



UNICAMP UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA – DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Alex Jardelino Felizardo de Souza

Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina *in vitro*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Alex Jardelino Felizardo
de Souza
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Marcos Hikari Toyama

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular – Área de Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Campinas – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89e	<p>Souza, Alex Jardelino Felizardo de Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina <i>in vitro</i> / Alex Jardelino Felizardo de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Marcos Hikari Toyama. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Rutina. 2. Quercetina. 3. Antimicrobiano. 4. Rutinose. I. Toyama, Marcos Hikari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Evaluation of antimicrobial effects of rutin and quercetin in vitro.

Palavras-chave em inglês: Rutin; Quercetin; Antimicrobial; Rutinose.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Marcos Hikari Toyama, Gerson Nakazato, Luís Otávio Saggion Beriam.

Data da defesa: 26/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

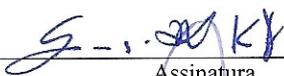
Campinas, 26 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . Marcos Hikari Toyama (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Gerson Nakazato


Assinatura

Prof. Dr . Luís Otávio Saggion Beriam


Assinatura

Prof. Dr. Fernando José Zara

Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

Assinatura

A Família e amigos

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, da UNESP – Campus do Litoral Paulista – Unidade de São Vicente por ser um excelente orientador e, além disso, ser um ótimo amigo que adquiri durante minha vida.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni do Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) - Departamento de Bioquímica por abrir espaço em seu laboratório para a realização do meu mestrado.

Ao Técnico de Laboratório e grande amigo Paulo Baldasso que contribuiu com sua amizade e colaboração com a pesquisa.

Aos meus pais e irmão que sempre estiveram ao meu lado e por sua paciência.

A Thalyta Potenza por ser uma grande amiga e namorada, que estará pra sempre onde eu for, me apoiando.

Aos amigos orientandos Eduardo, Simone e Fabiana por serem sempre prestativos e pelo apoio em todas as situações.

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP), pelo carinho, amizade e convivência durante esse período.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo imprescindível apoio financeiro.

ÍNDICE

Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xi
Abreviações	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Flavonóides	1
1.1.1. Estrutura dos flavonóides	1
1.1.2. Principais classes de flavonóides	2
1.1.3. Atividades biológicas dos flavonóides	5
1.2. Quercetina e Rutina	7
2. Justificativas	9
3. Objetivos	10
4. Materiais e métodos.....	11
4.1. Materiais e linhagens bacterianas	11
4.2. Atividade antibacteriana sobre o crescimento das linhagens	12
4.2.1. Atividade antibacteriana contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	12
4.2.2. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM) da quercetina e rutina em bactérias patogênicas	12
4.3. Avaliação do efeito antibacteriano sobre parede e membrana celular	14

4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> incubada com flavonóides.....	14
4.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> incubadas com flavonóides	14
4.4. Efeito sobre enzima de replicação celular	15
4.4.1. Caracterização das alterações estruturais da DNA polimerase de bacteriófago T4 pela presença de rutina	15
4.5. Efeito de quercetina e rutina sobre o cDNA.....	16
4.5.1. Isolamento de RNA total e Síntese de cDNA	16
4.5.2. Amplificação em PCR.....	16
4.5.3. Eletroforese em gel de agarose 1,5%	17
4.5.4. Cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa em coluna C-18.....	17
4.5.5. Perfil Espectral Ultravioleta – visível.	18
4.6. Análises estatísticas	19
5. Resultados	20
5.1. Atividade antibacteriana.....	20
5.1.1. Atividade antibacteriana sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	20
5.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em bactérias patogênicas.	23
5.2. Avaliação do efeito antibacteriano sobre parede e membrana celular	23
5.2.1. Experimentos de microscopia eletrônica de varredura em <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	23

5.2.2. Experimentos de microscopia eletrônica de transmissão em <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	25
5.3. Efeito sobre enzima de replicação celular	27
5.3.1. Análise em Dicroísmo Circular de DNA polimerase de T4.....	27
5.4. Efeitos de quercetina e rutina sobre cDNA	29
5.4.1. Eletroforese em gel de agarose 1,5%.	29
5.4.2. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa em coluna C-18....	30
5.4.3. Perfil Espectral Ultravioleta-visível	34
6. Discussão.....	37
7. Conclusões.....	41
8. Referências Bibliográficas	42

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura e numeração básica de um flavonóide, pág. 1
- Figura 2.** Classes de flavonóides, pág. 3
- Figura 3.** Estrutura molecular de quercetina (A) e de sua forma glicosilada (B), a rutina, pág. 8.
- Figura 4.** Efeito de rutina e quercetina no crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, pág. 35.
- Figura 5.** Efeito de rutina e quercetina sobre o crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, pág. 36.
- Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura realizada com linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* submetidas a três tratamentos experimentais, pág. 38.
- Figura 7.** Microscopia eletrônica de transmissão das linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* submetidas a três tratamentos experimentais, pág. 40.
- Figura 8.** Efeito da rutina sobre o enovelamento proteico de DNA polimerase de T4, pág. 42.
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose dos grupos controles (negativo e positivo) comparado com os tratamentos com quercetina e com rutina, pág. 43.
- Figura 10.** Perfil cromatográfico de cDNA com 200 pares de base, pág. 45.
- Figura 11.** Perfil cromatográfico do cDNA incubado com rutina, pág. 46.
- Figura 12.** Perfil cromatográfico do cDNA incubado com quercetina, pág. 47.
- Figura 13.** Espectro de absorção Ultravioleta-visível comparando cDNA (controle) e cDNA incubado com Rutina, pág. 49.
- Figura 14.** Espectro de absorção Ultravioleta-visível comparando cDNA (controle) com cDNA incubado com quercetina, pág. 50.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Linhagens bacterianas, pág. 25

Tabela II. Resultados das atividades dos flavonóides, pág. 54.

ABREVIACÕES

μ - Bondapack C 18. Coluna de HPLC com n-octadecyl como base da fase estacionária

BSA. Albumina sérica bovina

cDNA. cido desoxirribonucléico complementar

CIM. Concentrao inibitória mínima

CLSI. Instituto de Padronizao Clínica e Laboratorial

DC. Dicroísmo circular

DMSO. Dimetil sulfóxido de fórmula (CH₃)₂SO.

ELISA. Ensaio imunoabsorvente de ligao enzimática

LDH. Lactato desidrogenase

HIV. Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC. Cromatografia líquida de alta pressão

PCR. Reao em Cadeia da Polimerase

PLA₂. Fosfolipase A₂

RNA. cido ribonucléico

TBE. Tampão Tris-borato-EDTA

UFC. Unidade formadora de colnia

RESUMO

Flavonóides é um grupo de compostos polifenólicos e metabólitos secundários produzidos por plantas. Eles podem ser encontrados em frutos e vegetais.

Vários estudos têm mostrado que os flavonóides podem apresentar várias atividades biológicas importantes como agentes antioxidantes, antitumorais, antimicrobianos e ainda inibir atividade de algumas moléculas com as PLA₂. Recentemente estudos mostram também que os flavonóides podem atuar em moléculas de DNA. A atividade antimicrobiana dos flavonóides é decorrente de desestruturação de membrana celular e conseqüentemente destruição da célula bacteriana.

Neste trabalho avaliamos efeitos antimicrobianos de quercetina e rutina, que são comumente empregados como fitoterápicos. Foi observado que ambos flavonóides inibiram o crescimento de bactérias fitopatogênicas. Contudo nenhum efeito foi observado em outras linhagens de bactérias patogênicas.

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura e transmissão não evidenciaram mudanças significativas na estrutura celular de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* incubadas com rutina e quercetina. Tanto rutina quanto a quercetina foram capazes de promover mudanças estruturais na molécula de cDNA como observado nos resultados de HPLC. A rutina induziu discreta modificação na proteína DNA polimerase. E quercetina impediu a síntese de cDNA a partir de RNA como mostram resultados de eletroforese.

Estes dados sugerem que a inibição do crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pode envolver a ação dos flavonóides (quercetina e rutina) sobre o DNA bacteriano, mudando suas propriedades estruturais e conseqüentemente a replicação bacteriana. E ainda, os dados mostram que a presença da rutinose pode influenciar a forma de atuação destes flavonóides.

ABSTRACT

Flavonoids are a group of polyphenolic compounds and secondary metabolites produced by plants. They may be found in fruits and vegetables.

Several studies have shown that the flavonoids may submit several biological important activities as antioxidants agents, antitumor, antimicrobials and even inhibit activity of some molecules like the PLA₂. Recently studies also show that the flavonoids may act in DNA molecules. The antimicrobial activity of flavonoids is the result of destructuring cell membrane and consequently the bacterial cell destruction.

In this work we evaluated the antimicrobials effects of quercetin and rutin, which are commonly employed as phytotherapeutic drugs. It was observed that both flavonoids inhibited the growth of phytopathogenics bacteria. However no effect was observed in other pathogenic bacteria strains.

The results of scanning electronic and transmission microscopy showed significant changes in cellular structure of *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* incubated with rutin and quercetin. Both rutin as quercetin were able to promote structural change in the molecule of cDNA as observed in the results of HPLC. The rutin induced mild changes in protein DNA polymerase. Quercetin prevented the synthesis of cDNA from RNA as showed by electrophoresis results.

These data suggest that inhibition of growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* may involve the action of flavonoids (quercetin and rutin) on bacterial DNA, changing its structural properties and consequently the bacterial replication. And yet, the data show that the presence of rutinose may influence the form of action of these flavonoids.

1. Introdução

1.1. Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de compostos naturais amplamente distribuídos nos vegetais, são compostos polifenólicos oriundos de seu metabolismo secundário. Podem ser encontrados em todas as partes da anatomia da planta como frutos, flores, folhas e raízes. Desta maneira, representam um constituinte muito freqüente na dieta humana. São encontrados ainda em bebidas como vinhos, chás, cafés, cervejas e em alimentos como chocolates (Havsteen, 1983). Estima-se que a ingestão diária varie entre 23 mg a 1 g de flavonóides (Peterson & Drwyer, 1998).

1.1.1. Estrutura dos flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos sintetizados a partir da via do fenilpropano, que após vários processos metabólicos, formam um esqueleto carbônico de 15 átomos, numa estrutura classificada como benzo- γ -pirona (Di Carlo *et al.*, 1999). Este esqueleto carbônico é organizado em três anéis, sendo dois aromáticos (denominados A e B) e; entre ambos, o ciclo do anel C que é formado com três carbonos, como mostra a figura 1.

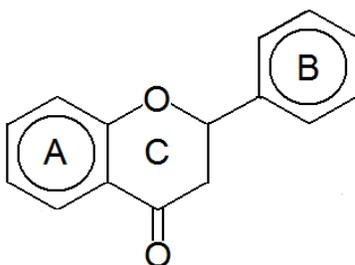


Figura 1 – Estrutura básica de um flavonóide.

Além destas características principais, existem outras particularidades relacionadas à estrutura química, responsáveis pela determinação da atividade antioxidante: (i) a configuração 3',4'-dihidroxil catecol no anel B, geralmente resultando na estabilização de radicais fenóis, (ii) a 2,3-dupla ligação na junção com o grupo 4-carbonil no anel C, que promove a deslocação de elétrons de radicais fenólicos do anel B para o anel C; (iii) o grupo 3-hidroxil com a combinação da 2,3-dupla ligação, que aumenta a estabilidade da ressonância para a deslocação do elétron pela molécula (Bors *et al.*, 1990).

1.1.2. Principais classes de flavonóides

Os flavonóides podem ser divididos em várias outras classes de acordo com sua estrutura molecular. Os quatro principais grupos são os das flavonas, flavononas, catequinas e antocianinas. As flavonas são caracterizadas pela sua estrutura planar devido à presença de uma dupla ligação em seu anel aromático central. Os exemplos mais conhecidos de flavonas são a rutina e quercetina, que são abundantemente encontradas em cebolas e maçãs. As flavanonas são amplamente encontradas em frutos cítricos e um exemplo bem comum deste grupo trata-se de naringina. Flavononas podem sofrer uma série de transformações afetando o anel C heterocíclico, dando origem a outros membros da família dos flavonóides, incluindo antocianinas e catequinas (Cao *et al.*, 1997). As catequinas, por sua vez, são um grupo comumente encontrado nos chás verdes, chás pretos e vinhos. Já as antocianinas são encontradas em uvas, vinhos e alguns tipos de chás.

