 10 espécies, sendo que apenas *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são consideradas patogênicas. A primeira é um patógeno humano significativo enquanto que a segunda é primariamente um patógeno animal (MURRAY *et al.*, 2014).



Figura 9. Modelo 3D da Bactéria *Listeria monocytogenes*. Foto: Katcryna Kon.

Após entrar no hospedeiro por via oral, devido à ingestão de alimentos contaminados, estes micro-organismos causam uma infecção alimentar gastrointestinal, chamada listeriose que pode levar à bacteriemia (presença de bactérias no sangue) e meningite (MADIGAN *et al.*, 2016). A transmissão pode ocorrer por outras vias, tais como vias aéreas, a cutânea, a transplacentária, a nosocomial, por contato direto ou por via digestiva, que é realmente a via mais comum de transmissão (CAMEJO *et al.*, 2011). Estas infecções são normalmente oportunistas, acometendo principalmente indivíduos com o sistema imunológico debilitado, incluindo mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos (BRASIL, 2011).

L. monocytogenes tem como característica multiplicar-se entre uma ampla faixa de temperatura, entre 2,5°C e 44°C, bem como em uma ampla faixa de pH, de 4,4 a 9,6, resistindo assim a sucessivos congelamentos e descongelamentos. É também anaeróbica facultativa com metabolismo fermentativo, por este motivo se multiplica bem em ambientes com baixa quantidade de O₂ e aumento na tensão de CO₂ (FRANCO & LANDGRAF, 2005; LOGUERCIO *et al.*, 2001). Desta maneira, estas características tornam produtos embalados à vácuo ou em atmosfera modificada, como os produtos cárneos prontos para consumo, os queijos cremosos frescos, os laticínios não pasteurizados e o leite pasteurizado inadequadamente, importantes fontes de listeriose humana, uma vez que permitem a multiplicação da bactéria, apresentam uma longa vida de prateleira quando refrigerados e são frequentemente consumidos sem cozimento prévio (ILSI, 2005).

A listeriose é uma doença de baixa incidência, porém a taxa de mortalidade é de 30% para recém-nascidos, 35%, em adultos (sem gravidez), 11% para adultos com menos de 40 anos e 63% para adultos com mais de 60 anos. Quando ocorre septicemia, a taxa de letalidade é de 50% e para a meningite pode chegar a 70% (BRASIL 2009). No Rio Grande do Sul, foram registrados dois surtos de *Listeria* nos últimos anos, em 2007 e 2009, ambos com 19 doentes no total e nenhum óbito. No entanto, só em 2016, foram 22 mortes no País causadas por meningite ocasionada pela bactéria, segundo dados obtidos pelo Ministério da Saúde (2016). Recentemente, entre o final do semestre de 2017 e começo de 2018, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a África do Sul sofreu o maior surto de listeriose registrado no mundo, em que um total de 945 casos foram reportados e 176 pessoas morreram, devido ao consumo de carne conhecida como “polony”, produzida pela Enterprise Food. O segundo foi nos Estados Unidos em 2011 com 143 casos reportados, com 13 mortes, devido ao consumo de melões contaminados (ESTADO HOME PAGE).

2.5.2.2 *Staphylococcus aureus*

Um dos agentes bacterianos mais comuns associados à intoxicação alimentar é a bactéria *Staphylococcus aureus* (Figura 10) (GÖTZ *et al.*, 2006). O gênero pertence ao Filo Firmicutes e possui 33 espécies (BASTOS *et al.*, 2013). Os estafilococos existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos ou equipamentos de processamento de alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, e também são frequentemente encontrados em diversas partes do corpo, tais como fossas nasais, garganta, intestinos e pele; sendo que as narinas são consideradas o maior sítio de colonização, com prevalência de aproximadamente 40% na população adulta saudável (GRUNDMANN *et al.*, 2009). Todavia, podem provocar infecções que vão desde infecções mais simples como espinhas, furúnculos e celulites até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, bacteremias, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (KANAFANI, 2006), sendo que as bacteremias e endocardites são frequentemente associadas a sérias complicações e alta taxa de mortalidade (PETTI, 2003).

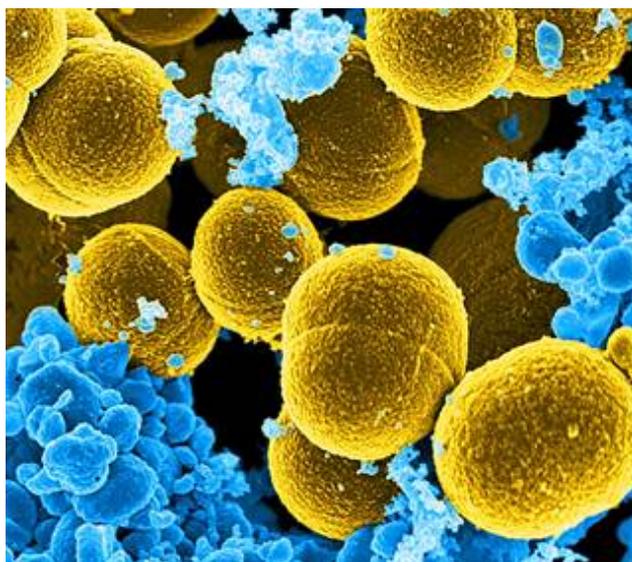


Figura 10. Modelo 3D da Bactéria *Staphylococcus aureus*
Foto: Frank DeLeo.

Além de constituir um imenso problema para as indústrias alimentícias, pela disseminação de patógenos através do alimento, *Staphylococcus spp.* possui a capacidade de formar biofilmes tanto em superfícies biológicas quanto inertes. Esses biofilmes além de apresentarem elevada resistência a antimicrobianos, quando formados em superfícies de instalações ou equipamentos de indústrias alimentícias podem liberar células bacterianas, as

quais podem contaminar o alimento e/ou colonizar uma nova superfície iniciando um novo biofilme, gerando assim, uma nova fonte de contaminação (MATHUR *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As intoxicações humanas são causadas pela ingestão de enterotoxinas estafilocócicas produzidas nos alimentos por *Staphylococcus aureus*, a produção destas ocorre normalmente ou porque o alimento não foi mantido quente (60°C ou mais) ou frio o suficiente (7,2°C ou menos) (HENNEKINNE *et al.*, 2012). Isso porque espécies de estafilococos produzem enterotoxinas termoresistentes às temperaturas entre 10 e 46°C, e conseguem se multiplicar com pH variando entre 4,2 e 9,3 (SANTANA *et al.*, 2010). Dentre as várias toxinas e enzimas produzidas por essa bactéria, três exotoxinas são clinicamente importantes: a enterotoxina, a toxina da síndrome do choque tóxico e a esfoliatina (LEVINSON, 2010; TRABULSI & ALTHERTHUM, 2008).

No Brasil, entre os anos de 2007 a 2017, a vigilância epidemiológica notificou que o *Staphylococcus aureus* foi o segundo agente etiológico mais prevalente nas DTHA, ficando atrás apenas da *Salmonella* spp. Quantos aos alimentos responsáveis pelos surtos alimentares, leite e queijo assumiram a sexta posição (BRASIL, 2017). Bactérias oriundas de alimentos de origem animal demonstram, frequentemente, perfil de resistência e multirresistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento de diversas doenças (RODRIGUEZ & VESGA, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2011), e no caso de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes constituem um problema de ordem mundial, bem como o controle de sua disseminação é um fato preocupante para os profissionais da saúde (BAGGESEN & AARESTRUP, 1998).

2.6 PATÓGENOS FÚNGICOS OPORTUNISTAS

Qualquer infecção fúngica é chamada de micose. Estas por sua vez, podem ser classificadas como sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista, isso vai depender do modo de entrada no hospedeiro e o grau de envolvimento tecidual. As micoses oportunistas são mais frequentemente causadas pelos fungos *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* spp. Na maioria dos casos esses organismos podem ser colonizadores benignos ou saprófitas ambientais, só causando infecções sérias quando há uma diminuição das defesas do hospedeiro, como por exemplo aqueles indivíduos acometidos com a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) ou aqueles que estão sendo submetidos a um tratamento antineoplásico, estes apresentam uma maior probabilidade de desenvolver infecções fúngicas graves (TORTORA *et al.*, 2017).

No mundo, estima-se que cerca de 11,5 milhões de infecções graves e micoses superficiais são decorrentes de fungos patogênicos, causando 1,5 milhão de mortes por ano, mais que o total de óbitos decorrentes da malária e da tuberculose (GIACOMAZZI *et al.*, 2016). No Brasil, de acordo com um estudo realizado por Colombo *et al.* (2013), das quase quatro milhões de infecções fúngicas relatadas, a cada ano, 2,8 milhões são infecções causadas por *Candida* spp. e cerca de um milhão de casos de infecções causadas por *Cryptococcus neoformans*, mais especificamente a meningoencefalite, forma mais grave da doença. Em pacientes com AIDS esta doença é responsável por aproximadamente 625.000 óbitos.

2.6.1 Fungos leveduriformes

2.6.1.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans (Figura 11) é uma levedura encapsulada, pertencente ao Filo Basidiomycota, forma assexuada do também basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*. As diferenças na estrutura dessa cápsula são a base para separação dos isolados de *C. neoformans* em quatro sorotipos e um híbrido. Inicialmente os quatro sorotipos pertenciam a três variedades: variedade *neoformans*, variedade *grubi* e variedade *gattii*, porém este último foi considerado uma espécie distinta de *C. neoformans* (BOEKHOUT *et al.*, 2001). Em termos de distribuição *C. neoformans* é cosmopolita e *C. gattii* têm sido isolado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (JUNIOR *et al.*, 2015).

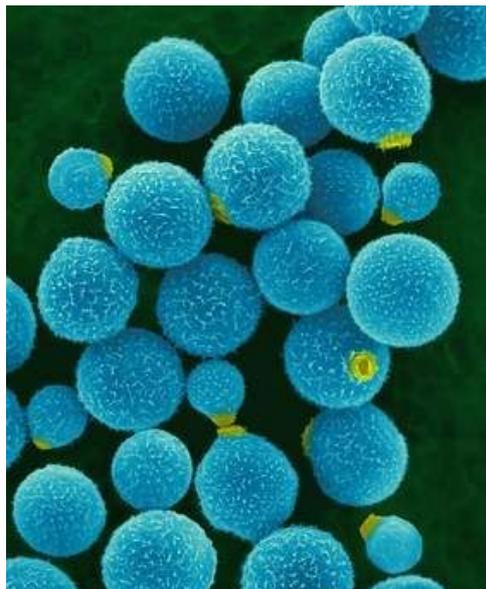


Figura 11. Modelo 3D do Fungo *Cryptococcus neoformans*. Foto: Dennis Kunkel.

Ambas as espécies são responsáveis pela criptococose, sendo que *C. neoformans* manifesta a doença oportunista acometendo hospedeiros imunocomprometidos, ou seja aqueles que tem seu sistema imunológico comprometido, como os portadores da AIDS (JÚNIOR *et al.*, 2006; BACKES *et al.*, 2016), enquanto *C. gattii* manifesta a doença primária em hospedeiros imonocompetentes, ou seja, aqueles sem alterações imunológicas (GULLO, 2016).

Criptococose é uma micose sistêmica, uma vez que a contaminação do paciente se dá por inalação de partículas infectadas, que inicialmente se instalam nos pulmões, causando um processo pneumônico, até se disseminar para outros lugares do corpo podendo evoluir para casos mais sérios como a meningite, meningoencefalite e encefalite (LAZÉRA *et al.*, 2005). Os principais vetores de transmissão são animais infectados, interação com microorganismos, mas principalmente associado às espécies de pombos e suas excretas, e a restos vegetais de eucaliptos. Enquanto *C. neoformans* var. *neoformans* e var. *grubii* são encontrados em todo o mundo em associação com solo contaminado com excretas de aves, *C. gattii* é geralmente encontrado em associação com as espécies de eucaliptos: *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis* (LAZÉRA *et al.*, 2010; TRILLES *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2003).

No Brasil, nas regiões Sul e Sudeste, predomina principalmente a criptococose associada à AIDS, em homens, causada por *C. neoformans* sendo a letalidade de cerca de 35 a 40%, enquanto que casos com *C. gattii* são mais esporádicos. No Rio Grande do Sul, 25% dos casos por *C. gattii* e 45% dos casos por *C. neoformans* causaram o óbito dos respectivos hospedeiros. Em pacientes não aidéticos foram diagnosticados 56 casos adicionais de criptococose no Rio Grande do Sul, 31 por *C. neoformans* nove por *C. gattii* e 16 que não foram caracterizados (LOPES *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado na Cidade de Pelotas, no Rio Grande do Sul, ficou demonstrado que esta Cidade corre risco de uma epidemia de criptococose, uma vez que, por ser uma cidade histórica, oferece *habitat* propícios para que espécimes de pombos, vetores conhecidos de *Cryptococcus neoformans*, se estabeleçam e se multipliquem (FARIA *et al.*, 2010).

2.6.1.2 *Candida albicans*

Candida albicans (Figura 12) é uma levedura, inserida no Filo Ascomycota e à Família Saccharomycetaceae e pertencente ao gênero *Candida*. De acordo com Tortora *et al.*

(2017), a morfologia desses micro-organismos pode variar de uma forma leveduriforme até formações filamentosas, o que pode constituir um fator importante na sua patogenicidade pois assumindo estas formas o fungo ganha a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos.



Figura 12. Modelo 3D do Fungo *Candida albicans*.
gettyimages.com.

