



Efeito do “Kéfigel®” em bactérias isoladas de infecções do pé diabético.

Soraia La Salette Videira Zenão

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de
Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Professora Doutora Conceição Fernandes (ESA, CIMO-IPB)

Professora Doutora Maria José Saavedra (DCV-ECAV,UTAD)

Bragança

2013

AGRADECIMENTOS

No percurso desta etapa de estudo que agora termina, participaram várias pessoas sem as quais esta dissertação não estaria completa e que merecem o meu sincero agradecimento. De modo particular gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Professora Doutora Conceição Fernandes do Instituto Politécnico de Bragança - CIMO, pela possibilidade de realizar esta dissertação, a sua disponibilidade, acompanhamento e orientação no meu percurso que foram indispensáveis, assim como críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria José Saavedra da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - CECAV apesar de não poder estar presente fisicamente, a disponibilidade e o acompanhamento científico durante a realização deste trabalho.

Ao Doutor Alfredo Aires, pela competência científica, por me ter ensinado com prazer e dedicação parte do que sei, bem como pela permanente disponibilidade e amizade então demonstradas.

À doutoranda Carla Dias, ao mestre José Pinela e à colega de mestrado Paula Dias, pela ajuda prestada, bem como, companheirismo e vivência diária.

Aos Departamentos de Ciências Veterinárias e de Agronomia da ECAV da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pelo acolhimento, bem como pelas condições indispensáveis à concretização da parte experimental desta dissertação.

Aos meus amigos, pela amizade e carinho sempre demonstrado, assim como palavras de encorajamento e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, agradeço a paciência, apoio, compreensão, carinho e força que sempre me dedicou ao longo deste tempo académico.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, António e Maria dos Anjos; ao meu irmão, Pedro; e aos meus sobrinhos, Rui Pedro e Martim, porque sem dúvida são eles o meu pilar. O seu afeto foi essencial para eu suportar a distância e sem eles a realização deste percurso não seria possível.

E por fim, a todos aqueles que de uma forma mais ou menos direta, me apoiaram ao longo desta caminhada.

Muito obrigado!

FINANCIAMENTOS

A realização deste trabalho foi possível mediante o apoio financeiro das seguintes entidades:

CIMO – Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança.

CECAV – Centro de Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
FINANCIAMENTOS	iii
ÍNDICE GERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
RESUMEN	x
1. Enquadramento e Objetivos.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Kéfigel® - produto comercial	5
2.1.1. Kefir	5
2.1.1.1. Propriedades terapêuticas	7
2.1.1.2. Composição dos grãos de kefir.....	9
2.1.2. Extratos.....	13
2.2. Diabetes.....	15
2.2.1. Pé diabético	17
2.2.2. Microbiota: úlceras do pé diabético	18
2.2.2.1. Género <i>Staphylococcus</i>	19
2.2.3. Opções terapêuticas no tratamento do pé diabético	20
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Amostras utilizadas	23
3.2. Preparação dos extratos.....	24
3.2.1. Preparação dos extratos do Kéfigel®.....	24

3.2.2. Preparação dos extratos das plantas	24
3.2.3. Preparação dos extratos dos grãos de kefir	25
3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	26
3.3.1. Origem dos isolados	26
3.3.2. Isolados utilizados	26
3.3.3. Meios de Cultura	27
3.3.4. Confirmação dos isolados bacterianos	28
<i>Coloração diferencial de Gram</i>	28
<i>Prova da catalase</i>	29
3.3.5. Identificação dos isolados bacterianos	29
3.3.6. “ <i>Screening</i> ” de suscetibilidade e classificação da atividade antimicrobiana.	29
3.3.7. Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	32
3.3.8. Atividade do Kéfigel® - produto comercial.....	33
3.4. Análise estatística.....	34
4. Resultados e Discussão	35
4.1. Confirmação dos isolados	36
<i>Coloração diferencial pelo método de Gram</i>	36
<i>Prova da catalase</i>	36
4.2. Identificação dos isolados bacterianos	37
4.3. “ <i>Screening</i> ” de suscetibilidade e classificação da atividade antimicrobiana	37
4.4. Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	45
4.5. Atividade do Kéfigel® - produto comercial	49
5. Considerações Finais	55
6. Referências Bibliográficas	57
Anexos	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Gel natural do Kéfigel® cosmético e terapêutico.	5
Figura 2.2. Grãos de kefir.....	6
Figura 2.3. Vista microscópica dos grãos de Kefir.	10
Figura 2.4. Diferentes leveduras constituintes dos grãos de kefir.....	10
Figura 2.5. Alfazema (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill)	13
Figura 2.6. Urtiga (<i>Urtica dioica</i> L).....	14
Figura 3.1. Amostras utilizadas de kefir, urtiga e lavanda.	23
Figura 3.2. Etapas da extração sólido-líquido.	25
Figura 3.3. Preparação da suspensão bacteriana.	30
Figura 3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos.....	31
Figura 4.1. Coloração de Gram.	36
Figura 4.2. Prova da catalase.....	36
Figura 4.3. Resultados dos testes do Api Staph BioMérieux®.	37
Figura 4.4. Halos de inibição nas placas inoculadas.	43
Figura 4.5. Microplacas durante a observação dos resultados das CMIs.	47
Figura 4.6. Crescimento da estirpe MJMC021 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)	51
Figura 4.7. Crescimento da estirpe MJMC024 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)	51
Figura 4.8. Crescimento da estirpe MJMC004 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)	52
Figura 4.9. Crescimento da estirpe MJMC018 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef).	52
Figura 4.10. Crescimento da estirpe MJMC020 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)	53
Figura 4.11. Crescimento da estirpe MJMC014 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Microbiota fúngica isolada de grãos de kefir.....	11
Tabela 2.2. Microbiota bacteriana isolada de grãos de kefir	12
Tabela 2.3. Composição e principais propriedades terapêuticas dos extratos dos óleos essenciais de alfazema e urtiga.....	15
Tabela 2.4. Classificação da diabetes <i>mellitus</i>	17
Tabela 2.5. Tipo de infecção, sintomas e agente mais frequentemente associado a úlceras do pé diabético.....	18
Tabela 3.1. Descrição dos isolados utilizados neste trabalho.....	27
Tabela 3.2. Coloração diferencial pelo método de Gram	28
Tabela 3.3. Prova da catalase.....	29
Tabela 4.1. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos controlos determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm).....	39
Tabela 4.2. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de urtiga, em diferentes solventes, determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm) e respetiva classificação (entre parêntesis).....	40
Tabela 4.3. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de lavanda, em diferentes solventes, determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm) e respetiva classificação (entre parêntesis).....	41
Tabela 4.4. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de grãos de Kefir e Kéfigel® determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm) respetiva classificação (entre parêntesis).....	42
Tabela 4.5. Eficácia antibacteriana relativa (%) dos extratos etanólicos vegetais	44
Tabela 4.6. Concentração Mínima Inibitória (mg.mL ⁻¹) e Concentração Mínima Bactericida, para os extratos etanólicos de urtiga e lavanda	48
Tabela 4.7. Classificação do efeito no crescimento e valores médios da taxa específica de crescimento (μ).....	50