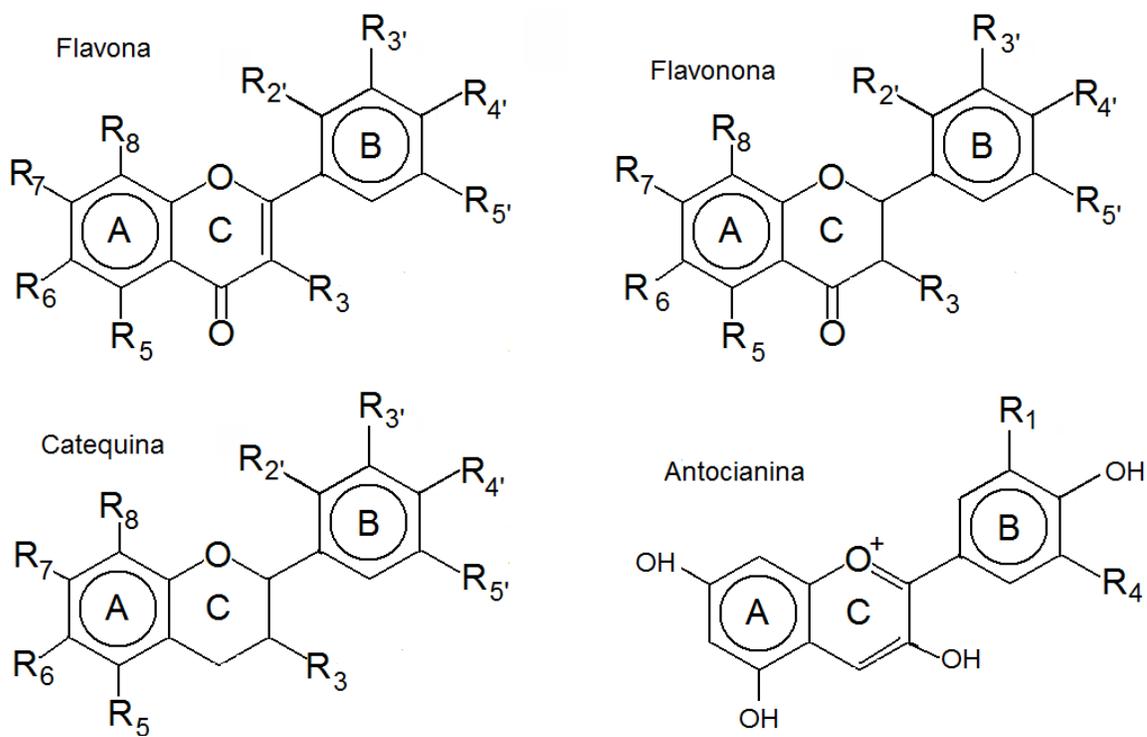


Figura 2 – Classes de flavonóides

Um importante efeito dos flavonóides é seu efeito antioxidante de espécies reativas de oxigênio (Afanas'ev *et al.*, 1989; Morel *et al.*, 1993).

Uma das propriedades estruturais que influenciam a atividade antioxidante dos flavonóides é a presença de radicais hidroxilas e sua posição ao longo dos seus três anéis fenólicos. As flavonas juntamente com as catequinas são os flavonóides que apresentam maior capacidade antioxidante e são bem caracterizados como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio. Observou-se que flavonas com a adição de uma hidroxila na posição 5 não apresentam atividade antioxidante, e com este na posição 6, tornam-se potentes agentes antioxidantes (Cao *et al.*, 1997).

Apesar de serem conhecidos como compostos antioxidantes, alguns estudos mostraram que os flavonóides podem também, em condições experimentais, mostrar um significativo efeito pró-

oxidante. Cao *et al.* (1997) observaram que alguns flavonóides apresentam atividade antioxidante contra determinados tipos de radicais livres, mas outros podem se comportar como pró-oxidantes na presença de um metal como cobre e ferro, contribuindo significativamente para a produção de espécies reativas de oxigênio. Esta propriedade pró-oxidante dos flavonóides depende não só da presença de metais, mas também da estrutura molecular do flavonóide (Yen *et al.*, 2003) e estes fatores podem influenciar fortemente a atividade farmacológica do flavonóide. Maridonneau-Parini *et al.* (1986), reportaram que o comportamento de antioxidante ou pró-oxidante de um flavonóide é dose-dependente. Os flavonóides também apresentam atividade pró-oxidante que pode acelerar principalmente danos à membrana lipídica, mas também podem induzir danos a outras moléculas como o DNA, proteínas e carboidratos (Yen *et al.*, 2003).

Contudo o mecanismo deste poder antioxidante ainda não é totalmente compreendido (Halliwell, 1996). Além disso, os flavonóides em experimentos *in vitro* mostraram atividades antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais e ainda propriedades anticarcinogênicas (Middleton & Drzewiecki, 1984).

1.1.3. Atividades biológicas dos flavonóides

Além dos efeitos antioxidantes e pro-oxidantes, os flavonóides podem apresentar outras aplicações terapêuticas, tais como:

Efeito antiesclerótico – alguns flavonóides podem seqüestrar espécies reativas de oxigênios, que são capazes de oxidar o LDL e danificar parte do endotélio, impedindo, desta forma este processo (Hertog *et al.* 1995 e Hertog *et al.* 1993)

Efeito antiinflamatório – As PLA2 ciclooxigenadas e lipooxigenadas desempenham um papel importante no processo inflamatório, que envolvem a produção do ácido araquidônico. Alguns flavonóides tem sido descritos como compostos com alto poder antiinflamatório (Kim *et al.*, 1998 e Damas *et al.*, 1985). Recentemente, a morina também foi capaz de inibir PLA2 de *Crotalus durissus cascavella* (Iglesias *et al.*, 2005). Contudo, o mecanismo de ação destes compostos ainda não é totalmente esclarecido.

Efeito antitumoral – Dentre as possíveis aplicações terapêuticas, a atividade antitumoral é a mais controversa. Esta atividade dos flavonóides já é descrita para a fisetina, apigenina e luteolina, que são conhecidas pela sua forte atividade antiploriferativa (Fotsis *et al.*, 1997). Estudos clínicos sugerem uma relação inversa entre a ingestão de flavonóides com o aumento do câncer de pulmão (Knekt *et al.*, 1997). Os mecanismos de ação dos flavonóides como agentes antitumorais, apesar de controversos, parecem envolver a inibição de proteínas quinases (Oikawa *et al.*, 1992).

Efeito antitrombogênico – A agregação plaquetária pode ser induzida por vários mecanismos que envolvem a ação de ciclooxigenases e lipooxigenases, desta forma, o mecanismo antitrombogênico do flavonóides parecem estar relacionados com a inibição de COX e LTH (Alcaraz e Ferrandíz,

1987). Estudos também tem mostrado que os flavonóides podem inibir a produção de prostaglandinas e óxido nítrico (Gryglewski *et al.*, 1987).

Efeito antiviral – O efeito dos flavonóides sobre os vírus foi inicialmente observado por Cutting *et al.* (1949). A ação dos flavonóides nos diferentes estágios de replicação viral foi discutida por Bae *et al.* (2000). Devido ao crescimento do número de casos de HIV, os estudos com os flavonóides foram intensificados e se concentraram em sua ação sobre a transcriptase reversa (Ng *et al.*, 1997).

Efeito antimicrobiano – Os flavonóides tem sido identificados e caracterizados como agentes antifúngicos, antivirais e antibacterianos, e estudos também mostram que existe um sinergismo entre estes diferentes compostos. Dados sobre a atividade antibacteriana dos flavonóides, contudo, mostram-se conflitantes, provavelmente, devido aos diferentes métodos utilizados para a caracterização como agentes antibacterianos. Estudos correlacionando a atividade antibacteriana com a estrutura molecular dos flavonóides em seu nível estrutural tem mostrado que estes compostos podem ser candidatos potenciais contra o crescimento bacteriano, como mostra o estudo realizado por Taguri *et al.* (2004). Alguns trabalhos mostram que a sua ação dá-se principalmente através de sua capacidade de interação com a membrana plasmática, inibindo sua função, e conseqüentemente levando a destruição da integridade celular. Por outro lado, alguns flavonóides podem inibir a atividade de DNA girase, e outros podem inibir o metabolismo energético bacteriano (Cushnie & Lamb, 2006).

Apesar do amplo espectro de mecanismos envolvendo a atividade antibacteriana dos flavonóides, estes tem sido empregados experimentalmente em conjunto com alguns antibióticos conhecidos. Os resultados mostram que o potencial antibacteriano destes antibióticos foi potencializado, como é o caso da amoxicilina, clavulina e ampicilina. Os flavonóides possuem baixa toxicidade e a sua combinação com

antibióticos convencionais pode ser uma nova estratégia para o desenvolvimento de terapias contra bactérias (Lin *et al.*, 2005).

1.2. Quercetina e Rutina

Estudos realizados em *in vitro* mostram que a rutina e a quercetina podem afetar a biossíntese de eicosanóides, oxidação lipídica, podem prevenir a agregação plaquetária, relaxamento da musculatura cardiovascular além de serem caracterizados com moléculas antioxidantes (Formica e Regelson, 1995).

A quercetina, flavonóide que possui 5 hidroxilas, está agrupada entre os flavonóides antioxidantes mais eficientes (Cao *et al.*, 1997); é o flavonóide predominante na dieta humana e estima-se que a ingestão diária varie entre 4 e 68 mg (Skibola & Smith, 2000). Pode ser encontrada em cebolas, maçãs, vinhos e chás (Croft, 1998). Além de sua capacidade antioxidante, a quercetina também apresenta propriedade antiviral, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicrobiótica (Kawaii *et al.*, 1999).

A alta atividade antioxidante da quercetina se deve a habilidade de impedir os processos radiculares nas células através de 3 mecanismos:

- Pela ação seqüestradora de O_2^- (Hu *et al.* 1995)
- Pela reação com radicais peroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica (Jovanovic *et al.*, 1994)
- Pela ação quelante de ferro diminuindo a formação de OH^- (Morel *et al.*, 1994)

A estrutura química da quercetina prediz a sua atividade antioxidante. Ela possui os 3 grupos estruturais determinantes para a sua atividade antioxidante e/ou sequestradora de radicais livres (Metodiewa *et al.*, 1999). Na figura 2a mostramos a estrutura molecular da quercetina.

Alguns trabalhos descrevem a capacidade da quercetina de doar átomo de hidrogênio para os radicais hidroxil, superóxido, peroxil e alcoxil (Rice-Evans *et al.*, 1996; Saija *et al.*, 1995).

Outro flavonóide importante é a rutina, que difere da quercetina por possuir uma molécula de açúcar (rutinose) na posição 3 do anel C que por esse motivo recebe algumas vezes o nome de rutinosídeo da quercetina (Grinberg *et al.*, 1994). A presença da rutinose confere a molécula uma característica hidrofílica atrapalhando assim a sua interação com as membranas celulares (Ferrali *et al.*, 1997). A sua atividade antioxidante se deve ao fato de poder atuar como sequestradora de O^{2-} e quelante de ferro (Grinberg *et al.*, 1994). Na figura 2b, mostramos a estrutura molecular da rutina.

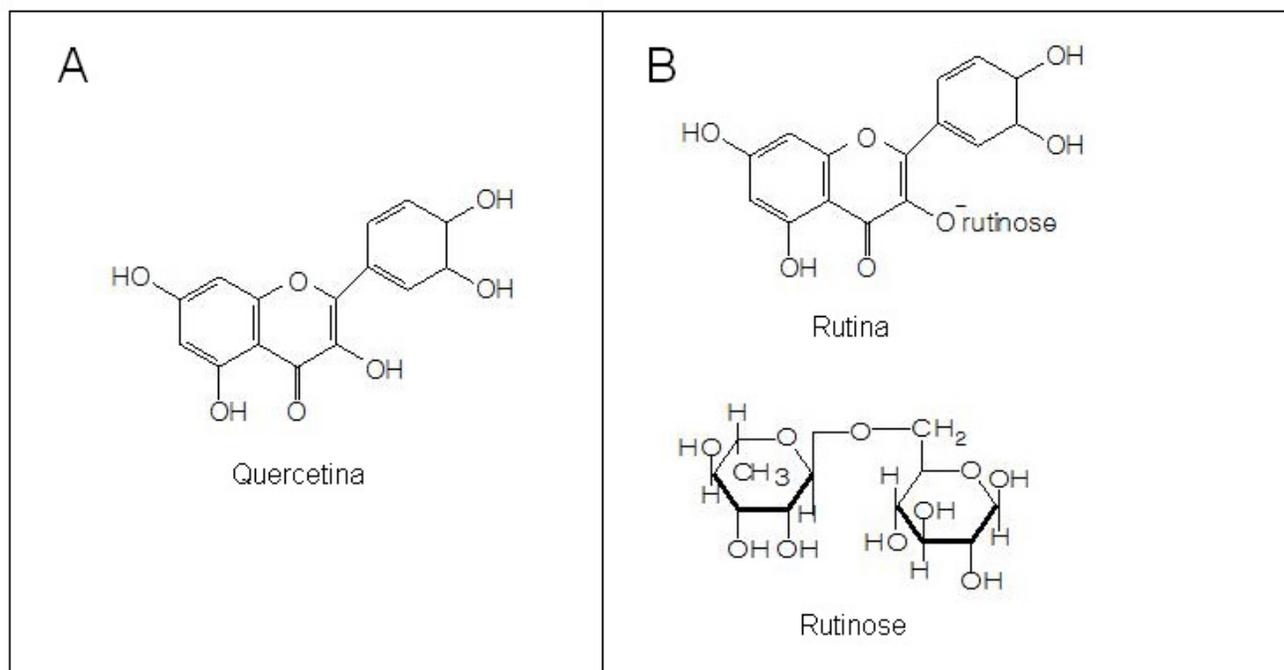


Figura 3 – Estrutura molecular de quercetina (A) e de sua forma glicosilada, a rutina (B).