O gênero *Candida* spp. engloba os patógenos fúngicos oportunistas mais comuns. São conhecidas cerca de 350 espécies de *Candida* spp., mas as que possuem maior interesse clínico incluem, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosi* e *Candida glabrata* (DALAZEM *et al.*, 2010). Espécies de *Candida* sp. são normalmente encontradas na população adulta saudável, no tubo gastrointestinal, em 20 a 80% dos indivíduos e em cerca de 30% a 35% na microbiota da boca; entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* sp. na vagina (DIGNANI *et al.*, 2003). Estes micro-organismos tornam-se patogênicos apenas quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, ocasionando a candidíase, doença fúngica causada de 85 a 90% pela espécie *Candida albicans*, que se caracteriza como a invasão e multiplicação destes fungos nos tecidos (TORTORA *et al.*, 2017). Esta forma de infecção pode se manifestar desde infecções fúngicas superficiais na pele e mucosas, como a candidíase oral e vaginal, acometendo também indivíduos imunocompetentes (PAPPAS *et al.*, 2016) até infecções sistêmicas, neste caso a incidência está em indivíduos imunodeprimidos, como aqueles acometidos com a AIDS (REX *et al.*, 2000).

Estima-se que quase quatro milhões de pessoas no Brasil adquiram infecções fúngicas a cada ano, e desse total, 2,8 milhões são infecções causadas por *Candida* sp. (COLOMBO *et al.*, 2013). Em se tratando da candidíase vaginal, a microbiota vaginal normal é rica em lactobacilos, responsáveis pela acidez vaginal (pH 4,5) o que dificulta a proliferação da maioria dos patógenos, mas a *Candida* spp. é uma exceção pois se prolifera em ambiente ácido (JAWETZ *et al.*, 1998). Isso somado ao fato de a vagina ser quente e úmida propiciando um “ambiente” adequado para que o patógeno se desenvolva, e havendo qualquer desequilíbrio imunológico, os micro-organismos se multiplicam, alterando a relação de comensalismo que esse fungo tem com o hospedeiro (ÁLVARES *et al.*, 2014). Em pacientes acometidos com a AIDS, a candidíase é uma das infecções mais comuns e importantes, uma vez que é a maior causa de morbidade e mortalidade entre os que possuem essa enfermidade, sendo que a candidíase orofaríngea é a mais frequente (TAPIA *et al.*, 2003), seguida da candidíase oral (MATOS *et al.*, 2009).

2.7 TERAPIA ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos são substâncias que têm a capacidade de inibir o crescimento e/ou matar micro-organismos; podem ser de origem animal, vegetal ou sintética (MELO *et al.*, 2010). O principal objetivo de um antimicrobiano é o de prevenir ou tratar uma infecção sem que afete a microbiota e as células normais do corpo. Desenvolver um fármaco efetivo contra células procarióticas, ou seja, contra bactérias, sem que afete as células eucarióticas dos seres humanos é comparativamente mais fácil, do que desenvolver um fármaco contra patógenos com células eucarióticas, como é o caso dos fungos. Esse fato é explicado por que em nível celular, esses organismos se assemelham às células humanas muito mais intimamente do que as células bacterianas (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os antimicrobianos são caracterizados de acordo com a sua capacidade de afetar diferentes tipos microbianos. Eles podem ter um espectro restrito de atividade microbiana ou um amplo espectro. O primeiro afeta bactérias Gram-positivas e poucas Gram-negativas, enquanto o segundo afeta uma grande variedade de bactérias Gram-negativas. Em geral, os antimicrobianos apresentam problemas de penetração nas bactérias Gram-negativas, isso por que essas bactérias além de apresentarem membrana citoplasmática como nas Gram-positivas, possuem também de fora para dentro, uma membrana externa cuja complexidade dessa membrana dificulta a penetração de antibióticos (LEVINSON, 2005).

Exemplo de antimicrobianos disponíveis no mercado são: (i) cloranfenicol, um potente inibidor da síntese de proteínas em bactérias e em menor grau, em células eucarióticas (RUIZ & RAMIREZ, 1990); (ii) gentamicina, ativa contra bactérias Gram-negativas aeróbias e alguns estafilococos (TRABULSI, 2008); (iii) tetraciclina, constituem um amplo grupo de antibióticos de largo espectro que em geral inibe tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (JAWETZ, 2005); (iv) sulfazotrim, junção entre sulfametoxazol e trimetoprima, agem sinergicamente (TRABULSI, 2008); (v) ciprofloxacina, constitui a mais potente quinolona contra micro-organismos Gram-negativos, sendo altamente ativa contra as enterobactérias (TRABULSI, 2008); (vi) itraconazol, apresenta um amplo espectro de ação antimicótica, uma vez que baseia-se na capacidade de inibir a síntese do ergosterol, um componente vital da membrana da célula dos fungos (PITISUTTITHUM, 2005).

De acordo com Levy (1998), os micro-organismos possuem a capacidade natural de criar resistência antibiótica, uma vez que, quando um antibiótico é usado, as bactérias sensíveis são mortas ou inibidas, e isso resulta em uma pressão seletiva para a sobrevivência de bactérias resistentes. Porém, este mesmo autor ressalta que o uso indiscriminado de antibióticos na medicina ou na agricultura como suplementos de rações animais, tanto como substâncias promotoras de crescimento, quanto como aditivos profiláticos para impedir a ocorrência de doenças tem levado ao surgimento de micro-organismos patogênicos resistentes.

A resistência aos antimicrobianos também pode ser adquirida como resultado de mutações que podem ocorrer durante a replicação celular ou serem induzidas por intermédio de agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAPTISTA, 2013). Pode também ser adquirida pela aquisição de material genético exógeno anteriormente presente em outros micro-organismos que contenham genes de resistência que são propagados por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal (TAVARES, 2000; COSTA, 2016) ou ser uma característica intrínseca de certas espécies de bactérias que podem resistir à ação de um dado antibacteriano como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR *et al.*, 2015). Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos incluem: (i) inativação enzimática do antibiótico, (ii) modificação do alvo do antibiótico, (iii) bombas de efluxo, (v) alteração da permeabilidade da membrana e (vi) formação de biofilme. Estes mecanismos estão ilustrados na Figura 13.

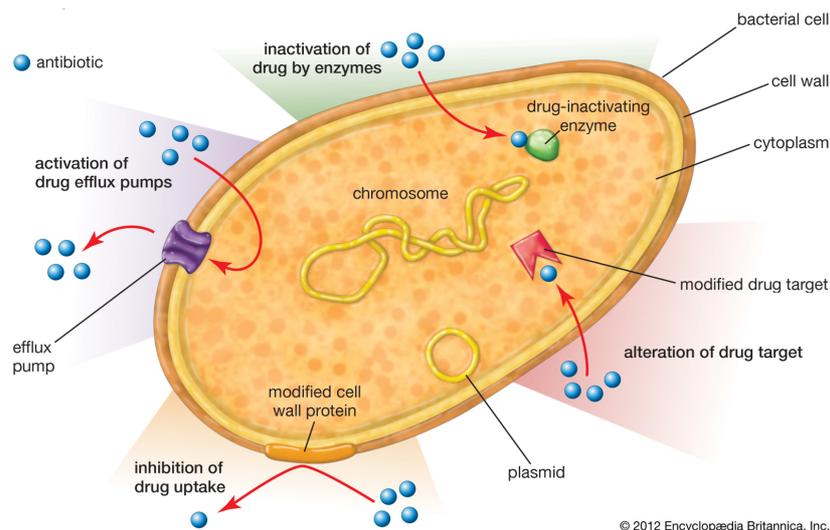


Figura 13. Representação dos diversos tipos de mecanismos de resistência bacteriana (COSTA, 2017).

Madigan *et al.* (2016) destacaram que, em escala mundial, cerca de 50% de todos os antibióticos produzidos são utilizados com finalidades agropecuárias e que em apenas 20% dos casos o uso de antibióticos em indivíduos que procuram tratamento em decorrência de doenças infecciosas são justificados. No entanto, são prescritos antibióticos em 80% dos casos, além disso, em 50% dos casos ou as doses prescritas estão incorretas ou a duração do tratamento se mostra inadequada. A soma do uso indiscriminado de antibióticos com a exposição de patógenos virulentos às doses subletais de antibióticos por períodos de tempo inadequados, resulta na seleção de linhagens resistentes aos fármacos. Desta forma, a descoberta e o uso clínico/veterinário de vários antibióticos conhecidos foram concomitantes à emergência de bactérias a eles resistentes.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2017 sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos – um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana. A lista da OMS é dividida em três categorias de acordo com a urgência em que se necessitam de novos antibióticos: prioridade crítica, alta ou média. Os micro-organismos considerados prioridade crítica incluem bactérias multirresistentes do Filo Proteobacteria, Família Enterobacteriaceae, (gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia* e *Proteus*) essas bactérias tornaram-se resistentes a um grande número de antibióticos, incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração – os melhores antibióticos disponíveis para tratamento de bactérias multirresistentes; os patógenos considerados de prioridade alta e média incluem, dentre outros, os gêneros *Staphylococcus* e *Salmonella* (OMS, 2017).

As principais drogas utilizadas no tratamento de infecções fúngicas incluem os (i) azólicos, como por exemplo itraconazol, fluconazol, cetoconazol, a anfotericina B e a (ii) flucitosina. Justamente pelas poucas opções de tratamento, vem crescendo a resistência fúngica a estes fármacos. Os fungos podem ser naturalmente resistentes a determinadas drogas fúngicas (resistência primária) ou podem desenvolver resistência à droga durante o tratamento (resistência secundária) (PEREA & PATTERSON, 2002; PERFECT & COX, 1999). A resistência à anfotericina B em infecções por *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp. pode ser desenvolvida em pacientes previamente tratados com azólicos, provavelmente por conta de uma alteração nos componentes da membrana do fungo, como o ergosterol que é o alvo deste antifúngico (GHANNOUM & RICE 1999; PEREA & PATTERSON, 2002). A resistência primária à anfotericina B e à flucitosina é vista para *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* spp., sendo que para flucitosina estes micro-organismos também podem apresentar resistência secundária (GHANNOUM & RICE, 1999; PEREA & PATTERSON, 2002; WHITE *et al.*, 1998).

2.8 MÉTODO DE AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

Os testes de avaliação antimicrobiana realizados no Brasil, adotam as normas padronizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Dentre os métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais, os mais utilizados são: (i) disco de difusão em ágar (ou placas), (ii) turbimétrico (em tubos) ou o (iii) método de microdiluição em caldo; este último além de possibilitar a utilização de mais de uma substância-teste, utiliza-se também diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio. Outra vantagem é o fato de o ensaio ser realizado em microplacas, exige pequenos volumes de amostras e reagentes, fato extremamente vantajoso quando se trabalha com produtos naturais, que na grande maioria das vezes são obtidos em pequenas quantidades (CLSI, 2015).

Com a utilização das técnicas supracitadas é possível avaliar o padrão de resposta do micro-organismo (padrão de suscetibilidade) frente às concentrações pré-estabelecidas de antimicrobianos, podendo assim inferir a sensibilidade e a resistência dos patógenos a determinados antimicrobianos (TURNIDGE *et al.*, 2006). Com o método quantitativo de microdiluição em caldo, a atividade antimicrobiana de extratos vegetais é determinada a partir da concentração inibitória mínima – CIM. Este teste consiste na concentração mínima necessária para impedir o crescimento de uma bactéria (ação bacteriostática) e a concentração bactericida mínima – CBM ou fungicida mínima CFM, necessária para que resulte na morte microbiana (SALIE *et al.*, 1996; NEWTON *et al.*, 2000).

Outro aspecto relevante na determinação de um composto biologicamente ativo está no tipo de solvente utilizado no processo de extração, uma vez que para a extração de compostos hidrofílicos, são utilizados solventes polares, tais como etanol e metanol, para compostos lipofílicos são utilizados solventes diversos, como, por exemplo, o diclorometano (SASIDHARAN *et al.*, 2011). Para um solvente ser considerado bom, além de não interferir nos testes biológicos, este deve possuir certas propriedades, tais como: (i) baixa toxicidade, (ii) facilidade de evaporação a baixas temperaturas, (iii) absorção fisiológica rápida do extrato, (v) ação conservante e (vi) incapacidade de fazer com que o extrato se dissocie ou torne um complexo (DAS *et al.*, 2010). De maneira concomitante, para garantir autenticidade e confiabilidade dos experimentos é necessário utilizar culturas microbianas de coleções de referência, como por exemplo as coleções *American Type Culture Collection - USA (ATCC)*, a *National Culture Type Collection – Inglaterra (NCTC)*, a *Coleção de Culturas Oswaldo Cruz/Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Rio de Janeiro (IOC/INCQS)*, dentre outras (BRASIL, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras teciduais de *O. rigida* foram coletadas no Município de Osório, Rio Grande do Sul (RS), na Área de Proteção Ambiental Morro de Osório (APA Morro de Osório), Sítio Cascata da Borrúsia, no limite sul do Domínio Mata Atlântica. Após as coletas, a identificação da espécie foi realizada no Laboratório de Biologia e Conservação da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – Litoral Norte (LABeC), com auxílio de microscópio óptico, estereomicroscópio e literatura especializada (Figura 14).