RESUMO

Um dos maiores problemas da atualidade na saúde humana é o aparecimento de resistência aos antibióticos, particularmente em meio hospitalar e em doenças recorrentes como é o caso de infeções de úlceras do pé diabético. A diabetes tem vindo a aumentar na população mundial e destes doentes, cerca de 5 a 25% apresentam ulceração do pé. Associadas às infeções do pé diabético encontram-se primordialmente *Staphylococcus aureus*, quer estirpes sensíveis à meticilina (MSSA) quer estirpes resistentes (MRSA), estas últimas apresentando resistência ao tratamento com os antibióticos comerciais. Este fenómeno tem levado à procura de alternativas, quer seja pela síntese de novos compostos antibacterianos, quer seja pela procura de produtos naturais com propriedades antibacterianas.

Neste contexto, surgiu este trabalho no qual se avaliou o efeito antibacteriano de um produto comercial, Kéfigel®, formulado à base de compostos naturais (urtiga, lavanda e grãos de kefir) que tem sido indicado, ainda que empiricamente, como tendo propriedades antibacterianas. Assim, o potencial biológico quer do produto comercial, o Kéfigel®, quer dos seus principais componentes, foi avaliado em isolados de Gram positivo de úlceras do pé diabético, nomeadamente *Staphylococcus aureus* (MSSA e MRSA). Para tal, utilizaram-se os métodos de difusão em disco em meio sólido, da concentração mínima inibitória (CIMs), concentração mínima bactericida (CMB) e efeito na taxa específica de crescimento.

Os resultados mostraram que pelo método de difusão em disco, apenas os extratos etanólicos de urtiga e lavanda apresentaram atividade antibacteriana, e esta maioritariamente bacteriostática. Estes extratos apresentaram uma eficácia entre 50 a 100%, relativamente ao antibiótico gentamicina. Por outro lado, o Kéfigel®, na concentração testada, afetou a taxa específica de crescimento dos isolados *S. aureus*, já que após poucas horas de incubação o crescimento da maioria dos isolados era inibido, revelando por isso um efeito bacteriostático.

Assim, o Kéfigel® parece ser um produto natural com um potencial de ação efetiva contra *S. aureus*. O uso deste produto na prevenção das infeções das úlceras do pé diabético pode ser de grande utilidade, no entanto mais estudos terão que ser feitos, nomeadamente testes com concentrações mais elevadas de Kéfigel® e avaliação de efeito sinérgico com antibióticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, bacteriostático, gel de Kefir.

ABSTRACT

Nowadays, concerning human health, one of the main problems is the emergence of antibiotic resistance, particularly in hospital environment and in recurrent diseases such as diabetic foot ulcers. Diabetes is increasing in the world's population and about 5 to 25% of patients have ulceration of the foot. Associated with the diabetic foot infections are primarily *Staphylococcus aureus*, methicillin-sensitive strains (MSSA) and methicillin-resistant strains (MRSA), these last showing several resistances to treatment with traditional antibiotics. As consequence, there is an increasing for search alternatives, either by synthesis of new compounds or by the research for natural products with antibacterial properties.

In this context, this work investigated the antibacterial effect of a commercial product, Kéfigel[®], composed by natural compounds (nettle, lavender and kefir grains) which has been indicated, although empirically, as having antibacterial properties. Thus, biological potential of this commercial product, the Kéfigel[®], and its main components, were evaluated against Gram-positive isolates collected from diabetic foot ulcers, namely *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). The disk diffusion in solid medium, minimum inhibitory concentration (MICs), minimum bactericide concentration (MBC) and effects on specific growth rate were the methods used in this study.

The results of disk diffusion method showed that only ethanolic extracts of nettle and lavender has antibacterial activity, which was mainly bacteriostatic. These extracts presented effectiveness between 50 to 100%, in relation to the antibiotic gentamicin. On the other hand, the Kéfigel[®] affects the specific growth rate of *S. aureus* isolates, at the concentration tested, since after a few hours of incubation growth of the majority of isolates was inhibited, revealing a bacteriostatic effect.

Based on these results, the Kéfigel[®] seems to be a natural product with a potential antibacterial activity against *S. aureus*. The use of this product in the prevention of infections of diabetic foot ulcers can be very useful. Nevertheless, further studies are necessary, in particular tests with higher concentrations of Kéfigel[®] and synergism studies with antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, bacteriostatic, Kéfir gel.

RESUMEN

En la actualidad, uno de los problemas principales de la salud humana es el apareamiento de la resistencia antibiótica, sobretudo en medio hospitalario y en enfermedades recurrentes como es el caso de las infecciones de úlceras del pie diabético. La frecuencia de diabetes está aumentando en todo el mundo y entre el 5 y el 25% de los pacientes presentan ulceración del pie. Asociadas a las infecciones del pie diabético se encuentran principalmente *Staphylococcus aureus*, tanto estirpes sensibles a la meticilina (MSSA), como estirpes resistentes (MRSA), estas presentando resistencia al tratamiento con antibióticos comerciales. Este fenómeno lleva a la demanda de alternativas, ya sea por síntesis de nuevos compuestos antibacterianos, o bien por la investigación de productos naturales con propiedades antibacterianas.

En este contexto surge este trabajo que pesquisó el efecto antibacteriano de un producto comercial, Kéfigel®, elaborado con base en compuestos naturales (ortiga, lavándula y granos de kefir), indicado, aunque de forma empírica, como producto con propiedades antibacterianas. Así, el potencial, ya sea del producto comercial Kéfigel®, o bien de sus principales compuestos, han sido evaluado en aislados Gram positivo de úlceras del pie diabético, destacadamente *Staphylococcus aureus* (MSSA e MRSA). Para el efecto, se usaran métodos de difusión en disco en medio sólido, de concentración mínima inhibitoria (CIMs), de concentración mínima bactericida (CMB) y efecto en la tasa específica de crecimiento.

Los resultados muestran que por el método de difusión en disco, los extractos etanólicos de ortiga y lavándula, fueron los que presentaron actividad antibacteriana, esta mayormente bacteriostática. Estos extractos presentaron una eficacia entre el 50 y el 100% en relación al antibiótico gentamicina. Al mismo tiempo, el Kéfigel®, en la concentración testada, afectó la tasa específica de crecimiento de los aislados *S. aureus* ya que, pocas horas pasadas de incubación, el crecimiento de gran parte de los aislados fue inhibido, exponiendo así un efecto bacteriostático.