2. Justificativas

A mancha oleosa é atualmente um dos principais problemas fitossanitários da cultura do maracujazeiro (*Passiflora* spp.), ocasionando, entre outros danos, a redução do período de exploração comercial desta cultura (Malavolta Jr., 1998), sendo o agente causal uma bactéria Gram-negativa denominada de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* conforme Gonçalves & Rosato (2000). As frutas do maracujá que apresentam infestação por *X. axonopodis* podem apresentar deterioração do mesocarpo, caracterizada por podridão mole, com anasarca, descoloração e conseqüentemente separação da casca com aparecimento ou não de cavidades (Malavolta Jr *et al.*, 2001). As lesões provocadas por bactérias do gênero das *Xanthomonas* nas folhas do maracujazeiro podem se estender pelo sistema vascular até os pecíolos e ramos. As folhas afetadas sofrem queda prematura e os ramos secam, podendo matar a planta (Pereira, 1968). De 1990 a 2000, a produtividade média do maracujá azedo no Brasil diminuiu, passando de 12,5 t/ha para 9,9 t/ha, ou seja, uma redução de 21% devido a problemas que relacionados a bacteriose do maracujazeiro ocasionada por *X. a.* pv. *passiflorae* (Frutiséries, 2002).

C. m. m. é um patógeno do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) que causa o cancro (Davis *et al.*, 1984 e Rothwell, 1968). Esta bactéria invade a planta através de ferimentos, alcançando o xilema, gerando uma infecção sistêmica. O enfraquecimento que é gerado no vegetal pode ser explicado pela produção de exoenzimas por *C. m. m.* que atacam os vasos do xilema e células do parênquima adjacente (Benhamou, 1991 e Wallis, 1997). *C. m. m.* está distribuída por todo o globo causando sérias perdas em culturas de tomate tanto em estufas quanto em campo aberto, exterminando espécimes jovens ou desfigurando seus frutos, e no Brasil, essa bactéria também é responsável por doenças causadas em tomateiros e pimentão (Rat *et al.*, 1991; IMI, 1996)

A necessidade de um estudo como este se dá principalmente por ter sido observado um aumento considerável dos perfis de resistência de bactérias que apresentem qualquer tipo de interesse médico como as utilizadas neste trabalho, onde podemos destacar *Staphylococcus aureus*, a qual, desde o advento de tratamentos com antibióticos, tem desenvolvido resistência para virtualmente todos os agentes antimicrobianos utilizados (Hardy *et al.*, 2004).

Os flavonóides possuem uma ampla gama de atividades biológicas incluindo sua potencial atividade terapêutica, que, mesmo controversa, depende do tipo e da estrutura do flavonóide. Desta forma, no atual contexto, a atividade antibacteriana é um caráter multifatorial. Alguns flavonóides são empregados atualmente como fitoterápicos e suplementos alimentares, como é o caso da quercetina e rutina.

3. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos antibacterianos de rutina e quercetina *in vitro* através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão para obtenção de informações relevantes a parede e membrana celular; além de utilização de cromatografia líquida de alta pressão, mapeamento de perfil multiespectral UV-visível, eletroforese e dicroísmo circular para avaliar os efeitos que os flavonóides podem provocar na estrutura do cDNA e em enzimas relacionadas a replicação do material genético.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais e linhagens bacterianas

Os flavonóides utilizados neste estudo foram de grau ACS obtidos da Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados para o preparo de soluções foram de grau ACS ou HPLC da Sigma-Aldrich, BioRad, GE Healthcare e Pharmacia.

As linhagens utilizadas no trabalho foram obtidas de coleções de departamentos e institutos como mostra a tabela II. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram selecionadas para se obter informações sobre os flavonóides e se seu efeito está associado a interações com a parede celular das bactérias. Foram selecionadas *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (ambas fitopatogênicas), *Salmonella enterica* Typhimurium (intestinal de animais), *Pseudomonas aeruginosa* (patogênica oportunista), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (ambas simbioses do ser humano).

Tabela I – Linhagens bacterianas.

Linhagens	Fonte
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> IBSBF 1445	Instituto Biológico de Campinas - IBSBF
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> IBSBF 1098	Instituto Biológico de Campinas - IBSBF
<i>Salmonella entérica</i> Typhimurium LT2	Departamento de Microbiologia - UNICAMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 399	Departamento de Microbiologia - UNICAMP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Departamento de Microbiologia - UNICAMP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Departamento de Microbiologia - UNICAMP

4.2. Atividade antibacteriana sobre o crescimento das linhagens

4.2.1. Atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

A metodologia para a avaliação da atividade antibacteriana para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* seguiu o protocolo realizado por Oliveira *et al.* (2002). As bactérias fitopatogênicas foram multiplicadas em meio nutriente Agar e incubadas a 28° C por 48 horas. Em seguida foram ressuspendidas em uma solução tampão de fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,4 contendo 1% de peptona e sua concentração foi ajustada ($A_{650\text{ nm}} = 0.3/\text{cc}$ 10^3 UFC/mL). Alíquotas de suspensão bacteriana foram diluídas a uma concentração de bactérias de 10^5 UFC/mL e incubadas com os flavonóides nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,12 μM durante um período de uma hora a 27° C. Após este tempo de incubação decorrido, 100 μL de cada tratamento foram espalhados em placas de petri contendo 20 mL de meio nutriente-ágar. Este experimento foi realizado com um número total de 12 repetições. As placas, assim preparadas, foram incubadas em condições de escuro a 28° C por 48 – 72 horas e analisadas posteriormente por contagem das UFCs.

4.2.2. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM) da quercetina e rutina em bactérias patogênicas

A avaliação da atividade antibacteriana contra *Salmonella enterica* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* seguiu a metodologia de determinação de CIM de acordo com o CLSI (2008).

As bactérias (*Salmonella enterica* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia*

coli e *Staphylococcus aureus*) que são mantidas em freezer a temperatura de -80 °C foram descongeladas, plaqueadas em meio de cultura Muller-Hinton Agar e deixadas crescer entre 18 a 24h a temperatura de 37 °C. Após a sua ativação, estas foram ressuspensas em 1 mL de salina e comparadas com a escala de Mac Farland até estimar uma concentração de 5×10^8 UFC/mL. Uma alíquota de 10 µL da suspensão bacteriana foi acrescentada em 990 µL de meio de cultura Muller-Hinton (Acumedia). O teste foi realizado em microplaca esterelizada com 96 poços. Cinquenta microlitros de meio de cultura Muller-Hinton Agar foram colocados em cada poço juntamente com a amostra (quercetina e rutina) previamente preparadas (filtradas em filtros de poros com 0,22 µm). Foi realizado o processo de microdiluição seriada em uma concentração inicial de 1000 á 15,625 µg/mL. Após a diluição seriada, foram acrescentados 50 µL da suspensão bacteriana em cada poço. As bactérias permaneceram incubadas a 37°C, deixando-as crescer de 18 – 24 h. Este experimento foi realizado em triplicata para cada linhagem bacteriana e seus tratamentos com rutina e quercetina. Ao término do período de incubação as placas foram analisadas por leitura em espectrofotômetro Spectra Max 340, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA, ajustado para um comprimento de onda de 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata. A CIM foi estimada pela absorbância, utilizando como parâmetro a leitura realizada do poço que continha apenas meio de cultura e bactéria (controle). A CIM foi considerada para o poço que apresentou um valor de leitura de absorbância abaixo de 20% em relação ao seu respectivo grupo controle.

4.3. Avaliação do efeito antibacteriano sobre parede e membrana celular

4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* incubada com flavonóides

Alíquotas de suspensão bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* contendo uma concentração de bactérias de 10^5 UFC/mL (semelhante ao item 4.2 deste trabalho) foram submetidas à análise em microscopia eletrônica de varredura após incubação com os flavonóides numa concentração sub-letal de $0,3 \mu\text{M}$ durante 1 hora. Essa ressuspensão foi centrifugada após este período de incubação para a obtenção de precipitado, o qual foi fixado em solução tampão de cacodilato de sódio $0,1 \text{ M}$ (pH 7,4) à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ contendo glutaraldeído $2,5\%$ (v/v) por 12 horas. Posteriormente, este precipitado foi fixado novamente, com tetróxido de ósmio 1% , por 2 horas à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e foi desidratado em concentrações crescentes de etanol ($70, 80, 90$ e 95%), sendo esta última fase repetida por mais uma vez). Os espécimes deste precipitado foram cobertos com ouro utilizando equipamento Sputter Coater BALZERS SCD 050 (Liechtenstein). Micrografias eletrônicas foram obtidas com a utilização de microscópio eletrônico de varredura JSM-5800LV-JEOL (Tokyo, Japan).

4.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* incubadas com flavonóides

Alíquotas de suspensão bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* contendo uma concentração de bactérias de 10^5 UFC/mL (semelhante ao item 4.2 deste trabalho) foram submetidas à análise em microscopia eletrônica de transmissão após incubação com os flavonóides numa concentração subletal de $0,3 \mu\text{M}$ durante 1 hora. Essa ressuspensão foi centrifugada após este período de incubação para a obtenção de precipitado, o qual foi fixado em solução fixadora (Glutaraldeído

2,5% v/v) e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, permanecendo nesta solução por 2 horas a 4 °C. Este precipitado (pellet) foi lavado 3 vezes com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4. Após esta lavagem, o pellet foi fixado com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas a 4 °C. Após esta segunda fixação, o material precipitado foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) (cada desidratação com duração de 30 minutos). Após a desidratação, o material foi processado para inclusão em resina Epon. Os blocos obtidos da inclusão em resina foram trimados, cortados num ultramicrotomo ULT (LEICA) e coletados em telas de cobre. Este material foi contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo de Reynolds 0,4%. As observações foram realizadas em microscópio LEO-906 (Germany).

4.4. Efeito sobre enzima de replicação celular

4.4.1. Caracterização das alterações estruturais da DNA polimerase de bacteriófago T4 pela presença de rutina

A fim de avaliar a ação dos flavonóides sobre a estrutura e ação de proteínas relacionadas com a replicação bacteriana, realizamos o teste de DC. Foram adquiridos da Sigma-Aldrich lotes de DNA-polimerase de bacteriófago T4, que foram agrupados em uma única solução e divididos em 3 alíquotas. Cada alíquota continha aproximadamente 0,3 mg/mL de proteína. Ao grupo controle foi adicionado 0,2 mL de salina 0,15 M; e aos tratamentos foram adicionados 0,2 mL de rutina 1 mM para o segundo grupo, e 0,2 mL de quercetina 1 mM ao terceiro grupo. As medições realizadas pelo dicroísmo circular foram realizadas com comprimento de onda de 190 – 280 nm.

4.5. Efeito de quercetina e rutina sobre o cDNA.

4.5.1. Isolamento de RNA total e Síntese de cDNA

Amostras de tecido hepático de camundongos foram congeladas em nitrogênio líquido, e maceradas com o auxílio de pilão e almofariz. O RNA total foi isolado deste preparo com a adição de Trizol (Sigma). O cDNA foi sintetizado utilizando-se o RNA total e oligo dT Iniciador para transcrição reversa.

4.5.2. Amplificação em PCR

Foi utilizado iniciador para amplificação do gene *rps-29* (sequência sense: TCTGAAGGCAAGATGGGTCACCA, antisense: TCTGAAGGCAAGATGGGTCACCA), uma proteína constitutiva continuamente expressa. O iniciador em questão foi selecionado para amplificar a sequência de cDNA com 200 pares de base. Foi adicionado a 25 µL de água estéril deionizada, 5 µL de cDNA, 5 µL de tampão PCR 10X (PCR), 1,5 µL de 25 mM de MgCl₂, 5 µL de dNTP mix 10 mM, 1µL de BSA (100 µg/mL), 2,5 µL de iniciador L1 10 µM, 2,5 µL de iniciador reverso L2 10 mM, e 2,5 µL de Taq polimerase (5 U/µL, Sigma, USA). Para cada tratamento foi adicionado 5 µL do flavonóide 250 µM. O PCR realizou 40 ciclos e seguiu o seguinte protocolo:

- pré-PCR: 95 °C por dois minutos;
- desnaturação: 94 °C por um minuto;
- anelamento: 45 °C por um minuto;
- extensão: 72 °C por dois minutos.

Foi realizado este protocolo para todos os grupos utilizados neste estudo, com a adição de um controle positivo (que continha cDNA) e um controle negativo (material sem cDNA). Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%. O material obtido por esta técnica teve por objetivo ser concentrado, buscando obter o máximo de cDNA, e por este motivo, não foi quantificado.