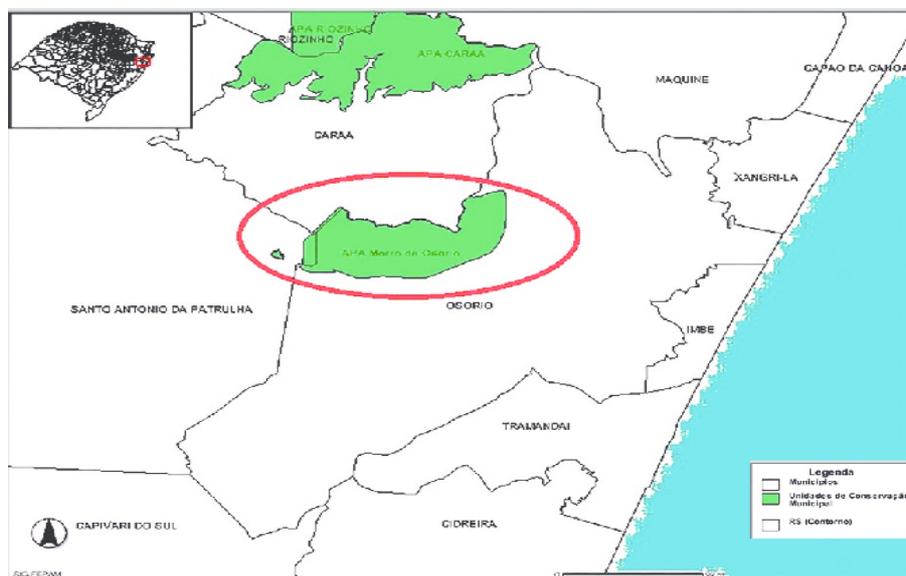


Figura 14. Área de Proteção Ambiental Morro de Osório (APA) onde foram realizadas as coletas do material vegetal. Fonte: (CHILANTI & BORDIN, 2016).

Foram realizadas quatro coletas, uma para cada estação do ano, no período de outubro de 2017 a julho de 2018. Sempre no meio de cada estação do ano, ou seja, nos meses de outubro, janeiro, abril e julho; no período da tarde. Foram coletadas aproximadamente 100 g de cada vegetal *in natura*, acondicionados em sacos de papel devidamente identificados. Um *voucher* foi depositado no Herbário Dr. Ronaldo Wasum da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – Litoral Norte (HERW), sob o número HERW 1930.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos etanólicos foram obtidos por maceração estática a frio. Como líquido extrator foi utilizado álcool etílico a 96°GL. O material vegetal (100 g) foi lavado em água abundante oriunda da rede de fornecimento municipal e, posteriormente, em água destilada; quando então foi posto para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, o material

vegetal foi solubilizado com o solvente etanólico, acondicionado em potes de vidro e mantido em temperatura ambiente por um período de sete dias. Após o período de extração, foi realizada a filtração em papel filtro e posterior remoção do solvente com o auxílio de um rotaevaporador rotatório, em banho termostatzado em temperatura constante a 50° C. Posteriormente, o extrato foi colocado no liofilizador para remoção completa de água ou resíduos do solvente (Figura 15).



Figura 15. Processo de extração para obtenção do extrato vegetal seco bruto.
Foto: Autora.

3.2.1 Diluição dos extratos

As diluições dos extratos foram feitas conforme adaptação da metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Obtido o extrato etanólico seco bruto, foi aferida a massa de 200 mg de extrato, sendo então avolumado em 5 ml do diluente Tween80® 1%, obtendo-se assim uma concentração final de 40 mg/ml de extrato. Na primeira coluna da placa de 96 poços foram colocados 50 µL de extrato, homogeneizado 50 µL de meio de cultura e, por fim, 50 µL do inócuo resultando em uma concentração inicial de 10.000 µg/mL. Desta maneira, a diluição seriada variou entre 10.000 e 19,5 µg/mL para os extratos de cada estação do ano (Figura 16).

Diluições	Concentrações de extrato / $\mu\text{g/mL}$
1	10.000
2	5.000
3	2.500
4	1.250
5	625
6	312,50
7	156,24
8	78,13
9	39,06
10	19,53

Figura 16. Diluições seriadas.

3.3 MICRO-ORGANISMOS

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram testadas cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 35150) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), das gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19615), bem como dos fungos leveduriformes *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045), cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da UNIANÁLISES/ Universidade do Vale do Taquari-RS.

3.3.1 Estocagem e manutenção da cepas microbianas

As cepas bacterianas e fúngicas, foram mantidas em *skin milk* 10% de glicerol a -6°C . Para uso, as cepas bacterianas foram repicadas em AMH (ágar Mueller-Hinton) e incubadas por 24 h a 37°C . Enquanto que as cepas fúngicas foram repicadas em ASB (ágar Sabouraud) e incubadas a 27°C , por 48h.

3.3.2 Substância empregada como padrão antimicrobiano

Os antibióticos utilizados para verificação da atividade antimicrobiana foram padronizados de acordo com as recomendações descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para isso foram utilizados Ciprofloxacino[®] 60 $\mu\text{g/mL}$ para bactérias e Itraconazol[®] 32 $\mu\text{g/mL}$ para fungos.

3.3.3 Padronização da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em solução salina estéril a 0,85% até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml). Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 625 nm para a confirmação da concentração bacteriana (CLSI, 2015). Imediatamente após, foi retirado 100 ml do inóculo padronizado e transferido para tubo de ensaio contendo 4,9 ml do Caldo Mueller-Hinton (CMH), obtendo-se assim a solução de inóculo 2×10^6 UFC/ml. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:50, seguida de outra diluição de 1:10 (1 ml desta solução e transferido para um novo tubo de ensaio, este contendo 9 ml do mesmo caldo utilizado anteriormente). Assim, o inóculo ficou em uma concentração de 1 a 5×10^5 UFC/ml (CLSI, 2015).

3.3.4 Padronização da suspensão fúngica

As suspensões fúngicas foram padronizadas a partir de uma cultura de 48 h, em solução salina estéril a 0,85% até atingir turvação (aproximadamente 1 a 5×10^6 UFC/mL). Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 530 nm para confirmação da concentração dos fungos. Posteriormente, a suspensão fúngica foi diluída de 1:20, seguida de outra diluição de 1:50, em CBS (Caldo Sabouraud) obtendo-se uma suspensão de 1 a 5×10^3 UFC/mL, para utilização nos ensaios (CLSI, 2015).

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM e CBM (Figura 16) foi realizada segundo a metodologia de diluição em caldo (microdiluição) de Salie *et al.* (1996) e Newton *et al.* (2000), utilizando-se placas de acrílico com 96 poços. Em cada placa foram aplicados os extratos em triplicata, o antimicrobiano e o diluente Tween[®]. Também foram acrescentados controles negativos (meio sem adição de inóculo) e controles positivos (meio com adição de inóculo e sem a presença do antimicrobiano). Vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicata para todas as amostras vegetais e para todos os micro-organismos, ou seja, para cada amostra de material vegetal e para cada micro-organismo foram repetidas as análises de MIC e CBM/CFM três vezes ou mais, até que se obtivesse uma concentração absoluta repetida ao menos um vez, para só assim validar os resultados encontrados.

Após a inoculação, as placas foram incubadas. Transcorrido o tempo de incubação (27° C por 48h para fungos e 37° C por 24h para bactérias), realizou-se a leitura das mesmas.

A confirmação de crescimentos nos poços foi realizada por meio da aplicação da solução aquosa estéril de Resazurina[®] 0,02%. Essa solução apresenta uma alteração de coloração original a partir do crescimento microbiano, momento em que apresenta o desenvolvimento de uma coloração rosa, pois forma um complexo rosa com a enzima da respiração celular dos organismos vivos; nos poços onde ocorrer crescimento bacteriano haverá o desenvolvimento dessa cor. Onde não ocorre o crescimento microbiano se desenvolve uma coloração azul (SALIE *et al.*, 1996; NEWTON *et al.*, 2000).

3.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (Figura 16) dos extratos etanólicos, foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cultura AMH (ágar Mueller-Hinton). Foram realizadas sementeiras de todos os poços onde o extrato estava límpido, para que se possa afirmar a ação do extrato. Essas placas foram incubadas a aproximadamente 37° C por 24h. Vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicada para todas as amostras vegetais e para todos os micro-organismos. Para interpretação dos resultados foram considerados os seguintes critérios: crescimento dos micro-organismos no meio de cultura significou ação bacteriostática; ausência de crescimento de micro-organismos no meio de cultura significou ação bactericida (SALIE *et al.*, 1996; NEWTON *et al.*, 2000).

3.4.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a incubação das microplacas, foram realizadas as determinações da CFM. Com auxílio de hastes estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi repicada em placa de Ágar Sabouraud dextrose (ASD). As placas foram incubadas a 27° C por 48h. E então foram utilizados os mesmos critérios para o CBM (SALIE *et al.*, 1996; NEWTON *et al.*, 2000). (Figura 17).

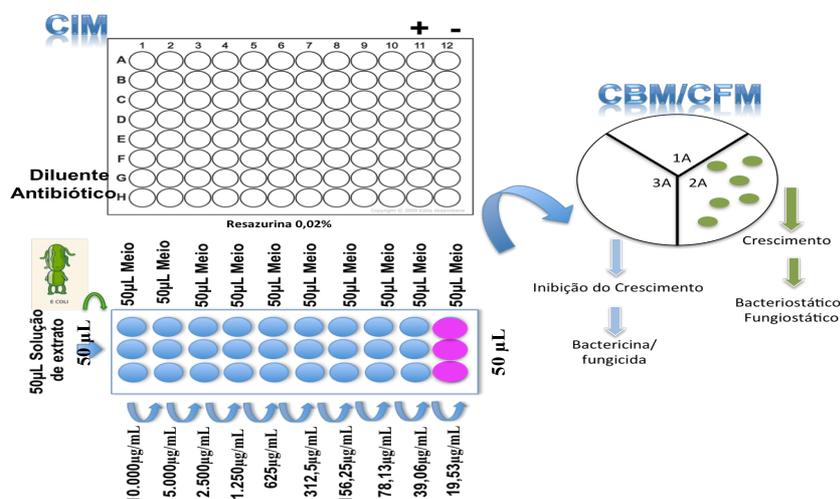


Figura 17. Representação da determinação da CIM e CBM/CFM segundo a metodologia de microdiluição em caldo utilizando placas de acrílico com 96 poços. Autora.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para determinar se a época de coleta influenciou significativamente os resultados, por condição dos métodos estatísticos existentes, foram calculadas médias dos valores absolutos obtidos de CIM e CBM/CFM e submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de homogeneidade de Levene. E quando necessário aplicou-se uma transformação (LOG) de dados para o atendimento dos pressupostos estatísticos de normalidade e homocedasticidade. Posteriormente, os dados foram submetidos a uma análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), e quando significativo as médias foram comparadas através do teste de Tukey e Bonferroni, com 5% de significância. As análises e confecção de gráficos foram realizadas com auxílio dos softwares estatísticos *Statistical Analysis System – SAS 9.4*[®] e *GraphPad Prism 7.0*[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o potencial antimicrobiano de quatro amostras vegetais da espécie de musgo *Orthostichella rigida*, as quais foram coletadas em diferentes épocas do ano e que foram submetidas ao processo de extração se utilizando como solvente álcool etílico, resultando assim, em um extrato etanólico. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *O. rigida* foi realizada contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Os controles negativos e de crescimento, assim como o controle positivo e de esterilidade do meio de cultura responderam aos resultados esperados, não havendo atividade para os dois controles citados primeiramente e com atividade antimicrobiana para o controle positivo e comprovada a esterilidade do meio de cultura. Estes resultados bem como a avaliação do CIM estão representados na (Figura 18).

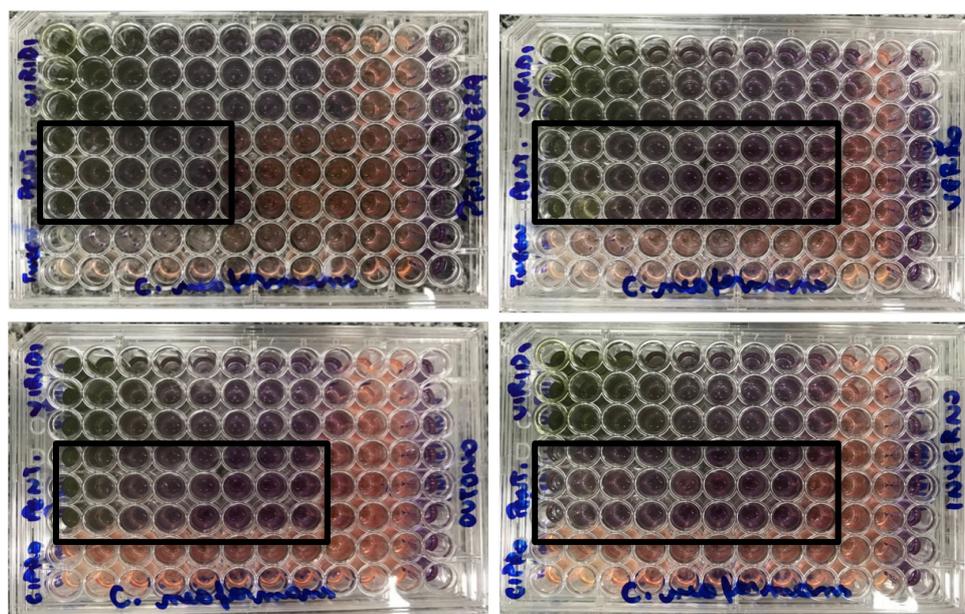


Figura 18. Determinação da CIM pelo método de microdiluição em placas de 96 poços utilizado o extrato etanólico de *Orthostichella rigida* frente à *Cryptococcus neoformans* nas diferentes estações do ano. Nos poços com coloração rósea, o extrato não inibiu o crescimento microbiano. Nos poços delimitados pelos retângulos pretos houve inibição microbiana (ação bacteriostática).

Nos poços em que houve a ação bacteriostática, ou seja, houve inibição do crescimento dos micro-organismos, realizou-se o teste de Concentração Bactericida/Fungicida Mínima. Em placas com meio de cultura adequado foi adicionado, utilizando-se alças estéreis, uma alíquota do extrato de cada poço onde se testou a ação bacteriostática. Foi considerado que, se houve crescimento do micro-organismo na placa com meio de cultura, o extrato possuiria apenas ação bacteriostática/fungiostática e naquelas em que não houve crescimento microbiano o extrato teria ação bactericida/fungicida (Figura 19).