En conclusión, Kéfigel® se presenta como un producto natural con potencial de acción efectiva contra el *S. aureus*. El uso de este producto en la prevención de las infecciones de úlceras del pie diabético puede que sea de gran utilidad, sin embargo se presentan como necesarios más estudios, esencialmente estudios con concentraciones más elevadas de Kéfigel® y una evaluación del efecto sinérgico con antibióticos.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, bacteriostático, gel de Kéfir.

1. Enquadramento e Objetivos

A infeção do pé diabético é uma complicação tardia da diabetes *mellitus* que quando não controlada pode levar à amputação. Em Portugal estima-se que possam ocorrer anualmente cerca de 1 200 amputações dos membros inferiores. Assim, a Direcção-Geral da Saúde conjuntamente com a Sociedade Portuguesa de Diabetologia, definiram os procedimentos desejáveis que incluem medidas preventivas e se o diagnóstico identificar a existência de uma lesão, nomeadamente uma úlcera, torna-se prioritário o controlo da infeção.

As infeções do pé diabético são geralmente de carácter polimicrobiano e dos patógenos comumente encontrados salienta-se *Staphylococcus aureus*, tanto estirpes sensíveis, como estirpes resistentes à meticilina. A resistência ao tratamento com os antibióticos comerciais tem desencadeado a procura de alternativas que incluem a síntese de novos compostos antibacterianos e/ou a procura de produtos naturais com propriedades antibacterianas.

Neste contexto, pretende-se avaliar o efeito antibacteriano dum gel natural Kéfigel® que é comercializado como tendo propriedades antibacterianas, entre outras. São ainda objetivos deste trabalho avaliar o potencial biológico dos principais ingredientes deste produto comercial, como urtiga, lavanda e grãos de kefir, em isolados de Gram positivo de úlceras do pé diabético, nomeadamente *Staphylococcus aureus*.

Especificamente, pretendem-se respostas para as seguintes questões:

- ✓ O Kéfigel® tem atividade antimicrobiana contra as bactérias de Gram positivo?
- ✓ Quais os componentes do Kéfigel® que têm atividade antimicrobiana?
- ✓ Qual a concentração mínima inibitória de Kéfigel® / componentes com ação antibacteriana?

Dos resultados previstos deste trabalho, pretende-se aferir da utilização do Kéfigel® como uma medida profilática das infeções das úlceras do pé diabético.

A dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento e justificação do estudo realizado, aos principais objetivos propostos e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica, no qual se abordam a constituição e as propriedades terapêuticas do kefir, as propriedades de extratos de alfazema e de

urtiga, bem como se aborda a problemática da diabetes, sendo dada ênfase ao pé diabético. No terceiro capítulo encontram-se referidos os materiais e métodos utilizados na identificação dos isolados bacterianos, na obtenção dos diferentes extratos e nos testes de suscetibilidade, bem como na determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias e Mínima Atividade Bacteriana. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos e consequente discussão dos mesmos e no último capítulo são sintetizadas as principais conclusões e recomendações alcançadas neste estudo. Finalmente apresenta-se a listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Kéfigel® - produto comercial

O Kéfigel® (Figura 2.1), também conhecido como gel natural de kefir, integra uma linha de produtos cosméticos constituídos à base de grãos de kefir destinados à prevenção, proteção e alívio de dores em lesões da pele. Segundo os fabricantes, o Kéfigel® apresenta também algumas propriedades antibacterianas, aparentemente confirmadas por alguns utilizadores.



Figura 2.1. Gel natural do Kéfigel® cosmético e terapêutico.

Fonte: Este trabalho

Na sua composição, o gel natural de Kéfigel® tem, para além de grãos de kefir, extrato de alfazema e de urtiga. É muito mais que um cosmético pois além de hidratar, proteger e regenerar a pele, combate fissuras nos pés, problemas de pele, dores musculares e reumáticas, câibras, varizes, artroses, articulações e pernas cansadas. O gel do Kéfigel® é totalmente natural, embora registado como cosmético no Infarmed, tem ação terapêutica sendo considerado como um anti-inflamatório e analgésico, mostrando que pode ser aplicado em queimaduras, varizes, derrames e manchas na pele.

2.1.1. Kefir

Historicamente, o kefir é originário das montanhas do Cáucaso e Ásia Central, onde os pastores utilizam os seus grãos desde há muitos séculos. Existem citações místicas de que seria “um presente do profeta Maomé ao seu povo, para a cura de todos os males” (Diniz *et al.*, 2003). Estes conhecimentos foram passados de gerações em gerações entre as tribos do Cáucaso, sendo considerados uma fonte de riqueza familiar,

devido às suas propriedades nutritivas e também por se crer que confere longevidade. A palavra kefir é originária da palavra turca “keif” que significa “bem-estar” e “bom sentimento” (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006; Feijó, 2010).

O kefir começou a ser reconhecido por possuir poderes de cura desde o início do século XVIII (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006), sobretudo no império Russo, mas só no final do século XIX é que a bebida iniciou a sua popularização para fora da Rússia (Zolini *et al.*, 2006). Esta bebida apresenta um sabor levemente ácido, alcoólico, textura um pouco espessa e é constituída por uma mistura de leveduras e bactérias encapsuladas numa matriz de polissacarídeos e proteínas, o pH varia de 4,2 a 5,5, dependendo do tempo de fermentação (Diniz *et al.*, 2003; Amores *et al.*, 2004; Schneedorf e Anfiteatro, 2004; Zolini *et al.*, 2006). Os grãos de kefir, colónias de bactérias ácido-lácticas (LAB) e leveduras, apresentam estruturas parecidas com a flor da couve-flor (Figura 2.2), com dimensões de 3 a 20 mm (Diniz *et al.*, 2003; Feijó, 2010). O melhor meio para a produção de kefir é o leite desnatado, porque o número de bactérias LAB aumenta com menores níveis de gordura e com uma temperatura de 22°C (Feijó, 2010).



Figura 2.2. Grãos de kefir

Fonte: Este trabalho

O consumo de kefir ao longo destes anos tem mostrado que os seus microrganismos não são patogénicos (Zolini *et al.*, 2006). De facto, o kefir é um exemplo de um probiótico porque os microrganismos ingeridos com o produto chegam vivos ao intestino, sendo capazes de suportar as condições severas deste, incluindo o pH extremo do estômago, a ação da bÍlis e das enzimas digestivas (Lee e Salminen, 1995; Otes e Caginidi, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005; Feijó, 2010). Segundo diferentes autores, os probióticos podem prevenir ou mesmo tratar uma serie de doenças, tais como síndrome do intestino irritável, infeções fúngicas e doença de Crohn. Salminen *et al.*,

(1999) propôs a seguinte definição para probióticos: “Probióticos são preparações de células microbianas ou componentes de células microbianas que têm efeitos benéficos para a saúde e bem-estar do hospedeiro”. Um probiótico melhora uma das três funções principais da microbiota gastrointestinal quando ingerido por hospedeiros humanos (Martins *et al.*, 2005): resistência à colonização, imunomodulação ou contribuição nutricional.