4.5.3. Eletroforese em gel de agarose 1,5%

Alíquotas de 4 μL dos produtos de PCR foram retiradas para a verificação do efeito dos flavonóides no cDNA. Esse material foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA. A corrida eletroforética foi realizada durante um tempo de 20 minutos à 100 V. O gel foi corado com 5 μL de brometo de etídio (10mg/mL). O grupo controle positivo foi composto por cDNA somente e o grupo controle negativo apresentava apenas solução. Os tratamentos apresentaram 5 μL de flavonóide na concentração de 250 μM e foram realizados em triplicata.

4.5.4. Cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa em coluna C-18.

Foi utilizado material de PCR (controle positivo, contendo apenas cDNA) para incubação com os flavonóides e também para o grupo controle. Na ausência de luz foram incubados, durante uma hora a temperatura de 27 °C, 20 μL de cDNA juntamente com 20 μL de quercetina e rutina, ambos flavonóides com concentrações de 250 μM e tiveram seu volume ajustado para 200 μL com solução tampão de bicarbonato de amônio 0,3 M. Este material foi submetido a HPLC de fase reversa em

coluna C-18. O sistema cromatográfico utilizado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 200 µL e uma coluna µ-microbopak C-18 0,78 X 30 cm, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5. A eluição das amostras foi realizada utilizando um gradiente linear com acetonitrila 66%. Todas as frações foram monitoradas a 260 nm.

4.5.5. Perfil Espectral Ultravioleta – visível.

Um grupo controle (cDNA) e seus tratamentos foram submetidos a um teste UV-visível a fim de mapear seu perfil espectral para obtenção de dados que mostrem alterações estruturais do material genético produzido pelos flavonóides. Para a realização deste teste foi utilizado o espectrofotômetro de wavescan Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences, Sweden). Como grupo controle foi utilizado 20 µL de cDNA produzido pelo PCR, e foi acrescido de 480 µL de água estéril, totalizando 0,5 mL de volume final. Para os tratamentos foram utilizados 20 µL de cDNA, que foi incubado juntamente com 20 µL de flavonóides (rutina e quercetina separadamente) na concentração de 250 µM durante 1 hora na ausência de luz. Este material de incubação teve seu volume ajustado para 0,5 mL com água estéril para a realização do teste. Toda a solução preparada (grupo controle e tratamentos), contendo 0,5 mL de volume final, foi monitorada em cubetas de vidro. O monitoramento foi realizado na faixa de frequência de 220 a 800 nm.

4.6. Análises estatísticas

Os resultados foram relatados de acordo com as médias aproximadas obtidas nos experimentos. A significância de diferença entre as médias foi estudada por análise de variância, seguido do teste de Dunnet (Jandel Scientific, 1994) que comparou diversos grupos experimentais com o grupo controle. O limite de confiança foi de 5%.

5. Resultados

5.1. Atividade antibacteriana

5.1.1. Atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

A atividade antibacteriana foi determinada pela contagem de UFC utilizando *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* como bactérias de teste. A figura 4 mostra o efeito inibitório da rutina e da quercetina em diferentes concentrações em *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Rutina numa concentração de 1 µM/mL não demonstrou diferença significativa em efeito antimicrobiano se comparado à quercetina. Esta a 1µM inibiu 64% das bactérias, como mostra a figura 4b. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* também foi incubada com os flavonóides, usando o processo semelhante ao estudo da atividade antibacteriana com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Na figura 5, para concentrações maiores, podemos observar que a quercetina (figura 5b) apresentou um efeito antimicrobiano mais poderoso do que a rutina (figura 5a); porém, o mesmo não foi observado para concentrações mais baixas. Os flavonóides mostraram-se de duas a três vezes mais eficazes contra a linhagem Gram-positiva comparada com a linhagem Gram-negativa (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*).

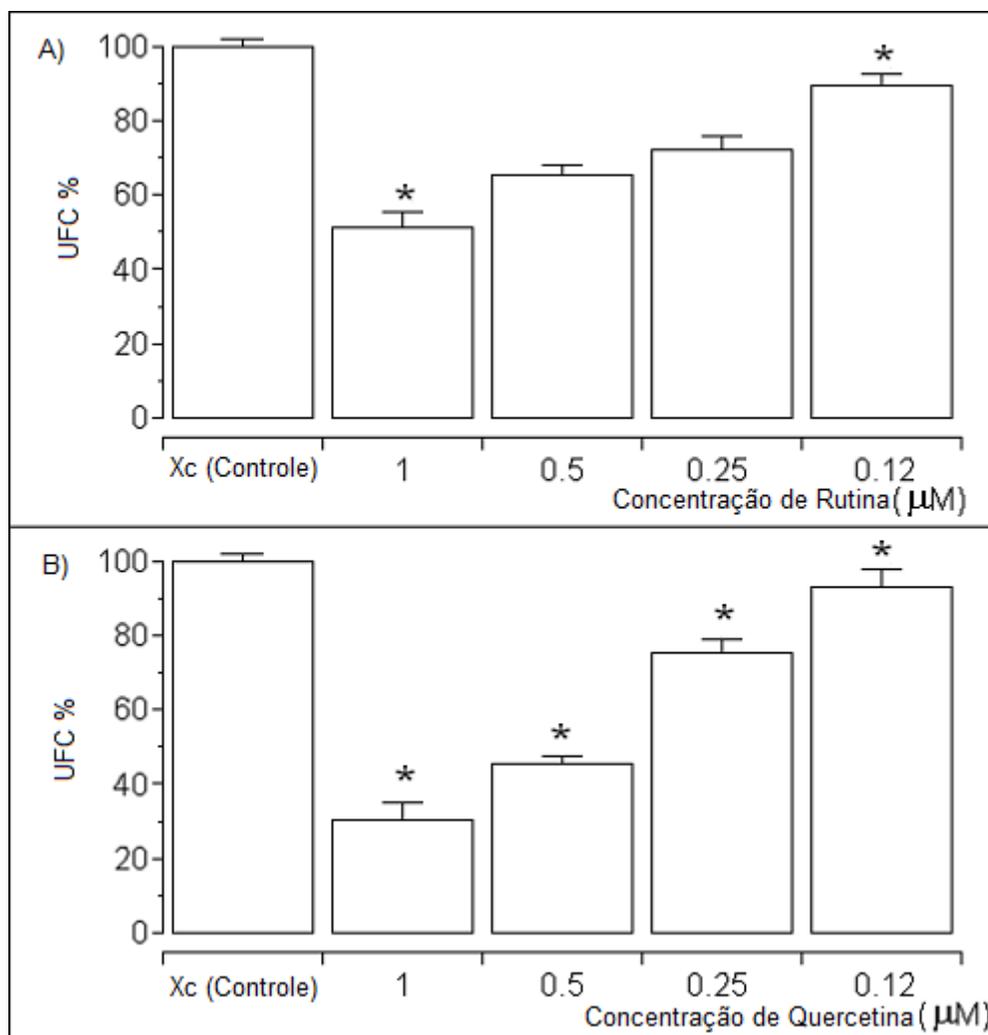


Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de rutina sobre o crescimento bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Em 4b está representado o efeito antimicrobiano da quercetina. Todos os experimentos foram conduzidos sobre as mesmas condições experimentais. Cada ponto representa média e desvio padrão de n=12 experimentos, e os * indicam $p < 0,05$ em relação ao controle.

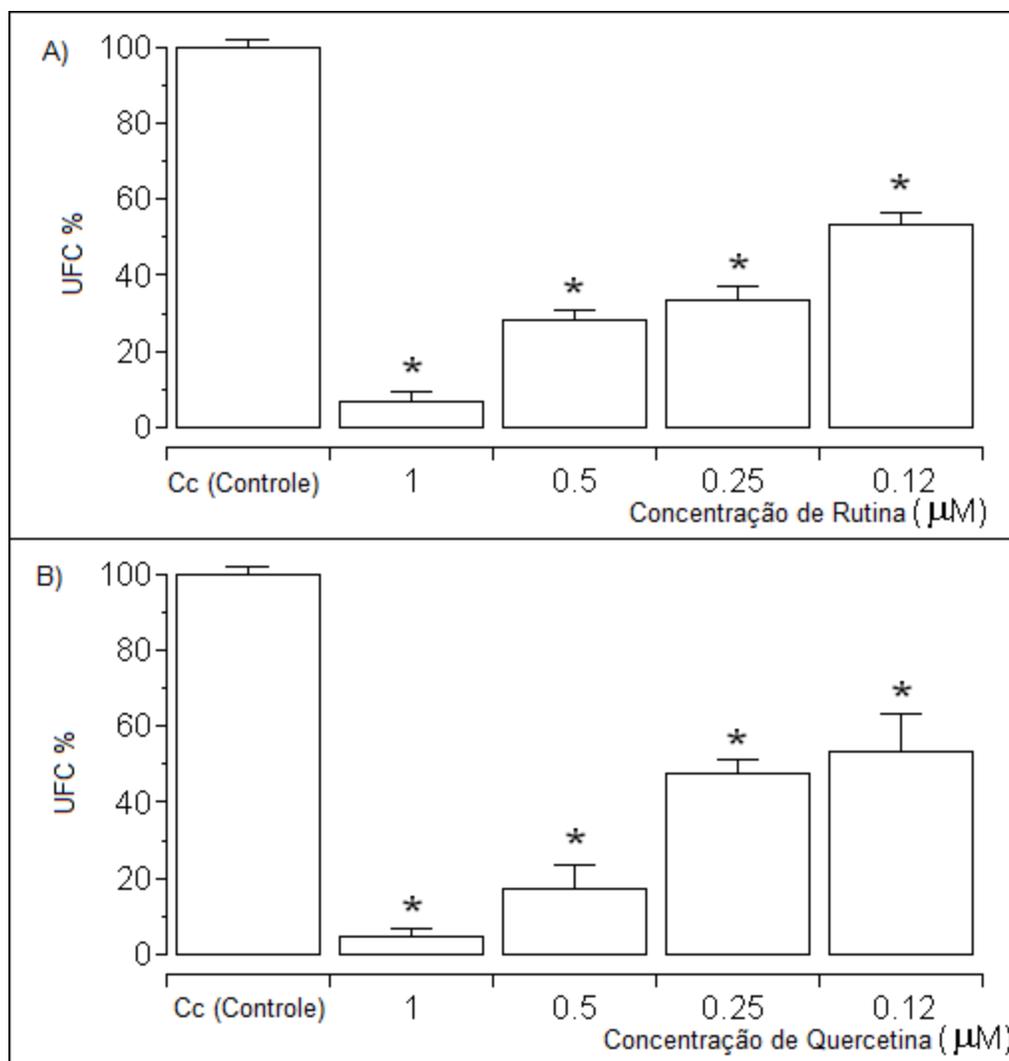


Figura 5 - Resultados do tratamento da rutina e quercetina em diferentes concentrações molares sobre o crescimento bacteriano de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. A atividade antimicrobiana foi expressa em porcentagem de UFC, sendo que cada ponto é a média e o desvio padrão de 12 experimentos (n=12), os * indicam $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em bactérias patogênicas.

Ambos os flavonóides (rutina e quercetina) não apresentam efeitos sobre bactérias patogênicas Gram-negativas ou Gram-positivas humanas nas concentrações utilizadas no presente estudo. Desta forma, não foi possível indicar uma concentração mínima a qual possa ter um efeito antimicrobiano (bactericida ou bacteriostático) sobre as linhagens selecionadas.

5.2. Avaliação do efeito antibacteriano sobre parede e membrana celular

5.2.1. Experimentos de microscopia eletrônica de varredura em *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

Utilizamos microscopia eletrônica de varredura e transmissão para analisar os efeitos da rutina e quercetina na morfologia da linhagem de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* incubada com uma dose subletal na concentração de 0,30 μM durante um período de 1 hora (tempo em que foi observado inibição em outros testes). Essa linhagem foi escolhida por apresentar uma menor atividade em relação à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e possibilitar observação de danos na parede celular, que, no outro caso não seria possível devido ao elevado grau de deterioração provocado pelos tratamentos. A exposição de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* aos flavonóides não causou modificações no formato da célula, como mostra a microscopia eletrônica de varredura. Bactérias não tratadas possuíam uma superfície irregular, alongada e brilhante, não apresentaram aparente lesão celular (figura 6a). Bactérias tratadas com rutina apresentaram superfície similar, forma e volume não apresentando significativa alteração em sua estrutura (figuras 6b), sendo que o mesmo ocorreu para quercetina (figura 6c). Desta forma, nas condições experimentais deste

trabalho, os dois flavonóides estudados não induzem sérios danos à membrana, superfície ou parede bacteriana.