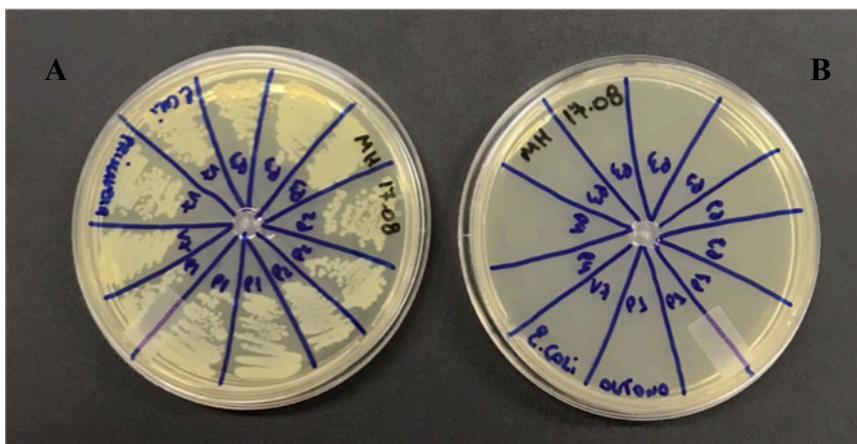


Figura 19. Determinação da CBM utilizando-se os extratos de *Orthostichella rigida* frente à *Echerichia coli*. Em A não houve a morte microbiana, logo ocorreu a ação bacteriostática; em B houve a morte microbiana, logo ocorreu a ação bactericida.

4.1 CRITÉRIOS PARA ACEITAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

Os resultados mostraram que todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente aos isolados, em variadas magnitudes. Os valores de CIM e CBM/CFM dos extratos etanólicos de *O. rigida* contra *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. albicans* e *C. neoformans* estão apresentados nas (Tabelas 1 e 2), respectivamente. Apesar de ter sido estabelecido uma diluição seriada no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 10.000 µg/mL a 19,53 µg/mL de extrato, considerou-se como válidos apenas valores menores que 1.000 µg/mL, de acordo com a literatura consultada, a qual estabelece critérios para a aceitação da atividade antimicrobiana dos extratos, como está compilado na (Tabela 3).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos de *Orthostichella rigida*.

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Bactérias Gram-negativas		Bactérias Gram-positivas		Fungos	
	CIM		CIM		CIM	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
Primavera	-	-	78,13	156,25	-	625
Verão	156,25	78,13	19,53	19,53	156,25	39,06
Outono	312,50	312,50	19,53	19,53	312,50	78,13
Inverno	156,25	156,25	39,06	19,53	156,25	39,06

(-) Valores > 1.000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) dos extratos etanólicos de *Orthostichella rigida*.

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)	Bactérias Gram-negativas		Bactérias Gram-positivas		Fungos	
	CBM		CBM		CFM	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
Primavera	-	-	156,25	312,50	-	625
Verão	156,25	78,13	78,13	39,06	156,25	39,06
Outono	312,50	312,50	78,13	19,53	625	78,13
Inverno	156,25	156,25	78,13	78,13	312,50	39,06

(-)Valores > 1.000 $\mu\text{g/mL}$.

Dados da literatura sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais, avaliada frente a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, mostram o grande potencial das plantas para o tratamento terapêutico (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Ainda de acordo com a bibliografia disponível, não existe um consenso sobre o nível aceitável para os valores de CIM de extratos ou frações de materiais vegetais. Como este trabalho se propôs a trabalhar com extrato bruto de *O. rigida*, optou-se por comparar os resultados com quatro critérios distintos sugeridos por Holetz *et al.* (2002); Aligiannis *et al.* (2001); Webster *et al.* (2008) e Lambert *et al.* (2011), como mostrado na (Tabela 3). Para Holetz *et al.* (2002), extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 500 $\mu\text{g/mL}$ possuem fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas, enquanto que para Aligiannis *et al.* (2001) e para Lambert *et al.* (2011) concentrações acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ surtem este mesmo efeito. De outra maneira, Webster *et al.* (2008) consideraram que quaisquer concentrações menores de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas satisfatórias.

Tabela 3. Critérios (adaptados) para aceitação da atividade antimicrobiana de extratos brutos (Holetz *et al.*, 2002; Aligiannis *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2011). Sendo que (-) significa ausência de classificação.

CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Holetz (2002)	Aligiannis (2001)	Webster (2008)	Lambert (2011)
≤ 10	-	-	-	Excelente
Abaixo de 100	Boa	Potente	-	Boa
Entre 100 e 500	Moderada	Potente	-	Moderada
Entre 500 e 1000	Fraca	Moderada	-	Fraca
≤ 1000	-	-	Satisfatório	-
≥ 1000	Inativa	Fraca	-	Inativa

Ao se analisar os resultados dos CIM (Tabela 1), observando-se o comportamento de cada micro-organismo frente aos distintos extratos etanólicos obtidos em diferentes épocas do ano/estações meteorológicas, obteve-se para as bactérias Gram-negativas, tanto para *E. coli* quanto para *L. monocytogenes*, os melhores resultados no verão e no inverno, CIM igual a 156,25 $\mu\text{g/mL}$ para a *E. coli* em ambas as estações, e, um CIM de 156,25 $\mu\text{g/mL}$ e 78,13 $\mu\text{g/mL}$ para *L. monocytogenes* para o inverno e verão, respectivamente (Gráfico 1). Esses valores, de acordo com os critérios estabelecidos na (Tabela 3), se enquadram na classificação de Holetz *et al.* (2002) e Lambert *et al.* (2011), como uma atividade antimicrobiana moderada para valores de CIM iguais a 156,25 $\mu\text{g/mL}$ e como atividade antimicrobiana boa para CIM de 78,13 $\mu\text{g/mL}$. De forma contrastante, para a classificação de Aligiannis *et al.* (2001) os valores de CIM abaixo de 500 $\mu\text{g/mL}$ são definidos como com atividade antimicrobiana potente, como foi o caso do presente ensaio (156,25 e 78,13 $\mu\text{g/mL}$).

O extrato etanólico obtido no outono, para ambas as espécies, resultou em um CIM igual a 312,50 $\mu\text{g/mL}$, sendo também considerado com atividade antimicrobiana de moderada a potente, seguindo-se os mesmos critérios (Holetz *et al.*, 2002; Aligiannis *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2011). A amostra da primavera não atingiu o esperado, resultando em um CIM maior que 1.000 $\mu\text{g/mL}$, desta maneira de acordo com os critérios estabelecidos pela literatura (Tabela 3), o extrato etanólico de *O rigida* na primavera, para ambas as espécies de bactérias Gram-negativas, possui uma atividade antibacteriana fraca segundo Aligiannis *et al.* (2001) e inativa para os demais autores (Holetz *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2011).

Ao se analisar os valores obtidos da CBM (Concentração Bactericida Mínima), observaram-se resultados semelhantes aos da CIM (Gráfico 1). Sendo assim, pode-se inferir que para *E. coli* o extrato de *O. rigida* mais efetivo foi o do inverno e verão, possuindo assim ação bactericida em concentrações de 156,25 µg/mL e, para *S. enteritidis*, o do verão, com 78,13 µg/mL, possuindo assim também ação bactericida para essa concentração.

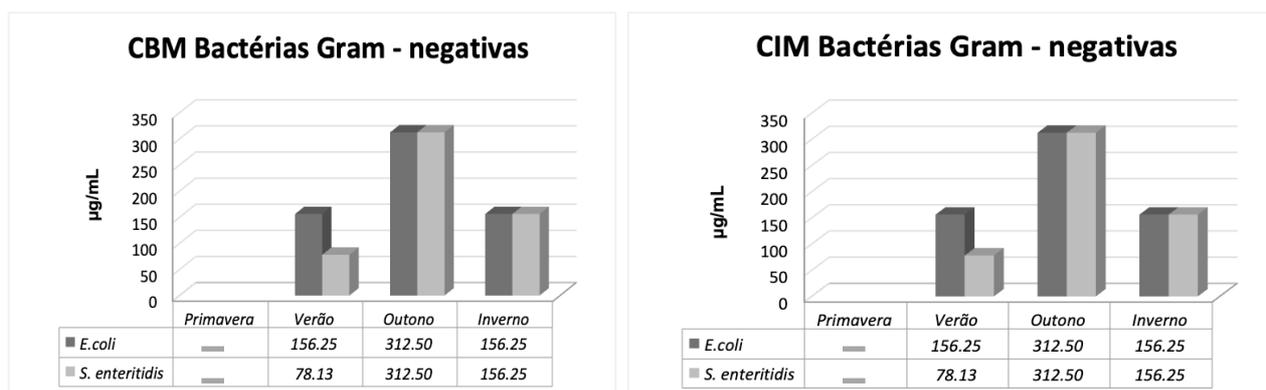


Gráfico 1. CIM e CBM das bactérias Gram-negativas de acordo com as diferentes estações do ano. Quanto menor o valor do CIM/CBM mais potente o extrato. (-)Valores > 1.000 µg/mL.

Para bactérias Gram-positivas os valores de CIM apresentaram as menores concentrações quando comparados aos outros micro-organismos testados. Como exemplificado na (Tabela 1), excetuando-se a amostra da primavera de *L. monocytogenes* que resultou em um CIM de 156,25 µg/mL, todos os outros resultados se enquadram, de acordo com os critérios estabelecidos na (Tabela 3), como ação antimicrobiana boa ou potente, uma vez que seus valores são menores que 100 µg/mL. No caso das bactérias Gram-positivas, todos os extratos obtidos em diferentes épocas do ano resultaram em concentrações baixas de CIM, porém é possível se observar no (Gráfico 2) que as menores concentrações foram obtidas nos meses de verão e outono para *S. aureus*; verão, outono e inverno para *L. monocytogenes*, e, no mês de primavera, ocorreram as maiores concentrações para ambas as espécies, resultado semelhante ao ocorrido para as bactérias Gram-negativas (Gráfico 1).

Observando-se os resultados do CBM, vê-se que, exceto para *L. monocytogenes*, na coleta de outubro em que o resultado da CIM se repetiu, para os outros períodos de coletas os resultados da CBM para ambas as bactérias foram maiores que os resultados da CIM (Gráfico 2). É possível se inferir que para *S. aureus* os extratos do verão e outono foram os que resultaram em menores concentrações de CIM, logo possuem ação bacteriostática em concentrações de 19,53 µg/mL enquanto que para *L. monocytogenes* a ação bacteriostática

com essa concentração é vista também para o extrato de inverno, além dos extratos citados. Por sua vez, para os resultados de CBM as menores concentrações obtidas foram as do outono para *L. monocytogenes*, em que a ação bactericida ocorreu em concentrações de 19,53 µg/mL e, para *S. aureus*, a ação bactericida ocorreu em concentrações de 78,13 µg/mL, resultado este que se repetiu para os meses de verão, outono e inverno (Gráfico 2).

Observando-se os resultados obtidos para os fungos, mostrados na (Tabela 1), observa-se que tanto para *C. albicans* quanto para *C. neoformans* as menores concentrações

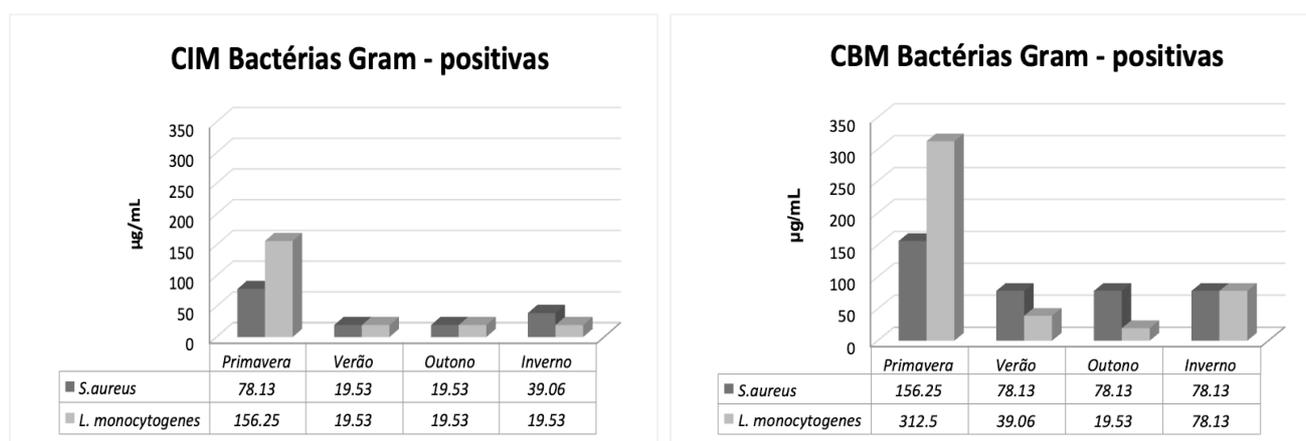


Gráfico 2. CIM e CBM das bactérias Gram-positivas de acordo com as diferentes épocas do ano. Quanto menor o valor do CIM/CBM mais potente o extrato.

foram as do verão e inverno, com 156,50 µg/mL e 39,06 µg/mL, respectivamente. Segundo os critérios estabelecidos na (Tabela 3), esses valores se enquadram para antifúngicos de moderados a potentes (156,50 µg/mL), enquanto que para a concentração de 39,06 µg/mL como bom ou potente. Desta maneira, o que vinha ocorrendo com os outros micro-organismos se repetiu, os menores resultados de CIM, ou seja, as menores concentrações de extrato se mantiveram nas coletas de verão e inverno, como pode ser observado no (Gráfico 3).