2.1.1.1. Propriedades terapêuticas

O kefir apresenta uma variedade enorme de propriedades terapêuticas que incluem proteção contra microrganismos, atividade anti-inflamatória, atividade antitumoral, entre outras. Em seguida estão descritas algumas dessas propriedades, de acordo com diferentes estudos:

- Redução dos efeitos de intolerância à lactose: esta propriedade deve-se às enzimas presentes nos grãos de kefir que apresentam atividade β -galactosidase, mesmo após o consumo (Alm, 1982; De-Vrese *et al.*, 2001; Diniz *et al.*, 2003).
- Imunomodulação: esta propriedade foi comprovada através de estudos efetuados por Thoreux e Schmucker (2001) quando alimentaram ratos com kefir e observaram uma resposta do sistema imunitário aumentada. O kefir, como outros probióticos, exerce um efeito adjuvante sobre o sistema das mucosas, provavelmente devido à ação de componentes da parede celular bacteriana. (Saloff-Coste, 1998; Diniz *et al.*, 2003; Farnworth, 2006).
- Balanço da microbiota intestinal: o kefir está associado à diminuição da ocorrência de doenças como obstipação, hemorroides, diverticulares e cancro cólon-rectal (Orlova *et al.*, 1980; Diniz *et al.*, 2003; Feijó, 2010). Ao nível das funções digestivas o kefir começa logo a atuar na fase inicial de mastigação, onde restaura o fluxo de segregação de saliva e melhora a concentração de eletrólitos e proteínas para ajudar a engolir o bolo alimentar (Kneifel, 1992); na fase gástrica regula o esvaziamento, evita a sensação de digestão lenta ou mesmo indigestão (Blanc, 1984) e na fase intestinal ativa o pâncreas e vias biliares, estimulando assim os microrganismos presentes no intestino. Promove ações enzimáticas, regula hormonas e a absorção de minerais como o cálcio (Rollan, 1991).

- Atividade antitumoral: os estudos de Kubo *et al.*, 1992 e Diniz *et al.*, 2003 realizados em ratos revelaram que os polissacarídeos solúveis em água, isolados a partir do kefir, tanto oral, como por via intra-peritoneal, foram capazes de inibir o crescimento do carcinoma de Ehrlich ou Sarcoma 180, comparativamente ao controlo. Além disso, sabe-se hoje que o kefir pode inibir o crescimento de algumas células cancerosas e prevenir certos tipos de cancro, como cancro cólon-rectal, cancro da mama, bem como reduzir o tamanho de alguns tumores (Chen *et al.*, 2007).
- Atividade antibacteriana: foi estudada por vários autores (Pool-Zobel *et al.*, 1993; Zacconi *et al.*, 1995; Ota, 1999; Diniz *et al.*, 2003; Feijó, 2010). Garrote e colaboradores (2000), testou a atividade inibidora de sobrenadante de leite de vaca fermentado com grãos de kefir, contra bactérias Gram positivo e Gram negativo e concluíram que os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação do kefir têm importantes propriedades bacteriostáticas, mesmo na fase inicial da fermentação do leite. Um estudo posterior (Yüksekdağ *et al.*, 2004) mostrou que todas as estirpes de *Lactococcus* isoladas de kefir foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os estudos de Otes e Cagindi (2003) mostraram que o kefir apresenta atividade antibacteriana “*in vivo*” contra uma variedade de bactérias Gram positivo (ex: *Staphylococcus* spp, *Bacillus subtilis*), Gram negativo (ex: *Escherichia coli*, *Salmonella*) e contra alguns fungos (ex: *Candida albicans*).
- Atividade cicatrizante: foi testada por Rodrigues *et al.*, (2005) com utilização de uma pomada a base de kefir, em ratos com ferida infetada por *Staphylococcus aureus*, verificando uma maior cicatrização (mais de 70%) comparativamente a uma pomada comercial à base de neomicina-clostebol.
- Relaxante e calmante: o estudo de Lopitz-Otsoa *et al.*, (2006) refere que os aminoácidos e os minerais presentes no kefir têm ação relaxante e calmante sobre o sistema nervoso.

Vários estudos referem que o kefir tem ação contra géneros considerados potencialmente patogénicos como *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus* e as espécies, *Escherichia coli* (Schneedorft e Anfiteatro, 2004), *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* (Know *et al.*, 2003), *Listeria*

monocytogenes, *Streptococcus pyogenes* e fungos como por exemplo *Candida albicans* (Rodrigues *et al.*, 2005).

O kefir contém também substâncias que demonstram eficácia na redução de radicais livres de oxigénio (ROS), tais como o tocoferol, o retinol, o cobre, o zinco e a glutatona (Bermond, 1991; Tison, 1992).

2.1.1.2. Composição dos grãos de kefir

O kefir é uma suspensão de microrganismos simbioses formado por um grande número de estipes de bactérias LAB e de leveduras, ambos encapsulados numa matriz polissacarídea e proteínas (Diniz *et al.*, 2003). Apresenta uma consistência gelatinosa, irregular e esfalela-se com facilidade se pressionado (La Rivieré *et al.*, 1967). O kefir possui aproximadamente 13% de proteínas, 24% de fragmentos celulares, polissacarídeos e lípidos (Schneedorf e Anfiteatro, 2004). Além de bactérias e leveduras, é rico em aminoácidos, enzimas, vitaminas e minerais. Destes últimos, especialmente cálcio, fósforo, magnésio, vitamina B2 e B12, vitamina K, vitamina A, vitamina D e vitamina E (Gaware *et al.*, 2011).

Uma vasta variedade de diferentes espécies de organismos, compreendendo leveduras e bactérias, tem sido isoladas e identificadas. Segundo Feijó (2010) algumas das bactérias e leveduras que constituem o kefir são: *Lactococcus lactis* subsp *lactis*; *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*; *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis*; *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris*; *Lactobacillus kefir*; *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* e *Saccharomyces unisporus*. Os géneros bacterianos mais relevantes da microbiota são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* e *Streptococcus* e a nível de leveduras: *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Torula* (Schneedorf e Anfiteatro, 2004).

A nomenclatura taxonómica das espécies de leveduras e bactérias que compõem o kefir tem variado juntamente com os avanços nos métodos de classificação taxonómica. De acordo com Halle *et al.*, (1994) os lactobacilos predominantes no kefir são *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum* e *L. kefirianofaciens*, responsáveis por 20% dos lactobacilos, sendo que os restantes 80% são *Lactobacillus kefirini*. As leveduras predominantes são *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir* e *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus*.

Uma descrição completa de leveduras e bactérias, presentes nos grãos de kefir, por diferentes autores encontram-se nas tabelas 2.1 e 2.2, respetivamente. Nas figuras 2.3 e 2.4 mostram-se microscopicamente os grãos de kefir e algumas leveduras constituintes dos grãos de kefir, respetivamente.