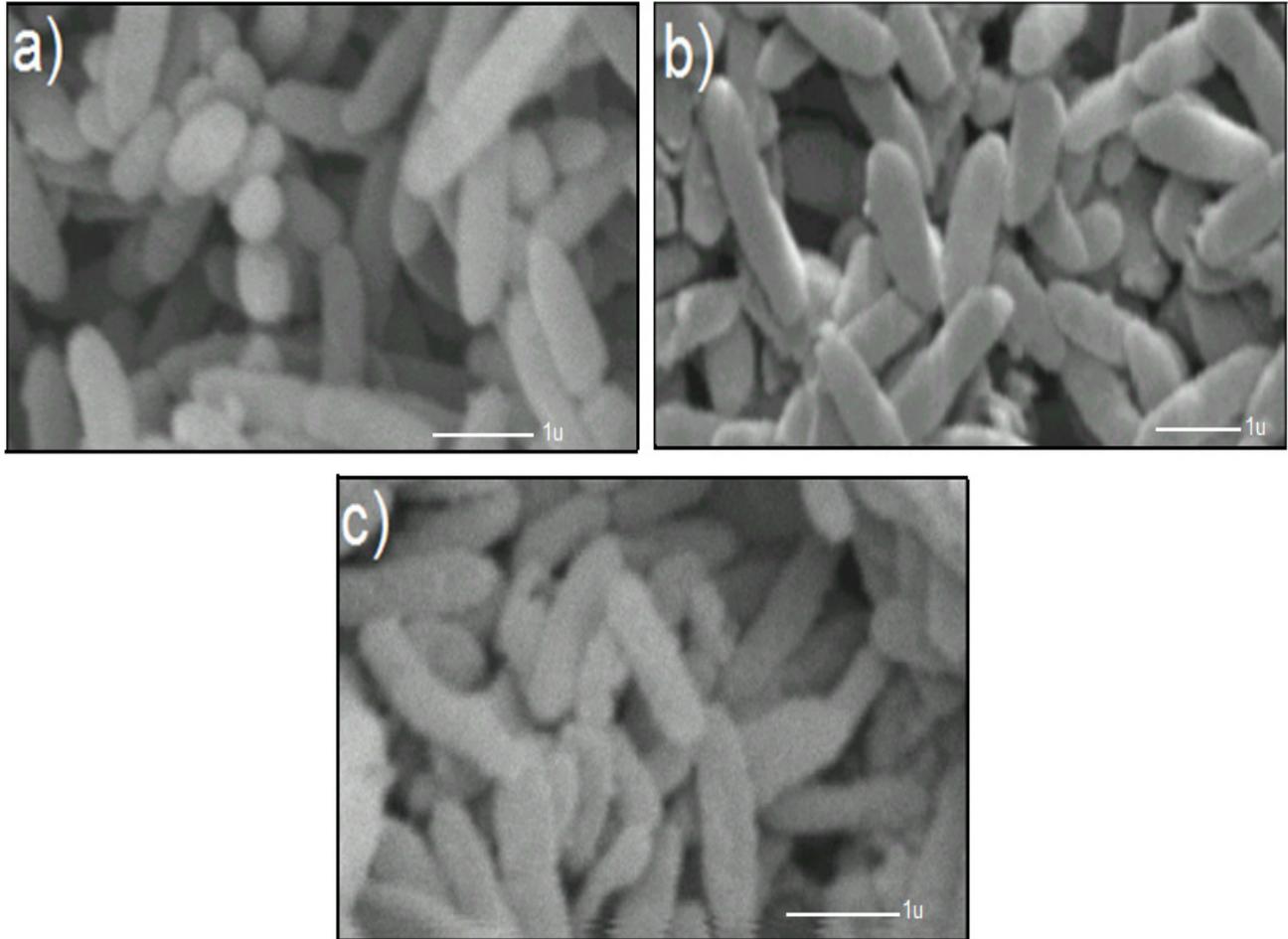


Figura 6 - Resultados de microscopia eletrônica de varredura realizada com *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* submetidas a três tratamentos experimentais, um com salina 0,15 M (grupo controle) mostrado na figura 6a, e outros dois com rutina 0,3 μM (figura 6b) e com quercetina 0,3 μM (figura 6c).

5.2.2. Experimentos de microscopia eletrônica de transmissão em *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada em secções de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* tratadas com rutina e quercetina na concentração de 0.3 μ M por 1 hora. Essa linhagem foi escolhida para a realização deste teste devido aos mesmos motivos apresentados no item anterior. Células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* não tratadas permaneceram intactas, representada por uma linha eletrodensa (figura 7a) e também não foi observado alterações significantes citoplasmáticas nos seus tratamentos com rutina (figura 7b) e quercetina (figura 7c), como formação de vesículas ou perda de conteúdo celular. Os grânulos que podemos observar nas figuras 7a, 7b e 7c são resultantes do processo de contrastação utilizando-se acetato de uranila e citrato de chumbo de Reynolds 0,4%.

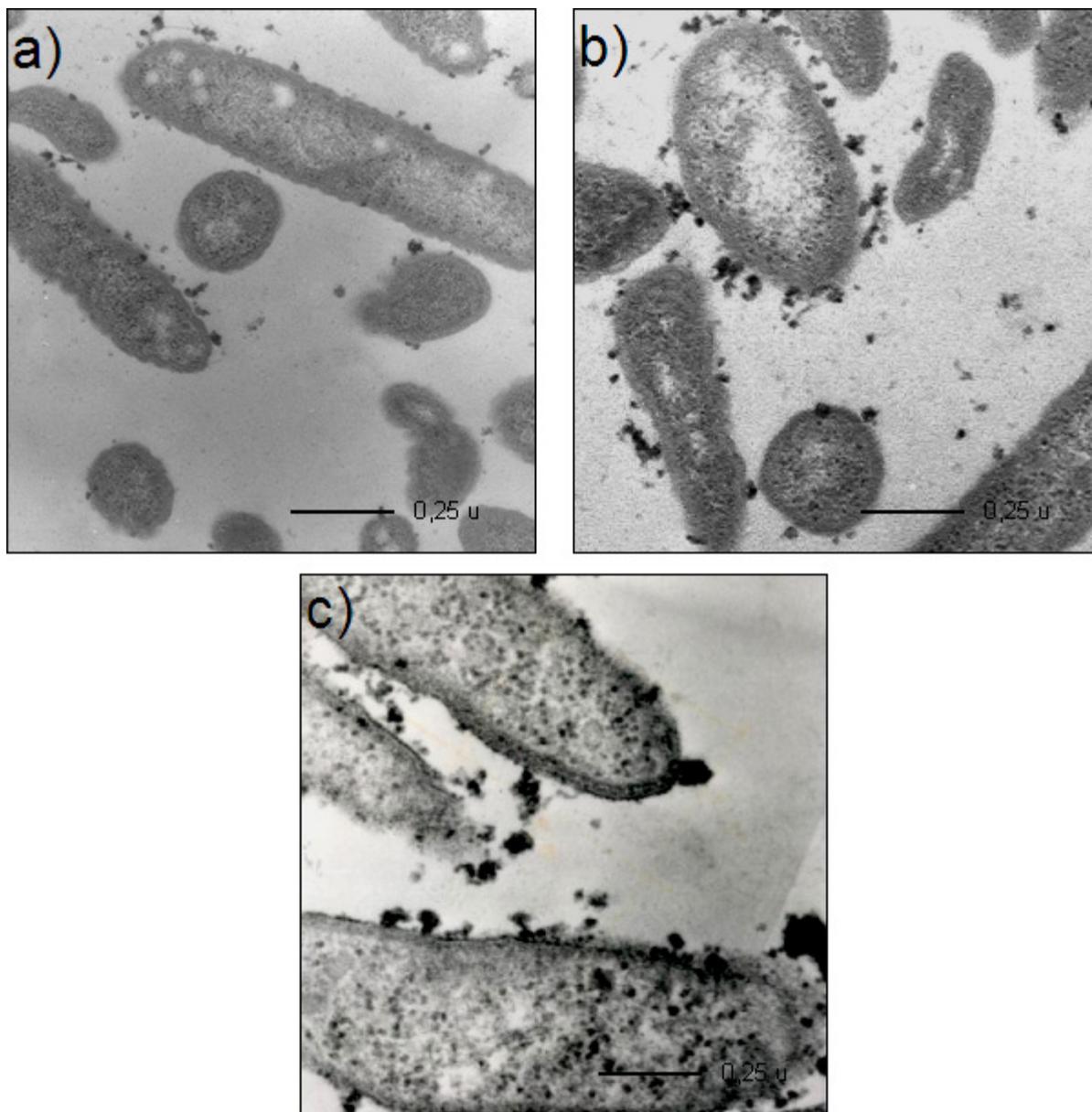


Figura 7 - Resultados de microscopia eletrônica de transmissão das amostras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* que foram perviamente tratadas com salina 0,15 M (grupo controle – figura 7a), rutina 0,3 μM (figura 7b) e com quercetina 0,3 μM (figura 7c).

Assim, apresentados os dados nestas condições de experimento, podemos verificar que em ambas as avaliações morfológicas (itens 5.2.1 e 5.2.2.) não foram observadas significantes alterações em estrutura interna ou externa das células, ou ainda ruptura celular (figura 6 e 7).

5.3. Efeito sobre enzima de replicação celular

5.3.1. Análise em Dicroísmo Circular de DNA polimerase de T4.

Amostras de DNA polimerase foram incubadas em presença de salina 0,15 M; rutina 1 mM e de quercetina 1 mM; depois repurificadas através de HPLC de fase reversa em coluna C-18, a fim de separar os todo material da proteína. Realizado este procedimento, a proteína livre de qualquer material foi liofilizada e estocada para as análises em DC. Os resultados estão expressos em comparação com o grupo de tratamento com salina 0,15 M (grupo controle). As amostras que foram previamente incubadas com quercetina 1 mM não foram capazes de induzir qualquer tipo de mudança estrutural da DNA polimerase e, desta forma não estão apresentados neste trabalho. Por sua vez, a amostra incubada com rutina 1 mM mostra alteração das estruturas em α -hélice e folhas- β (figura 8). Os resultados obtidos parecem sugerir que não houve desnaturação do enovelamento protéico da DNA polimerase, mas esta pode ter perdido seu efeito e atividade relacionada a duplicação do material genético, ou seja, a replicação do DNA.

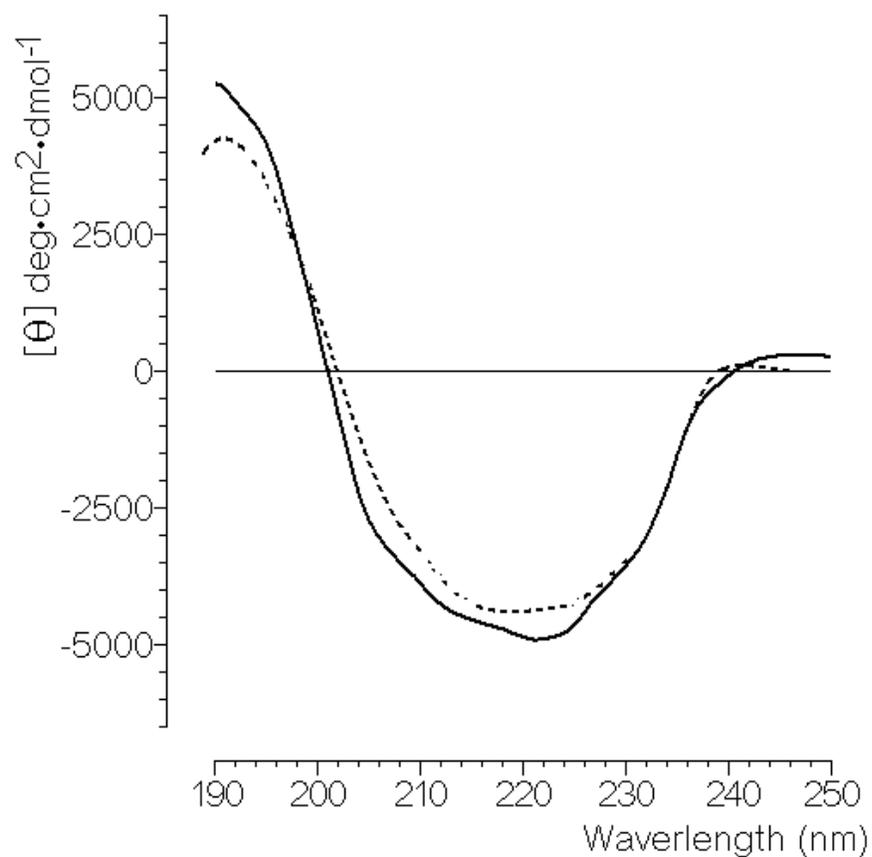


Figura 8 - Efeito da rutina sobre o enovelamento protéico de DNA polimerase de T4. A linha contínua representa a estrutura de DNA polimerase incubada com salina 0,15 M. Já a linha tracejada mostra o resultado de incubação da enzima polimerase com o seu tratamento com rutina 1 mM.

5.4. Efeitos de quercetina e rutina sobre cDNA

5.4.1. Eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Uma alíquota de 5 μ L foi retirado do material obtido pela técnica de PCR para a realização de eletroforese em gel de agarose 1,5%. O resultado observado demonstra que o tratamento com a quercetina não possibilitou a formação de cDNA enquanto o tratamento com rutina demonstrou não ter efeitos inibitórios para a sua formação como mostra a figura 9. Não foi utilizado padrão de peso molecular devido ao teste ser apenas qualitativo.