Analisando-se os resultados da CFM, constatou-se que para *C. neoformans* os resultados da CIM se repetiram, enquanto que para *C. albicans*, excetuando a coleta de verão, os valores de CFM foram maiores que de CIM. Sendo assim, pode-se afirmar que para *C. albicans* o extrato do verão de *O. rigida* é bactericida em concentrações de 156,50 µg/mL, enquanto que para *C. neoformans* a ação bactericida ocorre em concentrações de 39,06 µg/mL (Gráfico 3).

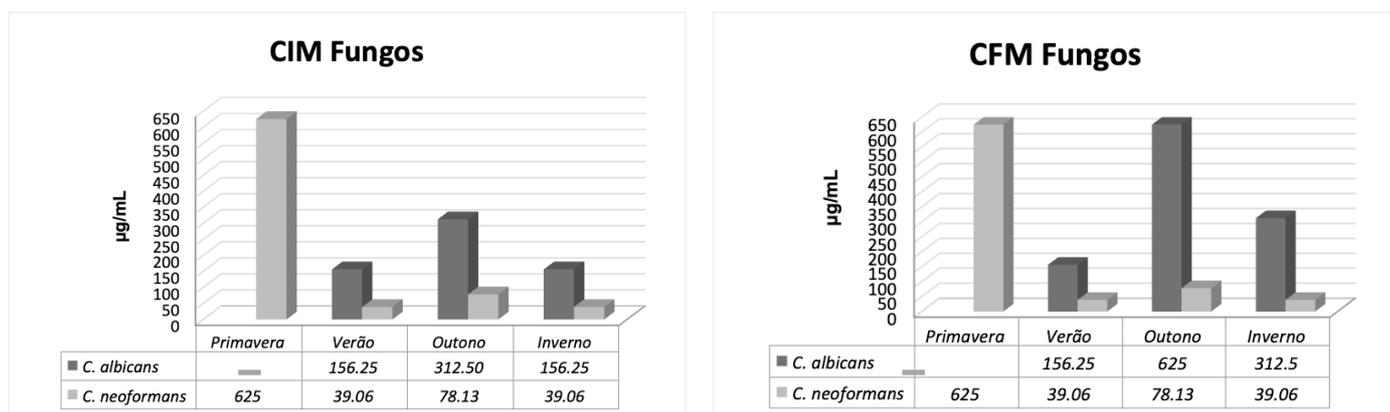


Gráfico 3. CIM e CFM dos fungos de acordo com as diferentes épocas do ano. Quanto menor o valor do CIM/CFM mais potente o extrato. (-)Valores > 1.000 µg/mL.

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir quais micro-organismos obtiveram os menores valores de CIM e CBM/CFM. Quanto aos valores de CIM, na coleta da primavera, o micro-organismo que foi mais sensível ao extrato de *O. rigida* foi o *S. aureus*, uma vez que se obteve a menor ação bacteriostática (CIM = 78,13 µg/mL); na coleta do verão os micro-organismos mais sensíveis foram *S. aureus* e *L. monocytogenes* (CIM = 19,53 µg/mL), seguidos de *C. neoformans* com ação bacteriostática comprovada para uma CIM igual a 39,06 µg/mL e *S. enteritidis* com ação a CIM igual a 78,13 µg/mL; para a coleta de outono os mais sensíveis foram *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *C. neoformans* com a ação bacteriostática comprovada com uma CIM igual 19,53 µg/mL para os dois primeiros e 78,13 µg/mL para o último micro-organismo; por fim para a coleta de inverno os micro-organismos apresentaram uma ação bacteriostática diferente (CIM – 39,06 µg/mL para *S. aureus*; 19,53 µg/mL para *L. monocytogenes*; e 39,06 µg/mL para *C. neoformans*) (Gráfico 4).

Vale ressaltar que, de acordo com os critérios estabelecidos na (Tabela 3), os valores de CIM enquadram o extrato de *O. rigida* como bom ou potente frente aos micro-organismos supracitados. É de se esperar que os menores valores de CBM fiquem por conta dos mesmos micro-organismos, uma vez que este teste é dependente dos resultados de CIM, porém observou-se que, para *C. neoformans*, os valores de CFM permaneceram os mesmos que os valores de CIM (39,06µg/mL para verão e inverno; e 78,13µg/mL para outono), bem como para *L. monocytogenes* (19,53µg/mL para a coleta de outono); esse padrão também é visto em *S. enteritidis*, que repetiu todos os valores de CIM (78,13 µg/mL para o verão, 312,50 µg/mL para o outono e 156,25 µg/mL para o inverno). *S. aureus* foi o único dentre os micro-

organismos acima citados que teve um aumento da CBM em relação à CIM em todas as estações.

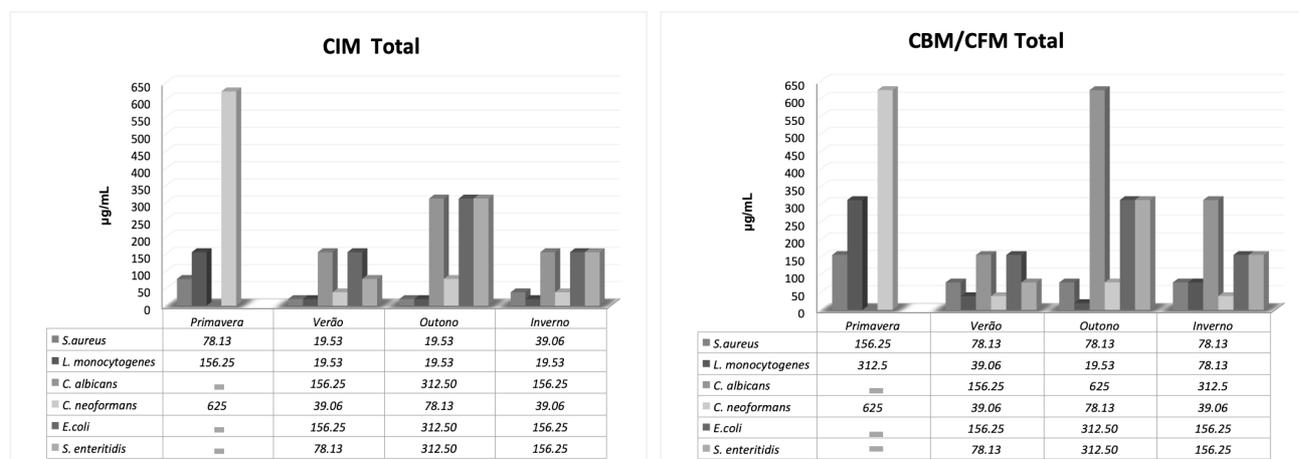


Gráfico 4. Relação da atividade bacteriostática/fungistática e bactericida/fungicida dos micro-organismos frente às diferentes épocas de coleta.

De uma maneira geral, os extratos do verão e inverno apresentaram os menores valores absolutos de CIM e CBM/CFM para todos os micro-organismos testados. Porém, ao realizar-se a análise estatística, em que foram utilizadas as médias das triplicatas, obteve-se que, para os resultados obtidos com o teste de CIM (Tabela 4), a influência das estações apenas é evidente na primavera, a qual diferiu significativamente das outras estações ($P < 0,05$), por apresentar um CIM maior para *C. albicans* quando comparado ao verão, outono e inverno (Gráfico 6). Sendo assim, as melhores épocas para se coletar material vegetal de *O. rigida* seriam verão, outono e inverno, uma vez que não houve diferença significativa entre os resultados de CIM ($p > 0,05$). Observou-se também que apenas obteve-se diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os valores de CIM para cada micro-organismo apenas no período da primavera, em que os valores de *Candida albicans* foram significativamente maiores do que os observados para os outros micro-organismos (Gráfico 5).

Tabela 4. Médias das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) obtidas a partir do teste de CIM, CBM/CFM

Estação	Micro-organismos					
	Gram-negativas		Gram-positivas		Fungos	
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
Primavera	208,30±360,80B	0,00±0,00B*	104,17±45,11B	130,21±45,11B	6250,00±2500,00Aa	520,83±180,42B
Verão	156,30±0,00*	78,13±0,00*	16,27±5,64	21,97±12,29	130,21±45,11b	39,06±0,00*
Outono	312,50±0,00*	312,50±0,00*	26,04±11,28	19,53±0,00*	253,91±117,19b	78,13±0,00*
Inverno	156,30±0,00*	156,30±0,00*	32,55±11,28	19,53±0,00*	208,33±90,21b	52,08±22,55

*Valores de média idênticos aos absolutos. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os micro-organismos dentro de cada estação do ano pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as estações do ano pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

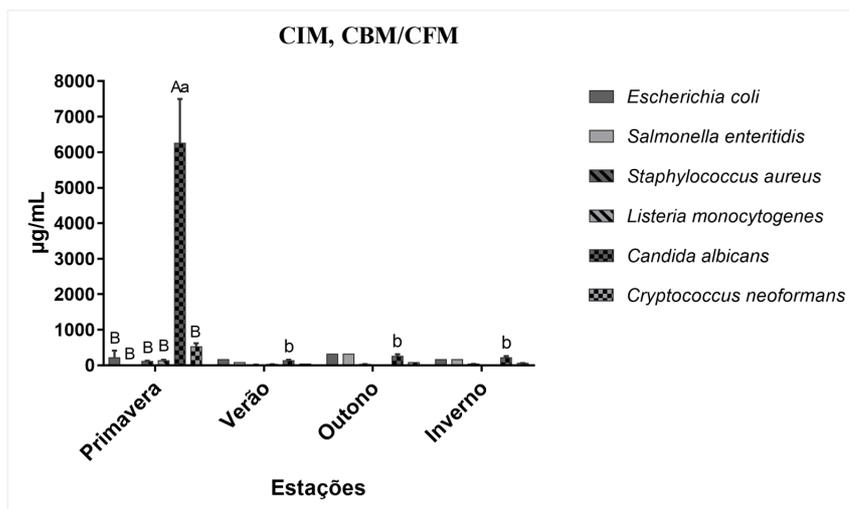


Gráfico 5. Médias das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) obtidas a partir do teste de CIM, CBM/CFM. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os micro-organismos dentro de cada estação do ano. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as estações.

4.2 FATORES QUE INFLUÊNCIAM A ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS

O padrão observado foi o previsto, uma vez que na literatura muitos autores consideram a estação do ano como um fator que influencia no metabolismo e na produção de metabólitos nas plantas, assim como outros fatores naturais como radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, em que no segundo caso os compostos mais polares são eliminados da planta por lixiviação (BECHO *et al.*, 2009), temperatura, solo, nutrientes, ou ainda fatores artificiais, como poluentes, que podem interferir fazendo com que a planta produza maior quantidade de metabólitos secundários como mecanismo de defesa contra adversidades e/ou patógenos (BECHO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009).

Além das influências citadas anteriormente, o fato dos menores valores de CIM terem sido observados no verão, outono e inverno pode ser explicado pelas características biológicas de *Orthostichella rigida*. Um aspecto interessante é o comportamento reprodutivo das espécies de briófitas. De acordo com um estudo desenvolvido por Lloret & Pérez (1984), o qual analisou tal comportamento em espécies de musgos, foi visto um padrão semelhante para os fenômenos reprodutivos estudados, em que o desenvolvimento dos gametângios ocorreu no outono e inverno, a fecundação teve lugar na primavera e verão, o esporófito apresentou crescimento no verão, seguida da dispersão dos esporos também no verão. Esse padrão é visto para espécies de musgos de ambientes em que há presença de estações climáticas bem definidas, como é o caso do Rio Grande do Sul, uma vez que o mesmo é caracterizado com clima subtropical úmido (ou temperado), constituído por quatro estações

razoavelmente bem definidas (MOREIRA, 2007). O estudo também ressalta que, assim como em espécies de plantas vasculares, existe uma periodicidade nos processos de reprodução mesmo que a fase dominante não seja o esporófito (LLORET & PÉREZ, 1984). Sendo assim, pode-se inferir que *O. rigida* possui o mesmo padrão reprodutivo supracitado, o que poderia explicar o fato dos melhores resultados de CIM terem sido observados no inverno, outono e verão, uma vez que nestes períodos críticos reprodutivos *O. rigida* estaria produzindo substâncias específicas para o desenvolvimento dos gametângios bem como crescimento do esporófito e liberação dos esporos (dispersão).

Uma outra característica a ser destacada é a produção do gametângio masculino que, possivelmente, apresenta maior gasto energético do que a de um gametângio feminino. Estudos indicam que a diminuição da disponibilidade de água age de forma inibitória sobre a expressão sexuada, diminuindo o desenvolvimento de gametângios masculinos, promovendo um aumento na densidade de indivíduos femininos, reduzindo assim a reprodução sexuada. A raridade de indivíduos masculinos pode ser causada, em parte, pela tolerância à dessecação diferencial entre os sexos, com masculinos menos capazes de tolerar ciclos repetidos de hidratação e dessecação, devido à sua maior necessidade energética para a expressão sexual (STARK *et al.*, 2000, BENASSI *et al.*, 2011). Desta maneira, os resultados do inverno poderiam ser explicados por que além de *O. rigida* produzir substâncias para a produção de gametófitos, sob influência das condições climáticas favoráveis a mesma poderia produzir substâncias específicas para o desenvolvimento do gametófito masculino, ou ainda, caso contrário, se as condições não fossem favoráveis, os esforços energéticos ficariam por conta da produção de gametófitos femininos, o que induziria a planta a outros métodos reprodutivos como, por exemplo, a reprodução por apogamia. Neste último caso, o desenvolvimento do gametófito em esporófito ocorre sem que haja fecundação, originando assim esporófitos apogâmicos (Figura 20) (CHOPRA, 1988).