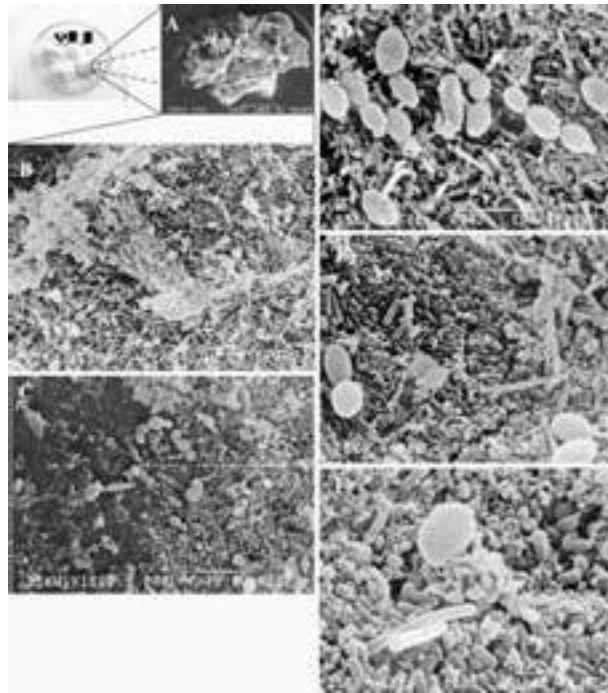


Figura 2.3. Vista microscópica dos grãos de Kefir.

Legenda: A: 30x; B: 100; C: 1800x; D: 3600x; E:4800x; F: 8600x

Fonte: Lopitz-Otsoa *et al.*, (2006)

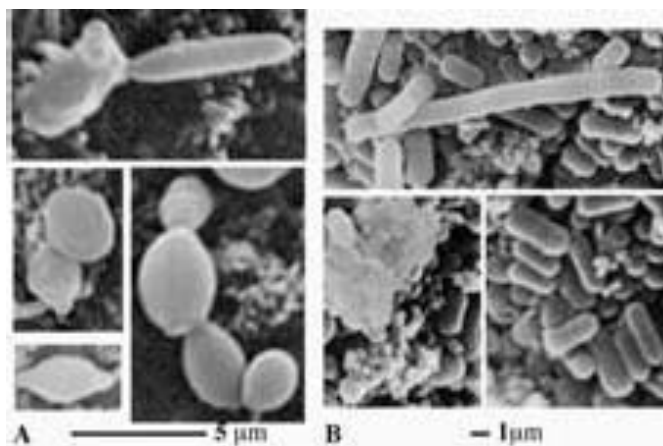


Figura 2.4. Diferentes leveduras constituintes dos grãos de kefir.

Fonte: Lopitz-Otsoa *et al.*, (2006)

Tabela 2.1. Microbiota fúngica isolada de grãos de kefir.

Nomenclatura atual	Nomenclatura anterior	Autores
<i>Dekkera anomala</i> / <i>Brettanomyces anamalus</i>		Angelo <i>et al.</i> , 1993; Pintado <i>et al.</i> , 1996; Wyder <i>et al.</i> , 1997; Loretan <i>et al.</i> , 2003
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i> ; <i>Candida colliculosa</i>	Wyder <i>et al.</i> , 1997
<i>Candida friedrichii</i>		Angelo <i>et al.</i> , 1993
<i>Candida humulis</i>		Kumura <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces exigus</i>	<i>Torulopsis holmii</i> ; <i>Candida holmii</i>	Engel <i>et al.</i> , 1986; Iwasawa <i>et al.</i> , 1982; Angelo <i>et al.</i> , 1993; Marquina <i>et al.</i> , 2002; Rosi, 1978
<i>Candida inconspicua</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Kluyveromyces marxianus</i> / <i>Candida kefir</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxisnus</i>	Wyder <i>et al.</i> , 1997; Marquina <i>et al.</i> , 2002; Know <i>et al.</i> , 2003
<i>Pichia fermentans</i> / <i>Candida firmetaria</i>	<i>Candida lambica</i>	Rohm <i>et al.</i> , 1992; Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Issatchenkia orientalis</i> / <i>Candida krusei</i>		Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Candida maris</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Cryptococcus humicolus</i>		Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Debaryomyces hanseii</i> / <i>Candida famata</i>		Loretan <i>et al.</i> , 2003; Kumura <i>et al.</i> , 2004
<i>Debaryomyces (Schwanniomycetes) occidentalis</i>		Kumura <i>et al.</i> , 2004
<i>Galactomyces geotrichum</i> / <i>Galactomyces candidum</i>		Pintado <i>et al.</i> , 1996; Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Kluyveromyces lactis</i> var <i>lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Lactis</i>	Angelo <i>et al.</i> , 1993; Marquina <i>et al.</i> , 2002; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Kluyveromyces lodderae</i>		Kumura <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Rosi, 1978; Angelo <i>et al.</i> , 1993; Marquina <i>et al.</i> , 2002;
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Koroleva, 1988
<i>Saccharomyces unisporus</i>		Wyder <i>et al.</i> , 1997; Marquina <i>et al.</i> , 2002; Loretan <i>et al.</i> , 2003
<i>Yarrowia lipolytica</i> / <i>Candida lipolytica</i>		Kumura <i>et al.</i> , 2004
<i>Zygosacharomyces rouxii</i>		Loretan <i>et al.</i> , 2003; Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Saccharomyces turicensis</i>		Wyder <i>et al.</i> , 1999

 Fonte: Adaptado de Lopitz-Otsoa *et al.*, (2006).

Tabela 2.2. Microbiota bacteriana isolada de grãos de kefir

Nomenclatura atual	Nomenclatura anterior	Autores
<i>Lactobacilli</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		Angelo <i>et al.</i> , 1993
<i>Lactobacillus brevis</i>		Otogalli <i>et al.</i> , 1973; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	Angelo <i>et al.</i> , 1993
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus fermentum</i>		Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus helveticus</i>		Lin <i>et al.</i> , 1999; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus kefir</i>		Garrote <i>et al.</i> , 2001; Garrote <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Yokoi <i>et al.</i> , 1990; Mitsue <i>et al.</i> , 1999
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	Takiwaza <i>et al.</i> , 1994
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>	Know <i>et al.</i> , 2003
<i>Lactobacillus parakefiri</i>		Takiwaza <i>et al.</i> , 1994; Garrote <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus plantarum</i>		Garrote <i>et al.</i> , 2001; Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
Outras bactérias		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus cremoris</i> / <i>Streptococcus cremoris</i>	Yuksekdag <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> / <i>Streptococcus lactis</i>	Garrote <i>et al.</i> , 2001; Yuksekdag <i>et al.</i> , 2004; Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptococcus thermophilus</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002; Yuksekdag <i>et al.</i> , 2004
<i>Enterococcus durans</i>		Yuksekdag <i>et al.</i> , 2004
<i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>		Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Leuconostoc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>		Witthuhn <i>et al.</i> , 2005
<i>Acetobacter aceti</i>		Angelo <i>et al.</i> , 1993

 Fonte: Adaptado de Lopitz-Otsoa *et al.*, (2006).