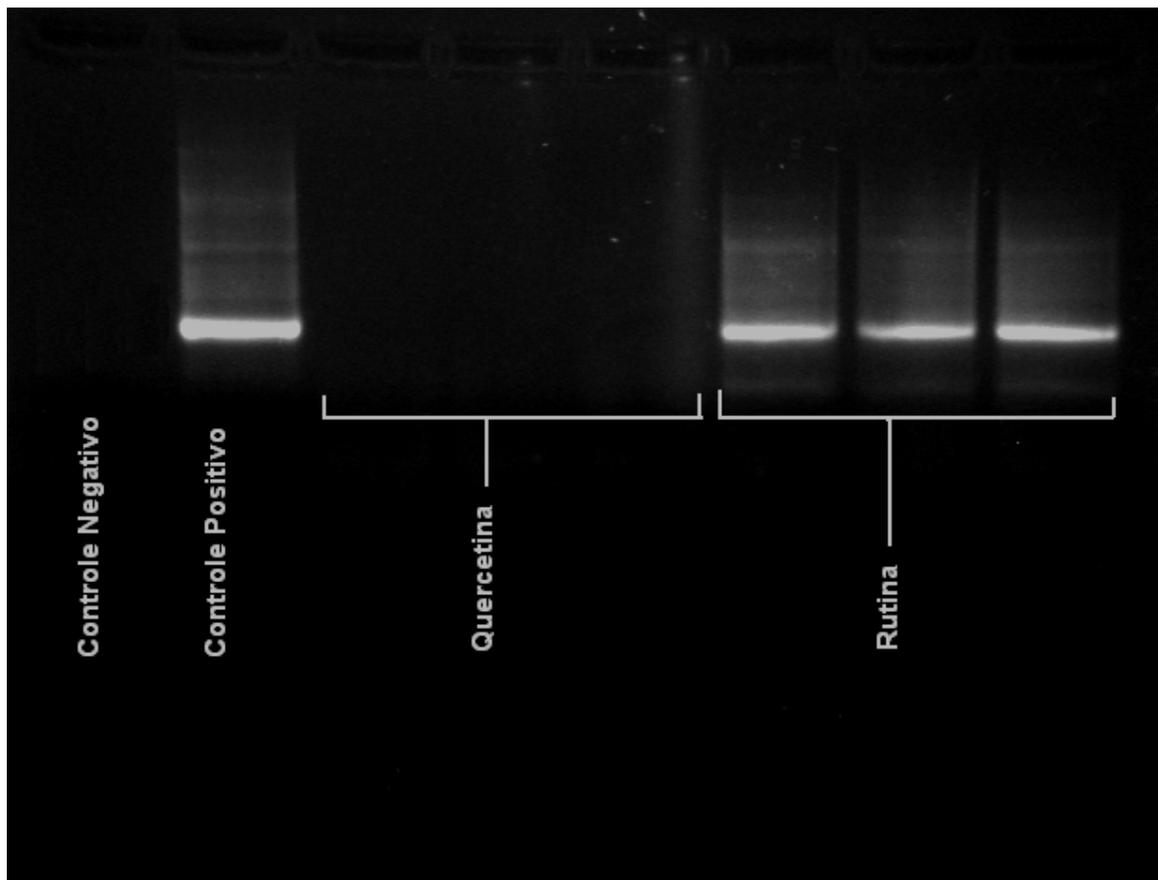


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose dos grupos controles (negativo e positivo) comparado com os tratamentos com quercetina e com rutina.

5.4.2. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de fase reversa em coluna C-18.

O cDNA após a incubação com os tratamentos foi submetido à cromatografia de alta pressão (HPLC) de fase reversa em coluna C-18. Os tratamentos (quercetina e rutina) apresentaram diferentes comportamentos em relação ao grupo controle constituído apenas por cDNA. Enquanto o grupo controle apresentou apenas único pico bem distinto que apareceu no perfil cromatográfico aos 37 minutos (figura 10), o grupo tratado com a rutina demonstrou um deslocamento para o maior pico e que foi seguido de um muito pequeno (figura 11), e o tratamento com a quercetina obteve um comportamento mais distinto dentre os grupos anteriores (figura 12). A quercetina apresentou um pico isolado logo no primeiro intervalo de 3-6 minutos, o qual veio seguido de vários picos bem próximos – o que pode ser indicação de uma possível quebra no material genético (cDNA) gerando pequenos fragmentos de tamanhos variáveis.

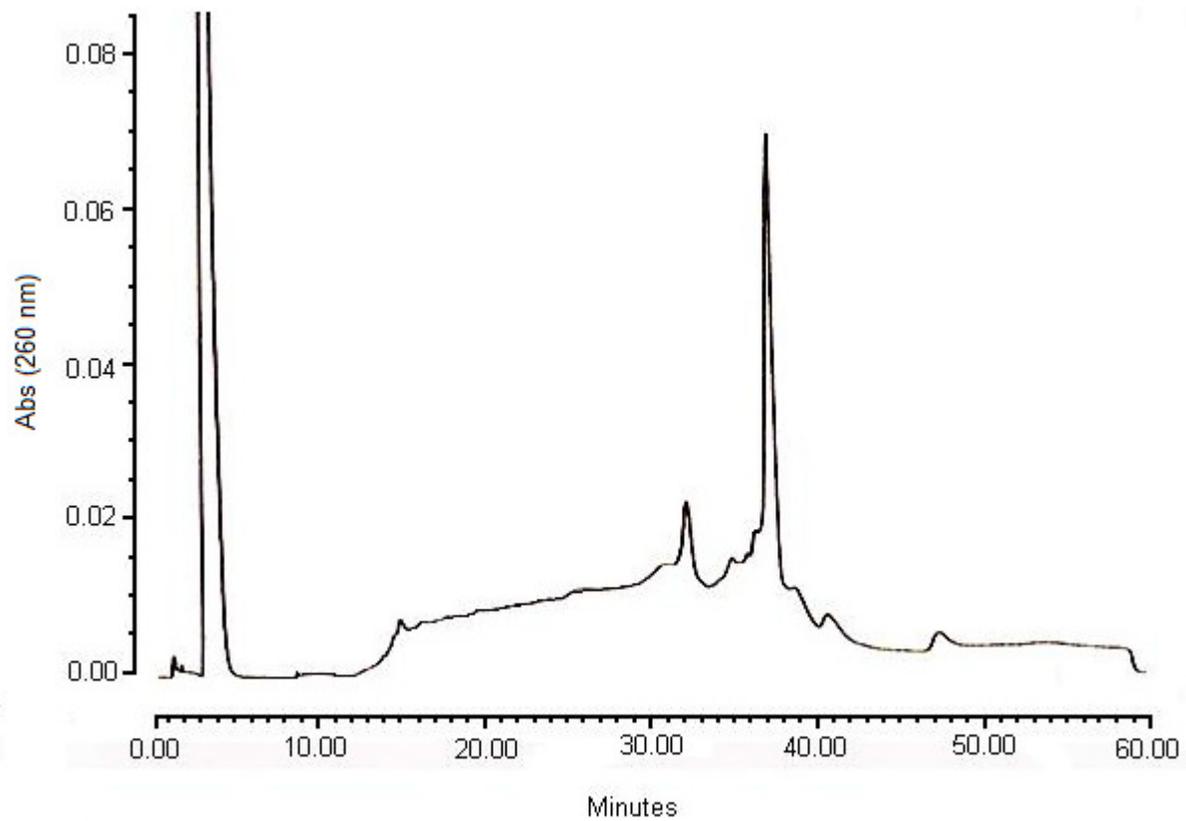


Figura 10 – Perfil cromatográfico de cDNA com 200 pares de base.

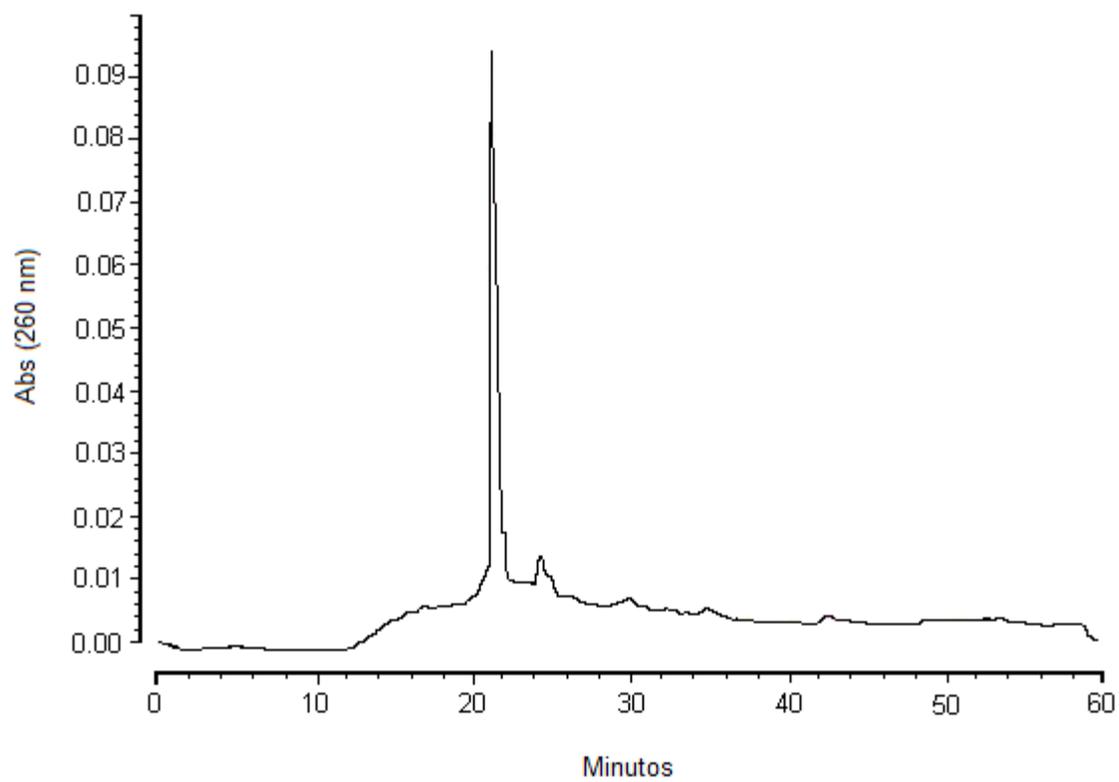


Figura 11 - Perfil cromatográfico do cDNA incubado com rutina.

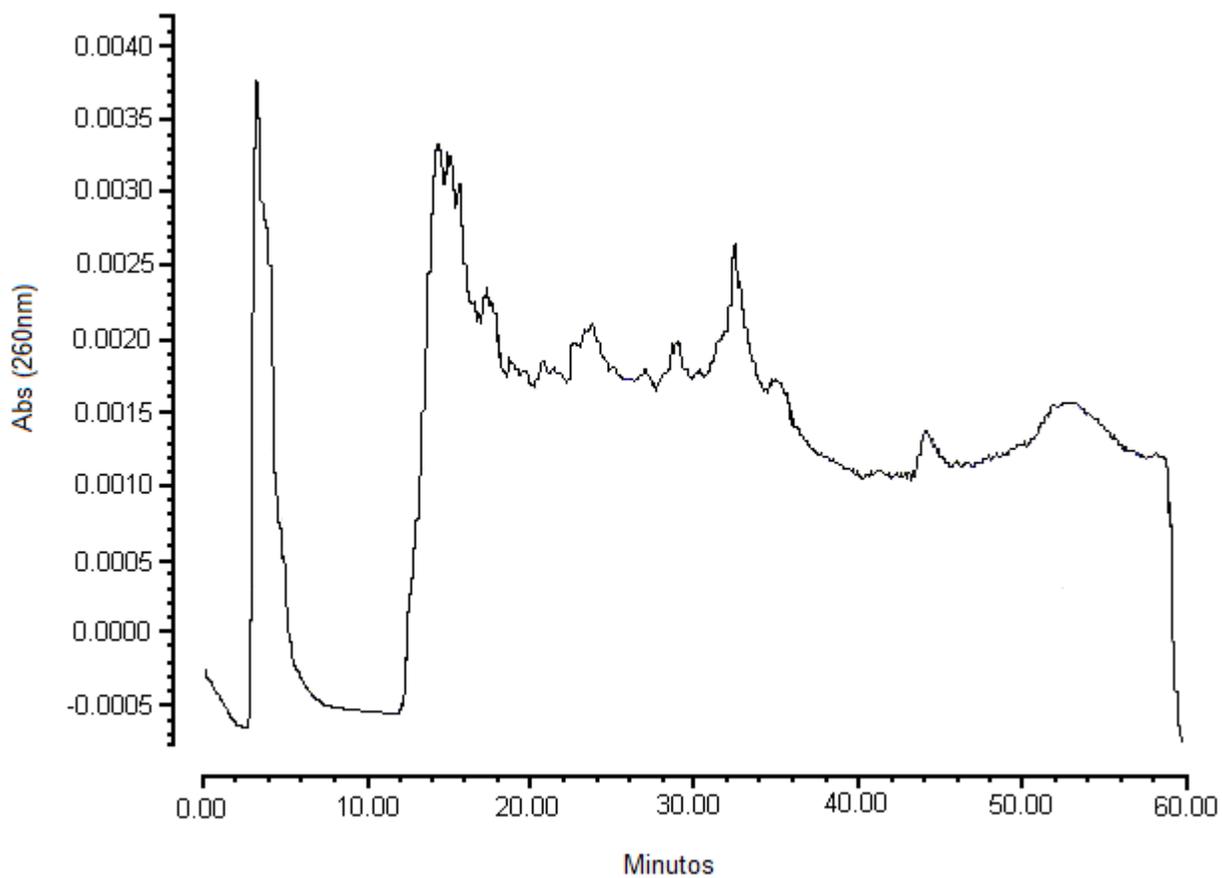


Figura 12 – Perfil cromatográfico do cDNA incubado com quercetina.