Os resultados do verão poderiam também ser explicados caso houvesse a presença do esporófito apogâmico, uma vez que existem hormônios específicos envolvidos nesse processo como é o caso dos hormônios de crescimento, que em baixas concentrações são promocionais para resposta apogâmica, bem como outras substâncias como o hidrato de floral. Outra substância envolvida no desenvolvimento de esporófito apogâmico em briófitas é o fator sporogon, uma substância lábil que é translocada do esporófito para o protonema, onde induz à esporofilia (LONGTON, 1988). A natureza hormonal do fator sporogon está em um derivado da adenina, a bryokinina, presente em musgos, e que apoia a formação de

esporogônio apogâmico; bem como promove a diferenciação do arquegônio (órgão sexual feminino – gametângio), na fase de maturação sexual (CHOPRA, 1988).

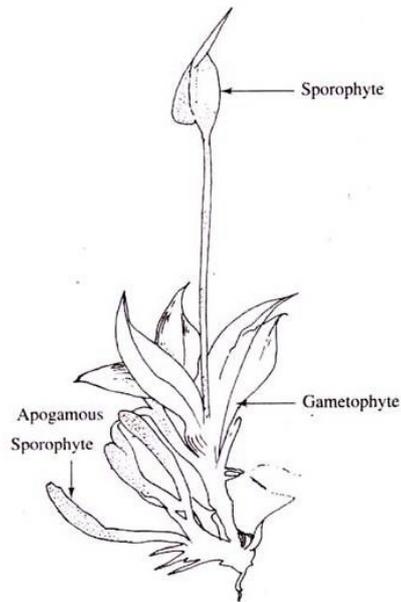


Figura 20. Gametófito (n) dando origem sexualmente ao esporófito (2n) e o desenvolvimento sem fecundação do esporófito apogâmico (n) (CHOPRA, 1988).

Em relação ainda aos resultados do verão, de acordo com Bopp (1993), o fitohormônio ABA (ácido absisílico), está presente em briófitas, assim como em plantas vasculares, envolvido em processo de déficit hídrico, só que para o primeiro caso o ABA serve como um mediador para induzir proteínas específicas (desidrinases) fortemente conectadas a essa tolerância, enquanto que no segundo o ABA está envolvido em processos como o fechamento dos estômatos. Portanto, pode-se concluir que, nas briófitas, o ABA tem a mesma função que nas plantas vasculares, atuando como mediador em condições de estresse. Sendo assim, a produção de substâncias específicas em combate à dessecação poderia explicar os resultados obtidos no verão.

Ilhan (2006) comparou extratos de metanol e acetona do musgo *Palustriella commutate* (Brid.) Ochyra, Ordem Hypnales, o qual foi coletado em duas diferentes épocas do ano (outubro de 2004 e maio de 2005), demonstrando que na coleta de outubro ocorreu atividade antimicrobiana contra algumas das estirpes testadas, enquanto que para a coleta de maio não houve nenhuma ação. Ele descreveu ainda que não houve nenhuma ação antifúngica para nenhum dos extratos testados. Comparativamente, as presentes coletas ocorreram nos meses de outubro, janeiro, abril e julho, em que outubro corresponde a

primavera e abril corresponde ao outono. Por outro lado, o estudo de Ilhan (2006) em que as coletas foram no hemisfério norte, outubro corresponde ao outono e maio a primavera. Sendo assim os presentes resultados corroboraram com o ensaio descrito de Ilhan (2006), uma vez que a atividade antimicrobiana foi mais efetiva na coleta de outono (outubro HN/abril HS), em relação a coleta da primavera (outubro HS/maio HN) tanto para o presente estudo quanto para o de Ilhan (2006).

Outro ponto a ser levado em consideração é o fato de que existe uma variedade de relações simbióticas ou comensais entre briófitas e bactérias ou fungos do solo. Em algumas espécies, essas relações são muito importantes para diferentes fases do ciclo de vida, como germinação de esporos, crescimento protonemal e desenvolvimento de gametóforos (LAL, 1984). Spiess *et al.* (1971, 1976), mostraram que o contato direto musgo-bactéria é necessário para formação de gametófito, a qual é induzida pela ação das bactérias e não apenas por substâncias endógenas, produzidas pela própria planta. Portanto, embora as briófitas frequentemente produzam substâncias antibacterianas, elas também precisam da presença de alguns micro-organismos. Essa aparente contradição poderia ser explicada pela atividade antibacteriana seletiva obtida a partir dos extratos de *O. rigida* frente aos micro-organismos testados, uma vez que, em ordem crescente, os menores valores absolutos de CIM foram obtidos perante *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. neoformans*, *S. enteritidis*, *E. coli* e *C. albicans*. Tais fatores ambientais e fisiológicos, assim como a metodologia empregada, e ainda o solvente utilizado para preparo dos extratos, podem explicar os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos do presente trabalho (HAYDA *et al.*, 2007).

4.3 EFEITO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO UTILIZADA

Devido ao solvente utilizado para o preparo dos extratos, os resultados obtidos podem ser distintos. Um estudo desenvolvido no Brasil por Pinheiro *et al.* (1989), descreveu que das 25 espécies de briófitas testadas em diferentes solventes, os musgos *Calymperes lonchophyllum* Schwaegrichen, 1816, *Trichosteleum guianae* (Müll. Hal.) Broth, *Vesicularia vesicularis* (Schwägr.) Broth e *Leucomium lignicola* Spruce ex Mitt apresentaram os melhores resultados de ação inibitória. O extrato etanólico de *C. lonchophyllum* apresentou uma inibição sobre *E. coli*, enquanto o extrato metanólico de *T. guianae* apresentou inibição sobre o mesmo micro-organismo. A ação inibitória foi vista no extrato clorofórmico de *L. lignicola* sobre *S. aureus*, dentre outras, esta espécie é única pertencente à Ordem Hypnales, mesma ordem do modelo biológico utilizado no presente trabalho. O álcool é responsável pela extração de taninos, terpenóides, polifenóis, poliacetilenos, esteróis, alcalóides e os

flavonoides presentes nas plantas, que são conhecidos por sua atividade antimicrobiana (COWAN, 1999).

4.4 EFEITO DE DIFERENTES COMPONENTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS

Outra questão importante é a interação das substâncias presentes em cada extrato. É sabido que inúmeras atividades biológicas são atribuídas aos compostos fitoquímicos presentes nas plantas, no caso dos extratos brutos todos os seus constituintes químicos estão presentes e é esperado que haja interações entre eles, sejam por sinergismos ou antagonismos, fato este que influencia na atividade antimicrobiana de cada extrato (FUNARI, 2006). Ainda, percebe-se que em diversos estudos os extratos brutos apresentam atividade antimicrobiana mais promissora quando comparada aos extratos fracionados ou que empregaram solventes com polaridades distintas, uma vez que a atividade antimicrobiana pode estar relacionada ao sinergismo entre os constituintes fitoquímicos presentes, como já mencionado. Portanto, extratos brutos de espécies vegetais podem muitas vezes apresentar ação antimicrobiana mais pronunciada (efetiva) contra patógenos devido ao sinergismo entre os constituintes bioativos que são extraídos pelo solvente ou método de extração empregado, uma vez que substâncias isoladas podem alterar suas propriedades na presença de outras substâncias (LEE & LEE, 2010; DELGADO-ADÁMEZ *et al.*, 2012).

Os compostos bioativos possuem mecanismos de ação inibitória em bactérias, como é possível observar-se na atividade antimicrobiana dos taninos, que levam à formação de complexos entre os mesmos e a parede celular ou enzimas extracelulares secretadas, fazendo com que ocorra a inibição do transporte de nutrientes para a célula, conseqüentemente retardando o crescimento do micro-organismo (MCSWEENEY *et al.*, 2001). Já os flavonoides possuem atividade antimicrobiana decorrente da desestruturação da parede celular e conseqüentemente destruição bacteriana, destacando-se componentes como a quercetina e rutina, frequentemente empregados como fitoterápicos (TAGURI *et al.*, 2004). Como também sua atividade antimicrobiana pode se dar devido à inibição do metabolismo energético da bactéria (CUSHNIE; LAMB, 2006). Os terpenóides são considerados importantes alternativas no controle de patógenos multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (ZHANG; BASU, 2003). Sabe-se que estes compostos possuem efeitos prejudiciais à parede celular bacteriana provocando a lise celular (TURINA *et al.*, 2006).

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS OBSERVADAS

Referente aos micro-organismos utilizados neste ensaio, as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (CIM 19,53 µg/mL CBM 78,13 µg/mL) e *L. monocytogenes* (CIM 19,53 µg/mL CBM 19,53 µg/mL) foram as mais sensíveis, seguida do fungo *C. neoformans* (CIM 39,06 µg/mL CBM 39,06 µg/mL), depois a bactéria Gram-negativa *S. enteritidis* (CIM 78,13 µg/mL CBM 78,13 µg/mL), e por fim com os maiores valores de CIM e CBM, *E. coli* (CIM 156,25 µg/mL CBM 156,25 µg/mL) e *C. albicans* (CIM 156,25 µg/mL CBM 156,25 µg/mL). É importante observar que a atividade bacteriostática e bactericida ocorreu em concentrações bem baixas de extrato (CIM < 200 µg/mL).

Um estudo realizado por Basile (1999) analisou a atividade antibacteriana de flavonoides isolados de cinco espécies de musgos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *S. aureus*, *E. coli* e uma espécie do gênero *Salmonella*. Os resultados obtidos demonstraram uma maior sensibilidade das bactérias Gram-negativas do que as positivas frente aos flavonoides testados, uma vez que para *S. aureus* não se obteve qualquer atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos pelo presente trabalho contrariam os obtidos por Basile (1999), uma vez que para *O. rigida* os extratos etanólicos surtiram um melhor efeito perante as bactérias Gram-positivas e fungos. Porém, como já citado anteriormente é previsto que extratos brutos e fracionados tenham atividades distintas, uma vez que no presente estudo os compostos estão misturados e, possivelmente, ocorra sinergismos entre eles, enquanto que no estudo de Basile (1999) o composto está isolado. Os autores explicam ainda que do ponto de vista ecológico, a presença de substâncias em musgos ativas em bactérias Gram-negativas pode ser parcialmente explicada pelo fato das bactérias presentes no solo serem mais Gram-negativas, seria então um mecanismo de defesa contra estes patógenos.

Outro ponto relevante a se destacar deste estudo é que para *E. coli* e *S. typhi* (Kauffmann & Edwards 1952; Le Minor & Popoff 1987) o valor de CIM obtido variou de 64-128 µg/mL. Comparando-se com o presente estudo, no qual o menor valor obtido para CIM foi de 156,25 µg/mL para *E. coli* e 78,13 µg/mL para *S. enteritidis*, é possível se observar que mesmo que no presente estudo as bactérias Gram-negativas não tenham obtido os menores valores de CIM, dentre o micro-organismos testados, mesmo assim, os valores quando comparados com o estudo de Basile (1999) se mostraram também bastante promissores, segundo os critérios compilados na (Tabela 3). Um outro estudo, o qual também analisou compostos isolados de briófitas, foi o de Mellegard (2009), no qual testou-se a

atividade antibacteriana do ácido esfagno e outros compostos fenólicos encontrados em *Sphagnum papillosum* Lindb. contra bactérias de origem alimentar, neste caso a ação antibacteriana não foi efetiva contra nenhum dos patógenos.

Um outro estudo realizado pelo Basile (1998), no qual foi analisada a atividade antimicrobiana de extratos acetônicos de *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindenb., um musgo da Família Pottiaceae, perante as bactérias Gram-positivas e negativas, incluindo-se *E. coli*, *S. typhi* e *S. aureus* conclui que, novamente a maioria das bactérias Gram-positivas não demonstraram sensibilidade ao extrato, e que para *S. aureus* a inibição ocorreu em concentrações mais altas (CIM igual a 512 µg/mL) o que contrasta com o presente resultado para *S. aureus* de (CIM = 19,53 µg/mL). Em contrapartida no estudo desenvolvido por Castaldo-Cobianchi (1988), para o musgo *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst., pertencente à Família Amblystegiaceae, Ordem Hypnales, mesma ordem que a espécie utilizada no presente estudo, mostrou bons resultados de atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-positivas, quanto para negativas.

Bodade (2008) realizou um estudo com cinco musgos, dentre eles *Thuidium delicatulum* (Hedw.) Schimp. in B.S.G. e *Thuidium cymbifolium* (Dozy & Molk.) Dozy & Molk., que fazem parte da Família Thuidiaceae, ordem Hypnales. Os extratos foram obtidos em diferentes solventes e, embora todos os extratos tenham mostrado níveis variados de atividade contra todos os fungos e bactérias testados, o extrato etanólico foi mais ativo do que outros extratos racionados. Os resultados também mostraram que as bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) foram muito sensíveis ao extrato quando comparados aos fungos. O que contrasta com o nosso resultado uma vez que para *C. neoformans* os resultados mostraram-se promissores (CIM 39,06 µg/mL CBM 39,06 µg/mL) bem como para *C. albicans* (CIM 156,25 µg/mL CBM 156,25 µg/mL) sendo que no primeiro caso o extrato é considerado bom ou potente e no caso do segundo moderado ou potente (Holetz *et al.*, 2002; Aligiannis *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2011).