Pela análise destes dados pode-se concluir que a microbiota do kefir parece diferir em função dos estudos realizados por diferentes autores, embora algumas espécies relatadas estejam sempre presentes. Estas diferenças podem ser devidas a diferentes lotes de kefir, a diferentes fontes de leite e também ao período de tempo de cultivo do kefir. Acresce ainda que a microbiota do mesmo lote de grãos de kefir pode ser alterada durante diferentes estações climáticas e ainda devido às condições da cultura.

2.1.2. Extratos

Os extratos utilizados na preparação comercial do gel cosmético e terapêutico à base de kefir, são extratos de alfazema e de urtiga.

A alfazema é um arbusto pertencente ao género *Lavandula* da família das Lamiaceae, sendo os seus extratos utilizados na indústria de perfumes, alimentos e farmacêutica (Figura 2.5). O óleo essencial de alfazema, é composto por monoterpenos principalmente linalol e acetato de linalol (Gonçalves e Romano, 2012). A alfazema produz ainda metabolitos ativos como fitoesteróis, ácidos fenólicos e flavonóides, que agem como antioxidantes (Costa *et al.*, 2012). A essência da alfazema tem sido utilizada para estimular o sono (Field *et al.*, 2008), para reduzir a ansiedade (Kritsidima *et al.*, 2009; Dobetsberger e Buchbauer, 2011) e ainda como anticolinesterásico, antimicrobiano e antioxidante (Costa *et al.*, 2012).



Figura 2.5. Alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill)

O trabalho de Moon e colaboradores (2006) refere que a alfazema tem propriedades antibacterianas sobre uma vasta gama de bactérias, como por exemplo *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*. De acordo com Cavanagh e Wilkinson (2002), os óleos essenciais de alfazema também têm sido muito valorizados por possuir atividade antibacteriana, antifúngica, antidepressiva, carminativo e propriedades sedativas e ainda por ser eficaz contra queimaduras e picadas de insetos.

A urtiga é uma planta perene, pertencente ao género *Urtica* da família das Urticaceae (Figura 2.6). O extrato de urtiga, tem propriedades antioxidantes devido à presença de flavonóides, carotenóides e fitoesteróis (Sebranek *et al.*, 2005; Karabacak e Bozkurt, 2008). Segundo Aksu e Kaya (2004) e Karabacak e Bozkurt (2008), os extratos de urtiga têm efeito benéfico em doenças como a diabetes, inflamação hemorroida, eczema, anemia, reumatismo e cancro da próstata, sendo que as folhas contêm α -tocoferol, riboflavina, ferro, zinco, cálcio, fósforo e potássio.



Figura 2.6. Urtiga (*Urtica dioica* L).

Fonte: <http://kemahealing.com/herbalism>

A atividade microbiana foi verificada com extratos aquosos das partes aéreas da urtiga por Gülçin e colaboradores (2004) contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans*, entre outros, sendo também mostrado no mesmo estudo atividade analgésica. Sabe-se ainda que a urtiga tem um efeito hipertensor, diurético, anti-inflamatório, antirreumático e cardiovascular (Riehemann *et al.*, 1999; Tahri *et al.*, 2000).

Na tabela 2.3 são apresentados alguns dos principais compostos e propriedades terapêuticas, presentes em extratos, destes dois tipos de plantas.

Tabela 2.3. Composição e principais propriedades terapêuticas dos extratos dos óleos essenciais de alfazema e urtiga.

Planta	Compostos químicos	Propriedades terapêuticas
Alfazema	Acetato de linalol, ácido rosmarínico, cânfora, cineol, cumarina, fitosteróis, flavonóides, geraniol, limoneno, linalol, princípios amargos e taninos	Sedativo; Desinfetante; Antisséptico; Anti-inflamatório Antifúngico; Antimicrobiano; Carminativo; Cicatrizante Antiespasmódico; Analgésico
Urtiga	Ácidos gordos, ácidos triteroénicos, fitoesteróis livres, lectina, polissacarídeos, flavonoides, carotenoides, sais minerais, mucilagens, provitamina A,	Anti-inflamatória; Antioxidante; Anti-radicalar; Antiproliferativo; Diurético; Tratamento de artroses, artrites e problemas reumáticos.

Fonte: Adaptado de Cunha *et al.* (2010, 2012).

2.2. Diabetes

A diabetes é considerada um dos principais problemas mundiais de saúde pública, devido à elevada prevalência, incapacitação e mortalidade precoce, bem como dos elevados custos no seu tratamento e controlo (Carvalho *et al.*, 2004; Brasileiro *et al.*, 2005; Pitta *et al.*, 2011; Al Benwan *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2012; WHO, 2012).

Vários estudos têm demonstrado um aumento da incidência de diabetes. A diabetes afeta aproximadamente 12% dos adultos, sendo que estes apresentam idades entre os 40 e os 74 anos; na classe jovem observou-se que 30 a 33 % dos casos diagnosticados ocorreram em jovens de aproximadamente 13 anos de idade (Green *et al.*, 2002). Em 2011, a prevalência de diabéticos em Portugal rondava os 12,7% sendo que estava compreendido entre os 20 e os 79 anos de idade e a maior incidência era encontrada nos homens, entre os 60 e os 79 anos (Gardete Correia *et al.*, 2012).

Estudos realizados mostraram que em 1995 existiam 135 milhões de diabéticos e as projeções indicam que em 2025 deverá ser aproximadamente de 300 milhões, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2012). De acordo com Gardete

Correia e colaboradores (2013) estima-se que em 2030 o número de pessoas com Diabetes no mundo atinja os 552 milhões, o que representa um aumento de 49% da população atingida pela doença.

Portugal posiciona-se entre os países Europeus que registam uma das mais elevadas taxa de prevalência da diabetes. Nos últimos 10 anos a taxa de prevalência de diabetes aumentou em 80% (Boavida *et al.*, 2012). Em Portugal calcula-se que existam 991 mil pessoas com diabetes, aumentando esta situação com a idade em ambos os sexos, isto segundo a Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal (<http://www.apdp.pt/>) e Boavida *et al.*, 2012. A taxa de incidência de diabetes tem aumentado em média em Portugal cerca de 10% por ano desde 2000, sendo que na classe jovem (0 aos 19) a diabetes tipo I apenas tem crescido em média 0,14% neste últimos anos. Na diabetes gestacional, a prevalência em Portugal continental em 2011, foi de 4,9% da população parturiente (que utilizou o Serviço Nacional de Saúde durante esse ano), registando um acréscimo significativo nos últimos três anos comparativamente ao período anterior. Em 2005 e 2006 a taxa de prevalência era de 3,4%, nos 2 anos seguintes baixou para 3,3, sendo que a partir de 2009 tem aumentando razoavelmente, apresentando valores de 3,9 para o ano de 2009, 4,4 para o ano de 2010 e 4,9 para o ano de 2011 (Gardete Correia *et al.*, 2012).