5.4.3. Perfil Espectral Ultravioleta-visível

O material genético após a incubação com os flavonóides foi submetido a análise em espectrofotômetro UV-visível a fim de visualizar possíveis interações dos tratamentos (quercetina e rutina) com o material genético. Foi verificado o perfil espectral do material genético (cDNA) e este foi comparado com os dos flavonóides e respectivos tratamentos.

O material incubado como a rutina apresentou um grande aumento na faixa dos 260 nm vindo seguido de um platô que pôde ser observado no intervalo de 300 – 380 nm. O material controle (cDNA) mostrou um comportamento semelhante, porém, mais abaixo do material incubado e caiu bruscamente até a faixa do 300 nm. O perfil da rutina mostrou estar bem abaixo dos outros perfis. Desta forma, não é possível afirmar que o tratamento com a rutina foi capaz de modificar a conformação da molécula de cDNA e seu perfil pode ser resultado da soma dos outros dois, e por isso obteve um perfil espectral mais elevado, juntando as características dos outros resultados (figura 13).

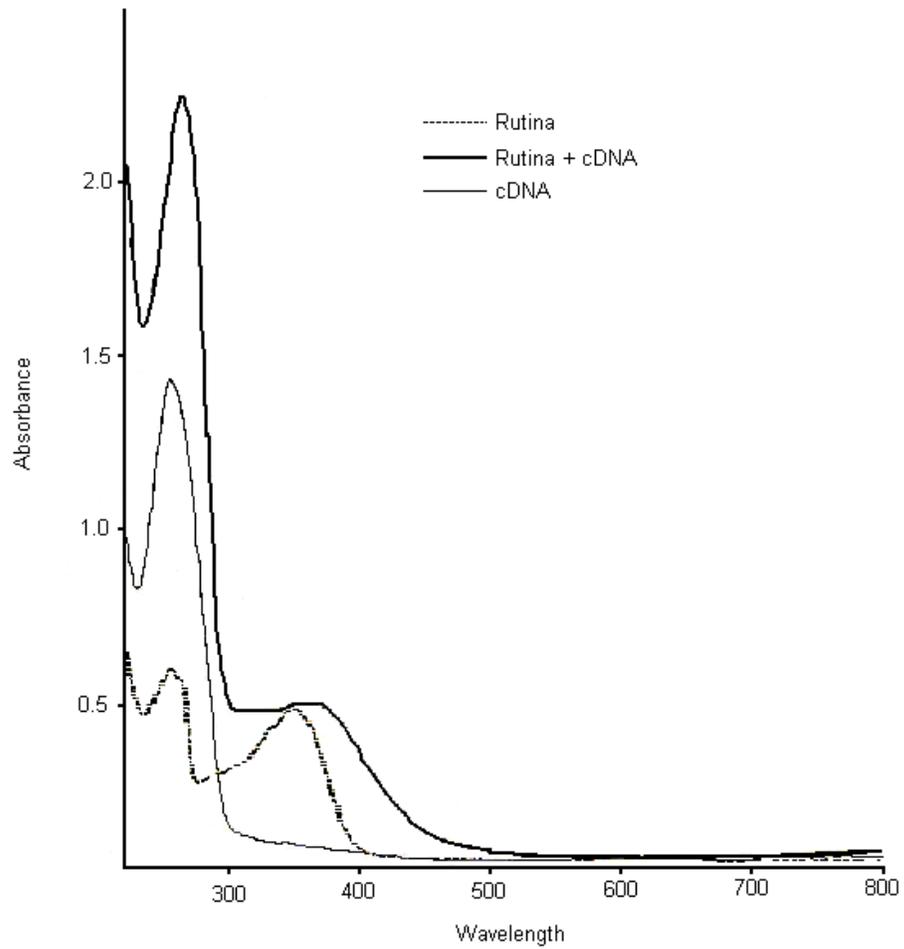


Figura 13 – Espectro de absorção Ultravioleta-visível comparando cDNA (controle) e cDNA incubado com Rutina.

A quercetina incubada com cDNA, diferentemente do comportamento que o tratamento da rutina obteve, pareceu apenas aumentar o perfil espectral do cDNA, não o diferenciando por acrescentar, retirar, ou modificar algum pico; mas sim, por dar-lhe uma característica de se apresentar mais elevado, que pode ser explicado pela fragmentação do material genético que foi observada em outros experimentos, aumentando apenas em número o cDNA. O perfil espectral da quercetina sozinha parece ser muito menor em relação aos outros dois.

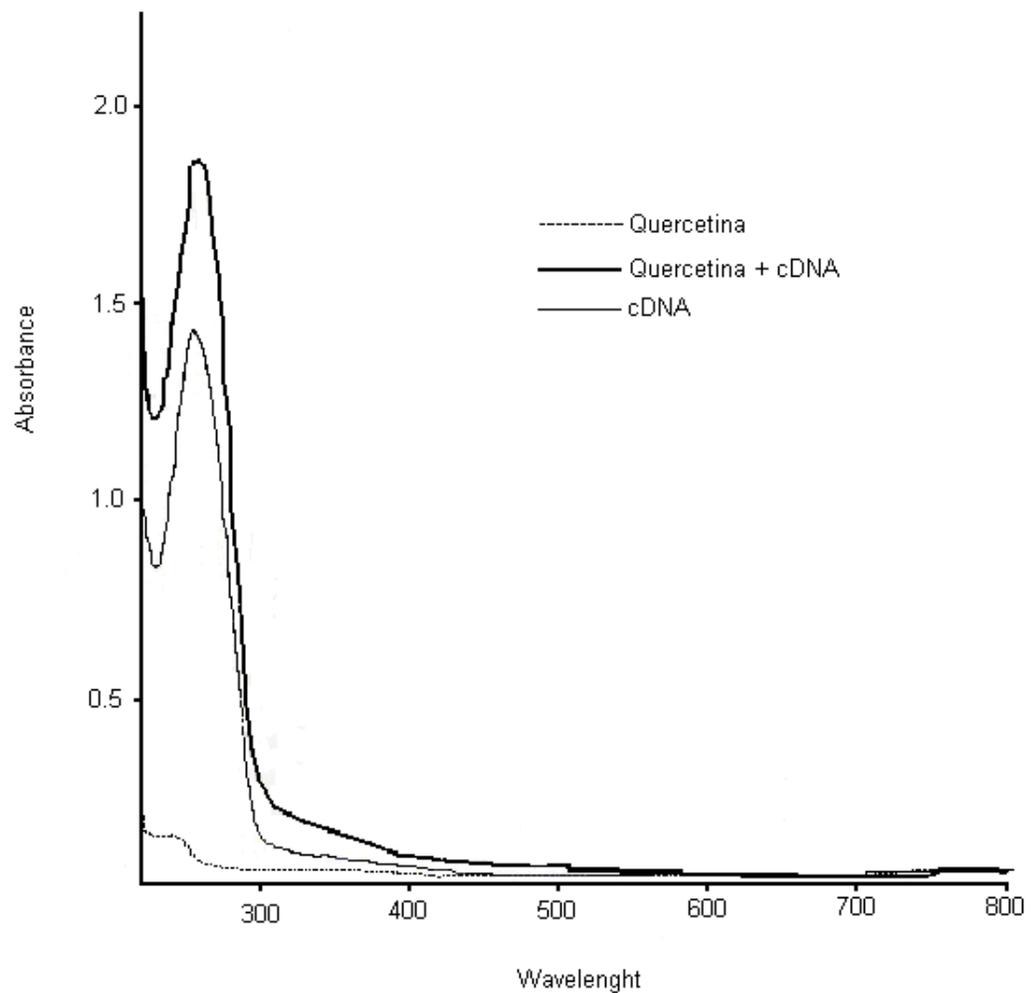


Figura 14 – Espectro de absorção Ultravioleta–visível comparando cDNA (controle) com cDNA incubado com Quercetina.

6. Discussão

Flavonóides são compostos fenólicos que juntamente com as flavonas e os flavonols tem um papel importante contra infecções no reino vegetal. Muitos estudos têm mostrado seus efeitos antimicrobianos contra uma grande gama de espécies de microorganismos “in vitro” (Dixon *et al.*, 1983). Seu efeito depende da capacidade que cada flavonóide possui de se complexar com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular bacteriana, provavelmente por aderir à parede celular, polipeptídeos e outras enzimas de membrana; e flavonóides que não possuem grupo hidroxil no anel B são mais efetivos contra os microrganismos do que os possuidores do grupo OH. Esses fatores sustentam a idéia de que o principal alvo de ação dos flavonóides seja a membrana plasmática (Tsuchiya *et al.*, 1996). Porém muitos autores encontraram um efeito oposto; isto é, maior hidroxilação provocou um aumento da atividade antimicrobiana contra linhagens de patógenos humanos ou animal (Sato *et al.*, 1996). Nossos resultados mostram que os flavonóides possuem uma grande atividade antimicrobiana contra bactérias fitopatogênicas (principalmente Gram-positivas), e sugerem que quercetina apresenta maior efeito contra os dois tipos de linhagens fitopatogênicas, como mostrado com os resultados obtidos. Porém não foram capazes de possuir atividade inibitória contra as bactérias patogênicas humanas. Uma evidência adicional é o fato que alguns flavonóides, como é o caso da rutina e quercetina, apresentam uma estrutura molecular muito próxima, diferenciando-se apenas pela presença do rutinosídeo, que é um resíduo de carboidrato ligado a estrutura da rutina, mas quando esta sofre desglicolização a rutina é convertida à quercetina. Esta, por sua vez, possui um caráter mais hidrofóbico do que a rutina (Silva *et al.*, 2004) e apresentou atividade inibitória na duplicação do DNA. Com os resultados obtidos em cromatografia de alta pressão podemos afirmar que a quercetina produziu uma grande quantidade de pequenos fragmentos de cDNA, estes, podem ser

observados através do perfil cromatográfico obtido, que apresentou vários picos de material em tempos diferentes. Estes dados sugerem que tais fragmentos apresentavam tamanhos variados com hidrofobicidade variada. A rotina não foi capaz de produzir o mesmo efeito no material genético como pode ser observado ainda na cromatografia de fase reversa, apenas deslocou o pico de saída do cDNA, o que deve indicar alguma mudança capaz de alterar sua hidrofobicidade.

Os perfis espectrais dos tratamentos sugerem que, no caso da rotina, apesar de apresentar certa mudança no comportamento do grupo tratado em relação ao grupo controle, tal mudança pôde ter sido provocada pela simples soma dos perfis, não sendo possível a confirmação de interação entre o cDNA e a rotina. Esta pode ter ocorrido, mas os dados não são comprobatórios. No caso da quercetina foi possível observar um aumento no perfil do grupo tratado em relação ao grupo controle (cDNA) não havendo, desta forma, alteração substancial.

Comparando os dados obtidos pela análise de comportamento espectral obtido através de espectrometria ultravioleta-visível com os apresentados pela cromatografia, podemos dizer que houve diferenças no efeito de ambos os flavonóides durante a atividade de inibição do crescimento fitobacteriano para ambas as linhagens.

Alguns estudos demonstram que os flavonóides, bem como outros compostos fenólicos encontrados em plantas, agem na membrana da bactéria, destruindo sua integridade e inibindo seu crescimento (Sato *et al.*, 1996). A microscopia eletrônica realizada para avaliar a morfologia das bactérias não mostrou significativa modificação estrutural ou na membrana, como sua ruptura ou desorganização citoplasmática, como mostra a figura 5 e 6.