Apesar da atividade antifúngica ser melhor documentada/estudada em espécies de hepáticas, os musgos também têm propriedades antifúngicas e existem dados publicados que corroboraram com os presentes resultados, como por exemplo, estudos com *Pogonatum aloides* Palisot de Beauvois, 1805, *Orthotrichum rupestre* Schleich. ex Schwaegr e *Plagiothecium denticulatum* (Hedw.) Schimp, sendo este último da Ordem Hypnales (SABOVLJEVIĆ, 2001). Outro ensaio que sustenta os resultados obtidos no presente

trabalho é o estudo realizado por Krishnan (2012), o qual analisou seis espécies do gênero *Bryum*, com extratos produzidos com diferentes solventes utilizados contra bactérias e fungos patogênicos humanos, observou-se que a maioria das espécies apresentou atividade antibiótica quando se utilizou extração metanólica/água, em comparação com outros solventes, e que a ação antimicrobiana dos extratos foi mais eficaz contra bactérias Gram-positivas; enquanto que as Gram-negativas apresentaram menor sensibilidade, resultado este semelhante ao do presente estudo. Ele comparou o estudo com o realizado por McCleary (1966 *apud*. KRISHNAN, 2012) que analisou o musgo *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp o qual demonstrou atividade antibiótica contra nove cepas de bactérias Gram-positivas.

O fato de existir sensibilidade das bactérias Gram-negativas para os extratos utilizados é importante do ponto de vista médico, porque as substâncias antibacterianas, que são normalmente usadas na terapia, são ativas principalmente contra bactérias Gram-positivas. Porém, a atividade antibacteriana frente as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* também deve ser considerada devido aos elevados percentuais de resistência que esta bactéria apresenta diante de toda uma classe de medicamentos beta-lactâmicos. Os isolados de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) têm sido desafiadores e a constatação da resistência à vancomicina tem tornado o espectro de suscetibilidade de *S. aureus* crítico, contribuindo com elevadas taxas de mortalidade (LIU & CHAMBERS, 2003). Além disso, a ação antimicrobiana contra a *L. monocytogenes* e *S. aureus* pode estar relacionada ao fato das bactérias Gram-positivas serem mais sensíveis por apresentarem uma camada única na parede celular, já as bactérias Gram-negativas apresentam uma camada extra de lipopolissacarídeos e proteínas na parede celular que formam uma barreira física à permeabilidade de agentes antimicrobianos (FORSYTHE, 2013). A menor sensibilidade ao extrato de *O. rigida* sobre *Candida albicans*, quando comparada às bactérias, poderia ser explicado uma vez que além da composição da membrana, a parede celular dos fungos possui estrutura diferente da parede de bactérias (COWEN, 2008). A existência de atividade antibacteriana superior a antifúngica poderia ser resultado de uma possível especificidade de ação sobre o metabolismo bacteriano o que pode explicar o resultado obtido no presente estudo. Outro ponto a ser levado em consideração é que *C. albicans* tem evidenciado problemático perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. Essa resistência envolve diversos mecanismos moleculares e um dos principais consiste na alteração da composição de lipídeos da sua membrana celular (SANGLARD, 2002). De outra forma, com base na existência de sensibilidade do extrato de *O. rigida* frente

aos fungos testados, demonstra o potencial antifúngico existente em musgos os quais são menos documentados, uma vez que os estudos da atividade antifúngica é melhor vista em espécies de hepáticas (SABOVLJEVIĆ, 2001)

É importante ressaltar que apesar de haver diferenças dos resultados apresentados nos trabalhos supracitados e nos resultados do presente ensaio, não é possível estabelecer uma comparação direta entre eles, visto que além das espécies/cepas serem distintas, os métodos e os solventes extratores, assim como as cepas microbiológicas avaliadas foram diferentes daquelas aqui testadas. Os resultados apresentados pelas CIM e CBM/CFM, neste estudo, demonstraram o grande potencial dos extratos etanólicos de *O. rigida*, visto que apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações muito baixas e contra micro-organismos de relevância na Área Médica.

5. CONCLUSÃO

- O extrato etanólico da briófitas *Orthostichella rigida* mostrou-se eficaz nas análises antimicrobianas para todos os micro-organismos testados (*Salmonella enterica* serovar enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*), apresentando potencial biotecnológico clínico;
- A espécie menos sensível aos extratos de *O. rigida* foi o fungo *Candida albicans* quando comparado aos outros isolados testados;
- A maior sensibilidade aos extratos de *O. rigida* foram para *L. monocytogenes* (19,53 µg/mL), *C. neoformans* (39,06 µg/mL), *S. aureus* e *S. enteritidis* (78,13 µg/mL);
- Os extratos provenientes das estações do ano verão, outono e inverno foram mais eficientes para atingir a CIM, CBM e CFM, com valores inferiores a 100 µg/mL para ambos, o que é considerado potente, possivelmente associado a um aumento da eficiência inibitória, bactericida e fungicida pra briófitas durante o desenvolvimento dos gametângios e durante o crescimento do esporófito e dispersão dos esporos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Orthostichella rigida demonstrou ter potencial promissor para novos estudos e possível aplicação como antimicrobiano de origem natural. Para isso, são necessários estudos adicionais que poderão incluir a realização de mais análises antimicrobianas com outras espécies bacterianas e fúngicas patogênicas humanas.

Uma vez que atividades antibióticas significativas tenham sido determinadas a partir do extrato de *O. rigida*, os valores de CIM e CBM/CFM podem então ser comparados com os antibióticos de referência padrão para o desenvolvimento de medicamentos comerciais, desde que previamente testados em relação a sua toxicidade. Além disso, é importante o isolamento dos compostos presentes no extrato de *O. rigida* utilizando-se técnicas de cromatografia para que se possa examinar a estrutura desses compostos, e, em adição, esses compostos seriam submetidos a estudos em animais e humanos para determinar sua eficácia em sistemas de organismos, incluindo-se estudos de toxicidade à microbiota normal.

REFERÊNCIAS

ALLEN, B. & MAGILL, R.E. **A revision of *Orthostichella* (Neckeraceae)**. The Bryologist, 2007.

AL-REZA, S.M. *et al.* **Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens**. Barking: Food Chemistry, 2010.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

ÁLVARES, C. A. *et al.* **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras**. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v43n5/a04v43n5.pdf>>. Acessado em: 12/11/2018.

ALIGIANNIS, N. *et al.* **Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species**. J Agric Food Chem, 2001.

ASAKAWA, Y. **Biologically active substances obtained from bryophytes**. J Hattori Bot Lab, 1981.

ASAKAWA, Y. **Chemical constituents of the bryophytes**. In: HERZ, W. *et al.* **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Vienna: Springer, 1982.

ASAKAWA, Y. **Biologically active substances from bryophytes**. In: CHOPRA, R. N.; BHATLA, S. C. **Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry**. Boston: CRC Press, 1990.

ASAKAWA, Y. **Biologically active compounds form bryophytes**. Japan, 2007.

ASAKAWA, Y. **Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds**. Med. Aromat. Plants, 2012.

ASAKAWA, Y. *et al.* **Phytochemical and biological studies of bryophytes**. Phytochemistry, 2013.

ANVISA. **Resolução-Rdc Nº. 48, De 16 de Março de 2004**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso: 22/10/2018.

ARAÚJO, J. M. *et al.* **MRSA de origem comunitária**. Residência Pediátrica, Rio de Janeiro, 2011.

BASSAN, J. D. L. *et al.* **Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo**. Santa Maria: Ciência Rural, 2008.

BARBOSA, T. C. R. **Surtos de algumas doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** Monografia (Pós Graduação em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos.** (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BAGGESEN, D. L.; AARESTRUP, F. M. **Characterisation of recently emerged multiple antibiotic-resistant Salmonella enterica serovar typhimurium DT104 and other multiresistant phage types from Danish pig herds.** The Veterinary record, 1998.

BASTOS, V. M. P. *et al.* **Comparação da incidência, da prevalência da colonização, e da resistência de Staphylococcus aureus em diferentes populações humanas.** Rev. UNIABEU, 2013.

BACKES, P. *et al.* **Diagnóstico laboratorial de Cryptococcus sp.no líquido.** Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2016.

BAEK, S. H. *et al.* **Antimicrobial chlorinated bibenzyls from the Liverwort Riccardia marginata.** J. Nat. Prod, 2004.

BASILE, A. *et al.* **Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses.** Naples, Italy, 1999.

BASILE, A. *et al.* **Antibiotic Effects of Lunularia cruciata (Bryophyta) Extract.** Naples, Italy, 1998.

BANERJEE, R. D.; SEN, S. P. **Antibiotic Activity of Bryophytes.** Bryologist, 1979.

BECHO, J. R. M. *et al.* **Estrutura, metabolism e potencial farmacológico.** Revista interdisciplinas de estudos experiemntais, 2009.

BENASSI, M. *et al.* **Plant size, sex expression and sexual reproduction along an elevation gradient in a desert moss.** The Bryologist, 2011.

BLAIR, J. M. *et al.* **Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance.** Nature, 2015.

BOEKHOUT, T, *et al.* **Hybrid genotypes in the pathogenic yeast Cryptococcus neoformans.** Microbiology, England, 2001.

BOPP, M.; WERNER, O. **Abscisic Acid and Desiccation Tolerance in Mosses.** Botanica acta, 1993.

BODADE, R. G. *et al.* **In vitro Screening of Bryophytes for Antimicrobial Activity.** Maharashtra, India, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004**. Boletim eletrônico epidemiológico, ano 05, n. 6, dezembro 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA: período de 2000 a 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em: 27/10/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância em Saúde – SVS. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2007 – 2017**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Investigação de surto de botulismo alimentar em Coruripe/AL, em abril de 2009**. Boletim eletrônico epidemiológico, ano 10, n. 7, dezembro 2010.

BRASIL. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA**. São Paulo, 2014. Disponível em: http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf> Acesso em 27/10/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de informações hospitalares**. 2009. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/area/11/biblioteca.html>. Acesso em 27/10/2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **A convenção sobre a Diversidade Biológica**. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios, 1ª edição). 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde. (Série B. Textos Básicos de Saúde, 1ª edição). [2009]b.

BUCK, W. R.; GOFFINET, B. **Morphology and classification of mosses**. In: SHAW, A. J.; GOFFINET, B. **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press, New York, 2000.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review**. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, 2004.

BUCK, W. R.; GOFFINET, B. **Morphology and classification of mosses**. In: SHAW, A. J.; GOFFINET, B. **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press, New York, 2000.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. Brazilian Journal and Biological Research, 2000.

CASTALDO, C. R. *et al.* **Occurrence of antibiotic activity in *Conocephalum conicum*, *Mnium undulatum* and *Leptodictyum riparium* (Bryophyta)**. Giorn Bot Ital, 1988.

CARRIÓN, J. S. **Evolución vegetal**. Murcia, 2003.

CASTALDO-COBIANCHI, R. *et al.* **Occurrence of antibacterial activity in *Conocephalum conicum*, *Mnium undulatum* and *Leptodictyum riparium* (Bryophytes)**. Giornale Botanico Italiano, 1988.

CAMEJO, M. I. *et al.* **Selenium, copper and zinc in seminal plasma of men with varicocele, relationship with seminal parameters**. 2011.

CHILANTE, S.B. & BORDIN, J. **Variação vertical de Briófitas Epífitas na Apa Morro de Osório, Osório, Rio Grande do Sul, Brasil**. R. Eletr. Cient. Uergs, Porto Alegre, v.2, n.1, p.05–17, 2016.

CHOPRA, R. N.; KUMRA, P. K. **Biology of Bryophytes**. New Delhi, 1988.

CIOFFI, G., P. *et al.* **Antioxidant bibenzyl derivatives from *Notholaena nivea***. Desv. Molecules, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Pennsylvania, 2015.

COWEN, L. E. **The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype**. Nat Rev Microbiol, 2008.

COLOMBO, A. L. *et al.* ***Candida glabrata*: An emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals**. Medical Mycology, 2013.

COSTA, A. L. P; JUNIOR, A. C. S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura**. Amapá, 2017.

COSTA, D. P. *et al.* **Diversity of Secondary Metabolites in the Liverwort *Syzygiella rubricaulis* (Nees) Steph. (Jamesoniellaceae, Marchantiophyta) from Neotropical High Mountains**, 2018.

COSTA, A. L. P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequencias e Estratégias De Contenção**. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COWAN, M. M. **Plant product as antimicrobial agents**. Clinical Microbiology Reviews, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. **Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of Staphylococcus aureus**. Phytomedicine, 2006.

DAS K. *et al.* **Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends**. J. Med. Plants Res, 2010.

DALAZEM, D. **Avaliação do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos orais e vulvovaginais de Candida ssp. aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e miconazol**. Universidade Comunitária da Região de Chapecó–Unochapecó, Chapecó-SC, 2010.

DEVI, K. P. *et al.* **Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane**. J. Ethnopharmacol, 2010.

DELGADO ADÁMEZ, J. *et al.* **In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (Vitis vinifera L.)**. Food Control, 2012.

DELGADILLO, M. C.; CÁRDENAS, S. A. **Manual de Briofitas**. Cuadernos del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1990.

DIGNANI, M. C. *et al.* **Candida**. In: ANAÏSSIE E. *et al.* **Medical Mycology**. Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003.

DROBNIK, J.; STEBEL, A. **Central European medicinal bryophytes in the 16th-century work by Caspar Schwenckfeld, and their ethnopharmacological origin**. Journal of Ethnopharmacology, 2015.

DROBNIK, J.; STEBEL, A. **Tangled history of the European uses of Sphagnum moss and sphagnol**. Journal of Ethnopharmacology, 2017.

DROBNIK, J.; STEBEL, A. **Medicinal mosses in pre-Linnaean bryophyte floras of central Europe. An example from the natural history of Poland**. Journal of Ethnopharmacology, 2014.