Diabetes *mellitus*, conhecida como vulgar diabetes, é um distúrbio metabólico crónico resultante de uma deficiente capacidade da utilização de glicose. Este distúrbio está relacionado com diferentes graus de dificuldade em órgãos fundamentais para a manutenção da vida, uma vez que a glicose é a fonte de energia metabólica (Albarrán, 2001; Kuzuya *et al.*, 2002; Palma Gámiz *et al.*, 2004; Ahmed e Goldstein, 2006; Heydari *et al.*, 2010; WHO, 2012).

A diabetes inicialmente foi classificada em diabetes Tipo 1 ou insulino-dependente e diabetes Tipo 2 ou insulino-independente (Brasileiro *et al.*, 2005; Ahmed e Goldstein, 2006; Heydari *et al.*, 2010). Posteriormente os critérios de diagnóstico foram alterados, pois surgiram fatores genéticos e ambientais que influenciam o desenvolvimento da diabetes, bem como o efeito de algumas drogas e agentes infecciosos, não esquecendo ainda as condições pancreáticas, entre outras (Buse *et al.*, 2003). Atualmente são considerados 4 tipos clínicos para a diabetes *mellitus*, conforme referido na tabela 2.4.

Tabela 2.4. Classificação da diabetes *mellitus*.

Tipo de diabetes	Caracterização
Diabetes Tipo 1	Deficiência/falta de produção de insulina, tendência para a cetoacidose e dependência absoluta de insulina para a manutenção da vida
Diabetes Tipo 2	Resistência à insulina; verifica-se relativa deficiência de insulina e função das células- β pancreáticas prejudicada; utilização ineficaz de insulina; pacientes podem parecer assintomáticos durante anos devido á resistência da insulina.
Diabetes Gestacional	Hiperglicemia, ou elevados níveis de açúcar no sangue, que aparecem pela primeira vez, ou foi reconhecido, durante a gravidez. A tolerância aos hidratos de carbono geralmente regressa ao normal após o parto.
Outros tipos específicos	Defeitos genéticos que alteram a função das células- β pancreáticas ou a ação da insulina; endocrinopatias; patologias do pâncreas exócrino; efeitos de drogas ou fármacos; infeções; formas raras de diabetes autoimunes; outros síndromes genéticos associados à diabetes

Fonte: Adaptado de Kuzuya *et al.*, (2002), Ahmed e Goldstein (2006), Silva *et al.*, (2009), Sacks *et al.*, (2011) e WHO (2012).

2.2.1. Pé diabético

As complicações crónicas dos diabéticos são bastantes, nomeadamente o pé diabético, sendo este um estado fisiopatológico multifacetado, onde as características comuns são as lesões nos pés das pessoas com diabetes. Dos pacientes com diabetes, cerca de 5 a 25% apresentam ulceração do pé (Elefteriadou *et al.*, 2010). Como consequência, a causa mais comum para os diabéticos serem atendidos nos serviços ambulatoriais é o pé diabético, resultando muitas vezes em internamento por longos períodos de tempo, sendo que parte destes pacientes que ronda os 10 a 30%, não conseguem a cura da úlcera e avançam para amputação (Rathur e Boulton, 2007; Pinto *et al.*, 2008; Elefteriadou *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; Lipsky *et al.*, 2012).

A síndrome do pé diabético é caracterizada por úlceras do pé associadas a neuropatias com diferentes graus de isquemia e infeção (Boulton, 2002; Lipsky, 2004; Brasileiro *et al.*, 2005; Veves *et al.*, 2006; Rathur e Boulton, 2007; Boulton, 2008; Pinto *et al.*, 2008) e as lesões normalmente resultam de traumas gerados por falhas no processo de cicatrização (Ochoa-Vigo e Pace, 2005; Veves *et al.*, 2006; Boulton, 2008; Pitta *et al.*, 2011; Benwan *et al.*, 2012; Lipsky *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2012). As úlceras são caracterizadas por lesões cutâneas onde existe perda de epitélio, podendo

atingir a derme ou até mesmo os tecidos mais profundos, envolvendo ossos e músculos (Ochoa-Vigo e Pace, 2005; Veves *et al.*, 2006; Rathur e Boulton, 2007; Tan *et al.*, 2011).

O risco destas complicações depende de vários fatores, sendo eles: a idade, a obesidade, a hipertensão arterial, o alcoolismo, o tabagismo, a genética e o tipo de diagnóstico efetuado que irão influenciar a formação e desenvolvimento da úlcera, infecção e gangrena, podendo chegar mesmo a uma amputação quando não há tratamento precoce, ou o tratamento não é eficaz (Milman *et al.*, 2001; Ochoa-Vigo e Pace, 2005; Veves *et al.*, 2006).

2.2.2. Microbiota: úlceras do pé diabético

Vários estudos referem que as infeções das úlceras do pé diabético são a segunda causa mais comum para a amputação (Rathur e Boulton, 2007; Elefteriadou *et al.*, 2010). A infeção pode ser monomicrobiana ou polimicrobiana (Tabela 2.5), ocorrendo em 60 a 80% dos pacientes (Rocha *et al.*, 2002; Powlson e Coll, 2010; Al Benwan *et al.*, 2012). Em pacientes hospitalizados, a infeção é grave e normalmente é causada por 3-5 espécies de bactérias, tanto aeróbias como anaeróbias (Carvalho *et al.*, 2004; Lipsky, 2004; Veves *et al.*, 2006; Elefteriadou *et al.*, 2010; Powlson e Coll, 2010; Benwan *et al.*, 2012; Lipsky *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2012). No entanto, nas infeções do pé diabético temos como bactéria mais relevante estirpes de *Staphylococcus aureus*, sendo isolada de 60% de todas as úlceras infetadas.

Tabela 2.5. Tipo de infeção, sintomas e agente mais frequentemente associado a úlceras do pé diabético.

Infeção	Manifestações clínicas	Agentes
Leve	Superficial e limitada em tamanho e profundidade; Úlcera rasa; Bom controlo glicémico.	Cocos Gram positivos: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus</i> spp.
Moderada e Grave	Mais profundo ou mais extensiva; Acompanhada de sinais sistémicos ou perturbações metabólicas; Suspeita de infeção profunda; Isquemia; Mau controlo glicémico	Polimicrobiana: Cocos Gram positivos anaeróbios (<i>Bacteroides fragilis</i>) e Bacilos Gram negativos (<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i>)

Fonte: Adaptado de Rocha *et al.*, (2002) e Lipsky *et al.*, (2012).