Alguns flavonóides exibem atividade pró-oxidante (Hodnick *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1995). Essas propriedades são atribuídas ao fato de os flavonóides podem sofrer auto-oxidação em soluções aquosas na presença de metais de transição, levando à formação de radicais OH altamente reativos

(Rice-Evans *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997). Essa característica pode acelerar os danos de radicais livres em moléculas não-lipídicas, como o DNA, proteínas e carboidratos. Estudos sustentam que essa atividade gera danos ao DNA (Ahmad *et al.*, 1992). Xu *et al.* (2001) demonstrou que flavonóides (como a morina) e outros compostos lipofílicos podem inibir a atividade da Helicase Hep A de *Streptomyces sp in vitro* por interagir especificamente com sítio catalítico, conseqüentemente inibindo o processo duplicativo. Nossos resultados sustentam que alguns flavonóides podem atuar na maquinaria de duplicação celular, como ocorreu com a quercetina. Esta, parece fragmentar o cDNA que sofreu incubação com este material de acordo com os resultados obtidos na cromatografia de fase reversa (figura 12) e na corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 % (figura 9) onde não foi observado a formação de cDNA. A quercetina mostra impedir a duplicação celular além de gerar danos ao material genético existente. Em alguns casos pode ainda se complexar com RNA (Nafisi *et al.* 2008). Por sua vez, o resultado obtido através de espectrometria ultravioleta-visível (figura 14) pode ratificar a idéia de que a fragmentação realmente ocorre, pois o perfil observado a 260 nm foi maior para o tratamento que pode ser explicado pelo aumento no número de fragmentos de cDNA. No caso do tratamento realizado com a rutina não foi possível observar o mesmo resultado. O cDNA incubado não foi lisado como mostra o seu perfil cromatográfico (figura 11) e seu mapa espectral (figura 13), o qual pode se resultado da soma das absorbâncias das substâncias incubadas. Desta forma, a rutina foi utilizada na experimentação com DNA polimerase de T4 por um período de 60 minutos, e foi capaz de induzir alterações de sua estrutura secundária; indicando que esta enzima perdeu sua funcionalidade devido a esta alteração impedindo o crescimento bacteriano.

Estas diferenças entre os efeitos de cada flavonóide utilizado no presente estudo podem ser explicadas devido à estrutura de cada um dos compostos como é mostrado na figura 3. A quercetina é a forma aglicana da rutina, por não apresentar um glicosídeo aderido a sua estrutura, denominado

rutinose ou rutinósídeo. Esta é a principal característica que impede que o efeito de ambos seja semelhante. De alguma forma, o açúcar ligado à molécula de rutina não permite que ocorra lise às moléculas de cDNA, não negligenciando porém, a sua atividade bacteriostática.

Um dos fatores que pode explicar a atividade antibacteriana da quercetina é a presença do grupo hidroxila, sendo um dos elementos chaves que diferenciam os efeitos dos flavonóides sobre as linhagens bacterianas (ver a tabela II).

Tabela II – Resultados das atividades dos flavonóides

		Quercetina (OH)	Rutina (Rutinose)
	cDNA - HPLC	Grandes mudanças, destruição da estrutura do cDNA	Mudanças moderadas, mudança na hidrofobicidade do cDNA, possível desnovelamento
	DNA polimerase	Sem efeitos	Alteração de alfa-hélices e folhas-beta
UFC	<i>C. michiganensis</i>	++++	++
	<i>X. axonopodis</i>	++++	++
	MEV	Sem mudanças significativas	Sem mudanças significativas
	MET	Sem mudanças significativas	Sem mudanças significativas

Apesar de não apresentarem atividade nas linhagens de bactérias patogênicas nas condições e concentrações envolvidas no estudo, os flavonóides, por apresentarem capacidade de penetrar no citoplasma da célula e inibir o crescimento bacteriano, apresentam um grande potencial no tratamento contra certos agentes patogênicos em seres humanos, porém com uma administração mais elevada do composto como foi observado por Krolicka *et al.* (2008), que também observou a atuação destes compostos na maquinaria de duplicação celular.

7. Conclusões

Dentro do alcance dos métodos e protocolos realizados e resultados obtidos por estes experimentos, podemos sugerir as seguintes conclusões:

- ambos compostos são capazes de alterar a estrutura e função do cDNA; no caso da rutina, alterar o perfil de eluição do cDNA. Contudo, o perfil cromatográfico não evidencia qualquer fragmentação do material genético estudado, como ocorre após o tratamento realizado com a quercetina nestas condições experimentais.

- tanto a quercetina como a rutina interagem com o cDNA de modo que atuam como agentes bacteriostáticos tanto para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, quanto para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

- A rutina também pode atuar na DNA polimerase, inibindo sua atividade biológica como enzima envolvida na replicação do material genético, mas os dados de dicróismo circular sugerem que não houve alterações significativas no enovelamento protéico desta enzima.

- Apesar de serem compostos lipofílicos, os flavonóides utilizados, não foram capazes de provocar mudanças ou quebrar a parede celular bem como a membrana plasmática da linhagem utilizada no experimento de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

8. Referências Bibliográficas

- Afanas'ev, I. B.; Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V. and Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1763-1769.
- Ahmad, M.S., Fazal, F., Rahman, A., Hadi, S.M. and Parish, J.H. (1992). Activities of flavonoids for cleavage of DNA induced by dietary flavonoids in the presence of Cu (II): Correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis* 13, 605-608.
- Alcaraz, M. J.; Ferrándiz, M. L. (1987). Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *J. Ethnopharmacol.* 21 (3), 209-29.
- Bae, E. A.; Han, M.J.; Lee, M.; Kim, D.H. (2000). In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biol. Pharm. Bull.* 23 (9), 1122-4.
- Benhamou, N. (1991). Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some polysaccharides and hydroxyproline-rich glycoproteins in infected host leaf tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38,15-38.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as anti-oxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Method. Enzymol.* 186, 343-355.
- Cao, G., Sofic, E., and Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* 22(5), 749-760.
- Cao, G., Verdon, C., Wu, A.H.B. and Wang, H. (1995). Prior RL-Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. *Clin. Chem.* 41, 1738-1744.
- CLSI (2008) – [HTTP://www.nccls.org](http://www.nccls.org)

- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. NY Acad. Sci.* 854, 435-442.
- Cushnie, T.P.; Lamb, A.J. (2006). Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 13 (3), 187-91.
- Cutting, W. C.; Dreisbach, R. H.; Neff, B.J. (1949). Antiviral chemotherapy; flavones and related compounds. *Stanford Med Bull.* 7 (3), 137.
- Damas, J.; Bourdon, V.; Remacle-Volon, G.; Lecomte, J. (1985). Pro-inflammatory flavonoids which are inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins Leukot. Med.* 19 (1), 11-24.
- Davis, M. J., A. G. Gillaspie, Jr., A. K. Vidaver, R. W. Harris. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cyonodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34,107-117.
- Di Carlo, N.; Mascolo, N.; Izzo, A. A. and Capasso. F. (1999) *Life Sci.* 65 (4), 337-353.
- Dixon, R.A., Dey, P.M. and Lamb, C.J. (1983). Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol.* 55, 1-69.
- Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L; Giachetti, D. and Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *Febs. Lett.*, 416, 123-129.
- Formica, J. V.; Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Tox.*, 33 (12), 1061-1080.

- Fotsis, T.; Pepper, M. S.; Aktas, E.; Breit, S.; Rasku, S.; Adlercreutz, H.; Wähälä, K.; Montesano, R.; Schweigerer, L. (1997). Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* 57 (14), 2916-21.
- Grinberg, L. N.; Rachmilewitz, E. A. and Newman, H. (1994). Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 643-649.
- Gryglewski, R. J.; Korbut, R.; Robak, J.; Swies, J. (1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 36 (3), 317-22.
- Gonçalves, E. R.; Rosato, Y. B. (2000). Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 811-821
- Hahlbrock, (1981). Flavonoids. *In The Biochemistry of Plants* (7), Academic Press Inc, 425-456.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33 – 50.
- Hardy, K. J.; Hawkey, P. M.; Gao, F. and Oppenheim, B. A. (2004). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br. J. Anaesth.* 92, 121-130.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1141-1148.
- Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, P. C.; Katan, M. B.; Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 342 (8878), 1007-11.
- Hertog, M. G.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155 (4), 381-6.

- Hodnick, W.F., Duval, D. L. and Pardini, R.S. (1994). Inhibition of mitochondrial respiration and cyaned stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 47(3), 573-580.
- Hu, J. P. ; Calomme, M. ; Lasure, A. ; De Bruyne, T. ; Pieters, L. ; Vlietinck, A. and Vanden Berghe, D. A. (1995). Structure-activity relationships of flavonoids with superoxide scavenging ability. *Biol. Trace. Elem. Res.* 47, 327-331.
- Iglesias, C. V.; Aparicio, R.; Rodrigues-Simioni, L.; Camargo, E. A.; Antunes, E.; Marangoni, S.; de Oliveira Toyama, D.; Beriam, L. O.; Monteiro, H. S.; Toyama, M. H. (2005). Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). *Toxicon.* 46 (7), 751-8.
- IMI (1996) Distribution maps of plant disease 26(8) CAB International, Wallington, UK.
- Jandel Scientific, (1994). Sigmastat statistical software: user's manual. San Rafael: Jandel Scientific
- Jovanovic, S. V. ; Steenken, s. ; Tosic, M. ; Marjanovic, B. And Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidant. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 846-853.
- Kawaii, S.; Tomono, Y; Katase, E.; Ogawa, K. and Yano, M. (1999). Antiproliferative activity of flavonoids and ceveral câncer cell lines. *Biosc. Biotech. Biochem.* 63 (5), 896-899.
- Kim, H. K.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Kim. H. P. (1998). Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent.. *Arch Pharm Res.* 21 (4), 406-10.
- Knekt, P.; Järvinen, R.; Seppänen, R.; Hellövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol.* 146 (3), 223-30.
- Krolicka, A.; Szpitter, A.; Maciag, M.; Biskup, E.; Gilgenast, E.; Romanik, G.; Kaminski, M.; Wegrzyn, G. and Lojkowska, E. (2008). Antibacterial and antioxidant activity of the

- secondary metabolites from in vitro cultures of *Drosera aliciae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (manuscript), 1-16.
- Lin, R. D.; Chin, Y.P.; Lee, M.H. (2005). Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother Res.* 19 (7), 612-7
- Malavolta Jr, V. A.; Beriam, L. O. S. e Rodrigues Neto, J. (2001). podridão do fruto, novo sintoma relacionado a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 68(2),121-123
- Malavolta Jr., V. A. Bacterioses do maracujazeiro. In: Ruggiero, C. *et al.* (Eds.) Simpósio Brasileiro Sobre a cultura do maracujazeiro, 5., 1998, Jaboticabal, SP. p.217-229.
- Maridonneau-Parini, I.; Braquet, P. and Garay, R. P. (1986). Heterogenous effects of flavonoids on K⁺ and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red cells. *Pharmacol. Res. Commum* 18, 61-72.
- Metodiewa, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickancaité, E. and Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after is metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 107-116.
- Middleton, E. Jr. and Drzewiecki, G. (1984). Flavonoid inhibition of human basophile histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3333-3338.
- Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard P. and Cillard, J. (1993). Antioxidant and iron-chelant activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol* 45, 13-19.
- Nafisi, Sh.; Shadaloi, A.; Feizbakhsh, A. and Tajmir-Riahi, H. A. (2008). RNA binding to antioxidant flavonoids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 94, 1-7.

- Ng, T.B.; Huang, B.; Fong, W.P.; Yeung, H.W. (1997). Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sci.* 61 (10), 933-49.
- Oikawa, T.; Shimamura, M.; Ashino, H.; Nakamura, O.; Kanayasu, T.; Morita, I.; Murota, S. (1992). Inhibition of angiogenesis by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor. *J Antibiot (Tokyo)* 45 (7), 1155-60.
- Oliveira, D. ; Toyama, Marcos H ; Beriam, L. O. S. ; Marangoni, Sérgio ; Novello, J. C. (2002). Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of Protein Chemistry, New York*, v. 21, n. 3, p. 161-168, 2002.
- Peterson, J. and Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity *Nutrition Reserach*, 18 (12), 1995-2018.
- Rat, B., Possonnier, J., Goisque, M.J. and Burgaud, A. (1991). Le point sur le chancre bactérien. *Fruit and Legume* 86, 38-40.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. and Papanga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 933-956.
- Rothwell, A. 1968. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen. *Rhod. Agric. J.* 1871:75-78.
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Iinurna, M., Tosa, H. and Ohkawa, Y. (1996). Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 54, 171-176.
- Saija, A.; Scalese, M.; Lanza, M.; Mazullo, D.; Bonina, F. and Castelli, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.*, 19, 481-486.

- Silva, S.L., da Silva, A., Honório, K.M., Marangoni, S., Toyama, M.H. and Silva, A.B.F., 2004. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J. Molecular Structure (Theochem)* 684, 1-7.
- Skibola, C. F. and Smith, M. T. (2000). Potential health impact of excess flavonoid intake. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 375-384.
- Taguri, T.; Tanaka, T.; Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (12), 1965-9.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. and Inuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 50, 27-34.
- Xu, H., Ziegelin, G., Schroder, W., Frank, J., Ayora, S., Alonso, J.C., Lanka, E. and Saenger, W., 2001. Flavones inhibit the hexameric replicative helicase RepA. *Nucleic Acids Res.* 29(24), 5058-5066.
- Yen, G. C.; Duh, P. D.; Tsai, H. L.; Huang, S. L. (2003) Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67 (6), 1215-1222.
- Wallis, F. M. 1977. Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.* 11:333-342.