ESTADO HOME PAGE [Em linha]. Disponível em <<http://www.estadao.com.br/noticias/vidae,bacterias-em-meloes-matam-13-nos-eua,779005,0.htm>>. Acesso em 24/10/2018.

FARIA, R.O. *et al.* **Ocorrência de Cryptococcus neoformans em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul**. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, Uberaba, 2010.

FAO/WHO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITESNATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Health Regulations – Outbreaks of E.coli O104:h4 infection**. 2011.

FORTERRE, P.; BROCHIER, C.; PHILIPPE, H. **Evolution of the Archaea**. Theoretical Population Biology 61, 409–422, 2002.

FIGUEIREDO, E. E. S. *et al.* **Avaliação das condições higiênico-sanitárias de manipulação e comercialização de produtos de origem animal nas feiras-livres do Município de Cuiabá, MT**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. **Análise de Própolis**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2006.

FREMAUX, B. *et al.* **Long-term survival of Shiga toxin-producing Escherichia coli in cattle effluents and environment: An updated review**. Veterinary Microbiology, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2005.

GBIF. **GBIF Home Page**. Disponível em: <<http://gbif.org>>. Acessos em: 17/09/2018.

GHANNOUM, M. A; RICE, L.B. **Antifungal agentsL mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance**. Clinical Microbiology Reviews, 1999.

GIACOMAZZI, J. *et al.* **The burden of serious human fungal infections in Brazil**. Mycoses. 2016.

GOFFINET, B. *et al.* **Morphology and Classification of the Bryophyta**. In: GOFFINET, B.; SHAW, A. J. **Bryophyte Biology** 2. ed. Cambridge: Cambridge University, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários**. Química Nova, 2007.

GÖTZ, F. *et al.* **The Genera Staphylococcus and Micrococcus**. Springer New York, 2006.

GRADSTEIN, S.R., CHURCHILL, S.P. & SALAZAR-ALLEN, N. **Guide to the Bryophytes of Tropical America**. Memoirs of The New York Botanical Garden 86: 1-577, 2001.

GRUNDMANN, H. *et al.* **Geographic distribution of Staphylococcus aureus causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis**. PloS Med, 2009.

GULLO, F. P. *et al.* **Novas alternativas terapêuticas para o tratamento da Criptococose: Análogos de Resveratrol e microRNAs.** Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Araraquara, 2016.

HAIDA, K. S. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais.** Arq.Cien.Sal.UniP, 2007.

HENNEKINNE, J. A. *et al.* **Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.** FEMS Microbiology Reviews, 2012.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical dictionary Taylor and Francis.** London, UK, 1993.

HOLETZ, F.B. *et al.* **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002.

ILSI RESEARCH FOUNDATION/RISK SCIENCE INSTITUTE, EXPERT PANEL ON *Listeria monocytogenes* IN FOODS. **Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis—A Risk-Based Approach.** Journal of Food Protection , 2005.

ILHAN, S. *et al.* **Antimicrobial Activity of Palustriella commutata (Hedw.) Ochyra Extracts (Bryophyta).** Eskiflehir, Turkey, 2006.

JAWETZ, E. *et al.* **Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JUNIOR, C.S.A.P. *et al.* **Criptococoma cerebral e pulmonar em paciente imunocompetente: relato de caso.** Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery, 2015.

JUNIOR, V. L. P. *et al.* **Criptococose associada à Aids. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico.** Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical vol.39 no.2 Uberaba, 2006.

KANDLER, O. & KONIG, H. **Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria).** Cell. Mol. Life Sci., 54:305–308, 1998.

KANAFANI, Z.A., FOWLER, V.G. JR. **Staphylococcus aureus infections: new challenges from an old pathogen.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica , 2006.

KIM, S. J. *et al.* **Cytotoxic and Antitumor Activity of Momilactone B from Rice Hulls.** J. Agric. Food Chem, 2007.

KNODLER, L. A. *et al.* **Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia.** Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2010.

KRISHMAN, R. *et al.* **In Vitro Microbicidal Potentiality of Targionia Hypophylla l. And Bryum Species- Bryophytes.** Thiruvananthapuram, Kerala, 2012.

LAMBERT, M. L. *et al.* **Clinical outcomes of health-care- associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study.** Infectious diseases, 2011.

LAL, M. **The culture of Bryophytes including apogamy, apospory, parthenogenesis and protoplasts.** In: DYER, A. F, DUCKETT, J. C, editors. **The Experimental Biology of Bryophytes.** London: Academic Press, 1984.

LAZÉRA, M. S. *et al.* **Possible primary ecological niche of Cryptococcus neoformans.** Med Micol, 2010.

LAZÉRA, M. S. *et al.* **Criptococose.** In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias,** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

LEVY, S. B. **The challenge of Antibiotic Resistance.** Texas, 1998.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

LEE, O. H.; LEE, B. Y. **Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Oleaeuropaea leaf extract.** Bioresource Technology, 2010.

LIU, C.; CHAMBERS, H. F. **Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods.** Antimicrob Agents Chemother. 2003.

LOPES, O. J. *et al.* **Criptococose não associada à aids no rio grande do sul: relato de oito casos e revisão da literatura sul-riograndense.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 1997.

LONGTON, R.E. **Life-history strategies among bryophytes of arid regions.** Journal of the Hattori Botanical Laboratory, 1988.

LOGUERCIO, A. P. *et al.* **Listeria monocytogenes: um importante patógeno de origem alimentar.** Higiene Alimentar, São Paulo, 2001.

LLORET, F. R.; PÉREZ. **Estudio del ciclo reproductivo de algunas especies de musgos.** Anales de Biología, 1984.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock.** Tradução: Alice Freitas Versiani *et al.* 14. ed. Porto Alegre:Artmed, 2016.

MATHUR, T. *et al.* **Adverse Effect os Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides.** Japanese Journal of Infectious Disease, Toyana, 2005.

- MATOS, B. M. *et al.* **Atividade antifúngica do extrato alcóolico de *Menthapiperita* sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.** Rev. Odontol, 2009.
- MARKHAM, K. R. *et al.* **The Flavonoids-Advances in Research.** Chapman & Hall, London, 1988.
- MCCLEARY, J. A. *et al.* **Mosses as Possible Sources of Antibiotics.** Science, 1960.
- MCSWEENEY, C. S. *et al.* **Effect of the tropical forage *Calliandra* on microbial protein synthesis and ecology in the rumen.** Journal Applied Microbiology, 2001.
- MCCLEARY, J. A.; WALKINGTON, D. L. **Mosses and antibiotics.** Rev. Bryol. Lichenol, 1966.
- MELO, B. A. *et al.* **Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro – Alagoas.** Revista Verde, Mossoró, 2010.
- MELLEGARD, H. *et al.* **Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food- borne bacteria.** Oslo, Norway, 2009.
- MICRO-ORGANISMO **causadores de doenças de origem alimentar.** Revista Food Ingredients Brasil, 2011.
- MOREIRA, I. **O Espaço Rio-Grandense.** Editora ática, 2007.
- MURRAY, P. R. *et al.*. **Microbiologia Médica.** Tradução de Andreza Martins. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria.** São Paulo, 2000.
- NEWTON, S. M., LAU, C., WRIGHT, C.W. **A review of antimycobacterial natural products.** West Yorkshire, 2000.
- NISHIKAWA, M. M. *et al.* **Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns.** J Clin Microbiol, 2003.
- OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **África do Sul enfrenta ‘maior surto de listeriose do mundo’; OMS oferece apoio.** Disponível em <<https://nacoesunidas.org/africa->

do-sul-enfrenta-maior-surto-de-listeriose-do-mundo-oms-oferece-apoio/>. Acesso em: 05/09/2018.

PAPPAS, P. G. *et al.* **Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.** Clin Infect Dis, 2016.

PETTI, C. A.; FOWLER, V. G. JR. **Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis.** Cardiology Clinics, 2003.

PEREA, S. PATTERSON, T. F. **Antifungal resistance in pathogenic fungi.** Antimicrobial resistance, 2002.

PERESI, J. T. M. *et al.* **Surto de enfermidades transmitidas por alimentos causados por Salmonella Enteritidis.** Rev. Saúde Pública, 1998.

PERFECT, J. R.; COX, G. M. **Drug resistance in Cryptococcus neoformans.** Drug Resistance Updates, 1999.

PITISUTTITHUM P. *et al.* **Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections.** J. Antimicrob. Chemother. 56: 745–755, 2005.

PINHEIRO, M. F. *et al.* **Contribuição ao Estudo de Briófitas como Fonte de Antibióticos.** Acta Amazonica, 1989.

PÓCS, T. **Tropical Forest Bryophytes.** In: SMITH, A. J. E. (ed.). **Bryophyte Ecology.** 1982.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicon, 2001.

REX J. H. *et al.* **Practice Guidelines for the treatment of candidiasis.** J Infect Dis, 2000.

RIO GRANDE DO SUL. **Diagnóstico Relatório Oficial 2000 - 2015.** Secretaria Estadual da Saúde - banco paralelo em excel 2003, Divisão de Vigilância Epidemiológica do Centro Estadual em Saúde do Rio Grande do Sul - CEVS/RS, setembro, 2016.

RODRIGUEZ, C. A.; VESGA, O. **Staphylococcus aureus resistente a vancomicina.** Biomédica, 2005.

RUIZ, N. M.; RAMIREZ-RONDA, C. H. **Tetracyclines, macrolides, lincosamides & chloramphenicol.** Bol Asoc Med, 1990.

SASIDHARAN, S. *et al.* **Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts.** African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines, 2011.

SANGLARD, D.; ODSS, F. C. **Resistance of Candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences.** 2002.

SALIE, F.; *et al.* **Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species.** South Africa, 1996.

SANTANA, E. H. W. *et al.* **Estafilococos em alimentos.** Arquivos do Instituto Biológico, 2010.

SÁEZ-LLORENS, X. *et al.* **Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country.** *Pediatr Infect Dis J*, 2000.

SABOVLJEVIĆ, M. *et al.* **Bryophytes as a Potential Source of Medicinal Compounds.** Belgrade, 2001.

SCHOFIELD, W. B. **Introduction to Bryology**, 2a ed. New Jersey, 2001.

SCALLAN, E. *et al.* **Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.** 2011.

SCHUSTER, R. M. **New Manual of Bryology.** Nichinan, 1984.

SILVA, E. M.; DUARTE, A. **Salmonella Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil.** *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 2002.

SILVA, K. C. F. A. **Avaliação do uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana como conservantes em formulações farmacêuticas.** 2011.

SILVA, J. R. *et al.* **Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2009.

SINGH, M. *et al.* **Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm et Lind.** *J Ethnopharmacol*, 2006.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SPIESS, L. D. *et al.* **Development and gametophore induction in the moss *Pylaisiella selwynii* as influenced by *Agrobacterium tumefaciens*.** *Am J Bot*, 1971.

SPIESS, L. D. *et al.* **The requirement of physical contact for moss gametophore induction by *Agrobacterium tumefaciens*.** *Am J Bot*, 1976.

STEHMANN, J. R. *et al.* **Plantas da Floresta Atlântica.** Rio de Janeiro, 2009.

STARK, L. R. *et al.* **The cost of reduced sexual reproduction assessing patterns of reproductive allocation and sporophyte abortion in a Desert Moss.** *American Journal of Botany*, 2000.

- TAVARES, W. **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2000.
- TAGURI, T. *et al.* **Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bactéria causing food-borne disease.** Biological Pharmaceutical Bulletin, 2004.
- TAPIA C. *et al.* **Susceptibilidade antifúngica de cândida albicans recuperadas de pacientes com sida y candidiasis orofaríngea y esofágica.** Experince com etest rev med chile, 2003.
- TINDALL, B. J. *et al.* **Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 2005.
- TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia.** Tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian, Luis Fernando Marques Dorvill. 12. ed. Porto Alegre : Artmed, 2017.
- TRILLES, L. *et al.* **Genetic characterization of environmental isolates of the Cryptococcus neoformans species complex from Brazil.** Med Mycol, 2003.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- TURNIDGE, J. *et al.* **Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values.** Australia, 2006.
- TURINA, A. V. *et al.* **Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning.** Biophysical Chemistry, 2006.
- VANDERPOORTEN, A.; GOFFINET, B. **Introduction to Bryology.** New York: Cambridge University Press, 2009.
- VAN HOOFF, L. *et al.* **Antibacterial and antiviral screening of Bryophyta.** Phytoterapia, 1981.
- WHITE, T. C. *et al.* **Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance.** Clinical Microbiology Reviews, 1998.
- WIEST, J.M. *et al.* **Inibição e inativação in vitro de Salmonella spp. Com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, 2009.
- VILAS BÔAS-BASTOS, S. B. **Lembophyllaceae.** *In:* Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB96490>>. Accessed on: 03 Nov. 2018

WELKER, C.A.D. *et al.* **Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** R. bras. Bioci., Porto Alegre, 2010.

WEBSTER, D. *et al.* **Antifungal activity of medicinal plants extracts; preliminary screening studies.** J. Ethnopharmacol, 2008.

WEBER, D. A. **Briófitas de um fragmento de mata de restinga do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente.** Rio de Janeiro, 2018 Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812>. Acesso em: 08/09/2018.

WOESE, C. R. *et al.* **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015, who estimates of the global burden of foodborne diseases,** 2015.

WU, X. Z. *et al.* **Effect of plagiocin E, an antifungal macrocyclic bis(bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*.** Acta Pharmacol. Sin. 2008.

XIE, C. F.; LOU H. X. **Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect.** China, 2009.

ZINSMEISTER, H. D. *et al.* **Bryophytes a source of biologically active naturally occurring material?** Angewandte Chemie 30, 1991.

ZHANG, S.; BASU, C. **Quorum sensing and proactive host defense.** Trends in Plant Science, 2003.