O aparecimento e a propagação de microrganismos com multirresistência aos antimicrobianos ocorre, tanto no ambiente hospitalar, como na comunidade. Estudos confirmam que 76% dos pacientes com diabetes não hospitalizados com úlceras infectadas apresentam *Staphylococcus aureus*, incluindo estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em 20% dos casos (Carvalho *et al.*, 2004; Veves *et al.*, 2006; Linday, 2008; Powlson e Coll, 2010). A frequência de estirpes de *S. aureus* resistente à meticilina, isoladas de úlceras de pé diabético tem mostrado ser uma grande ameaça à saúde, quer em ambiente hospitalar, quer noutra ambiente não hospitalar (Eleftheriadou *et al.*, 2010).

2.2.2.1. Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus* apresenta-se com uma morfologia de cocos em cacho, e pertencem à família Micrococcaceae. Estas bactérias são cocos Gram positivos que apresentam 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, capsulados e não esporulados. São anaeróbios facultativos, catalase positiva e produzem ácidos pela degradação da glicose, tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Necessitam de um meio rico em sódio (10%) e de temperaturas elevadas, 18 a 40°C, para se multiplicarem (Shimeld, 1999; Ferreira e Sousa, 2000; Lund *et al.*, 2000; Lipsky *et al.*, 2012).

Os estafilococos formam colónias redondas com diâmetro de 2 a 3 mm, brilhantes, lisas e opacas com uma cor que pode variar do branco a amarelo dourado ou alaranjado. Uma vez que toleram elevado teor de cloreto de sódio (NaCl) a incorporação deste em meios de cultura é uma prática corrente quando se pretende obter meios seletivos para o isolamento de estafilococos onde existem populações bacterianas mistas (Ferreira e Sousa, 2000; Lund *et al.*, 2000).

São bactérias que vivem numa relação de comensalismo ou mutualismo com o Homem. Um elevado número de espécies fazem parte da microbiota natural da pele e mucosas, sendo que as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* existem em elevada quantidade na microbiota comensal humana, a primeira com expressão mais relevante na mucosa nasal e a segunda em toda a pele.

Staphylococcus aureus é um microrganismo com capacidade de troca de informação genética com outras espécies de bactérias, o que lhe permite a passagem do fenótipo “sensível” para “resistente” por aquisição de genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis. É considerado um microrganismo patogénico com

bastante relevância em ambiente hospitalar, apresentando resistência a vários grupos de antibióticos (Veves *et al.*, 2006).

2.2.3. Opções terapêuticas no tratamento do pé diabético

O tratamento do pé diabético tem como objetivo o desbridamento de áreas desvitalizadas e calos, realização de curativos com frequência e alívio da pressão exercida sobre as zonas ulceradas (Rocha *et al.*, 2002; Brasileiro *et al.*, 2005; Veves *et al.*, 2006; Benwan *et al.*, 2012; Lipsky *et al.*, 2012). O controlo da infeção é crucial, sendo por vezes necessário começar rapidamente o tratamento via antimicrobianos de largo espectro, enquanto se espera pelos resultados da cultura e do respetivo antibiograma (Rocha *et al.*, 2002; Brasileiro *et al.*, 2005; Veves *et al.*, 2006; Rathur e Boulton, 2007; Lipsky *et al.*, 2012). As infeções bacterianas podem aumentar o risco de desenvolver a síndrome do pé diabético. A identificação de espécies é de grande importância em procedimentos epidemiológicos para indicação adequada de antibióticos a aplicar. A terapêutica escolhida tem que ter em conta o tempo de evolução e a gravidade da úlcera, sendo que pode ser considerada leve, moderada ou grave. Para cada tipo de infeção deve ser utilizado um grupo de antibióticos específicos (Sader e Durazzo, 2003).

As infeções leves são normalmente causadas por *Staphylococcus* e *Streptococcus*, sendo que as principais opções terapêuticas seriam uma cefalosporina de segunda geração (ex. cefuroxima, cefoxitina). Podem ainda ser utilizadas outras opções terapêuticas que incluem a amoxicilina associada a inibidores de beta-lactamases (ex. ácido clavulânico) e clindamicina, sendo que estas terapêuticas estão mais indicadas para infeções moderadas, que normalmente estão associadas à presença de cocos Gram positivo (*Staphylococcus* e *Streptococcus*) e bacilos Gram negativos aeróbios (*E. coli*, *Enterobacter*). De realçar que podem ser divididas em: (i) infeções onde é possível o tratamento ambulatorio e (ii) infeções com necessidade de internamento hospitalar. As terapêuticas mais aconselhadas são as aminopenicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases (ex. amoxicilina/ac.clavulânico ou ampicilina/sulbactam).

As infeções graves encontram-se associadas a cocos Gram positivo (*Staphylococcus* e *Streptococcus*), bacilos Gram negativos aeróbios (*E. coli*, *Enterobacter*), anaeróbios Gram positivo, bacteroides e bacilos Gram negativo não fermentadores (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*). São utilizados diferentes grupos de

antibióticos e com espectro mais amplo, por isso, a utilização de fluoroquinolonas (ex. gatifloxacina, levofloxacina e moxifloxacina), para cocos Gram positivo associada a metonidazol ou clindamicina (fármaco associado a anaeróbios) (Sader e Durazzo, 2003).

A multirresistência a antibióticos por parte das bactérias tem mostrado um elevado incremento que pode estar relacionada com fatores intrínsecos como mutações bacterianas ou ainda pela aquisição de genes de resistência. Assim, devido ao aumento de fenómenos de resistência torna-se prioritário identificar novas fontes de agentes antimicrobianos (Castro, 2012).

O estudo de medidas preventivas para as infeções do pé diabético, bem como dos mecanismos sinérgicos na antibioterapia assumem cada vez mais um papel relevante.

3. Material e Métodos

O trabalho experimental foi dividido em duas etapas: (i) numa primeira etapa foi feito um *screening* da atividade antimicrobiana do Kéfigel® e de cada um dos seus componentes - pelo método de difusão em disco e determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB); (ii) numa segunda etapa foi avaliado o potencial de ação biológica do produto Kéfigel®, pelo efeito exercido na taxa específica de crescimento dos microrganismos testados.

3.1. Amostras utilizadas

O produto Kéfigel® foi gentilmente cedido para este estudo pelo comerciante (Patente:103283; Marca: 391156 Registo no INPI Instituto Nacional de Propriedade Industrial). As amostras de alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill) utilizadas neste trabalho tiveram duas origens: (i) adquiridas numa ervanária situada na cidade de Vila Real, e (ii) colhidas em maio em jardins localizados em Vila Real. As amostras de urtiga (*Urtica dioica* L) tiveram também duas origens: (i) obtidas numa superfície comercial de Vila Real, e (ii) colhidas em maio, na aldeia de Torneiros situada nos arredores da cidade de Vila Real (Figura 3.1).

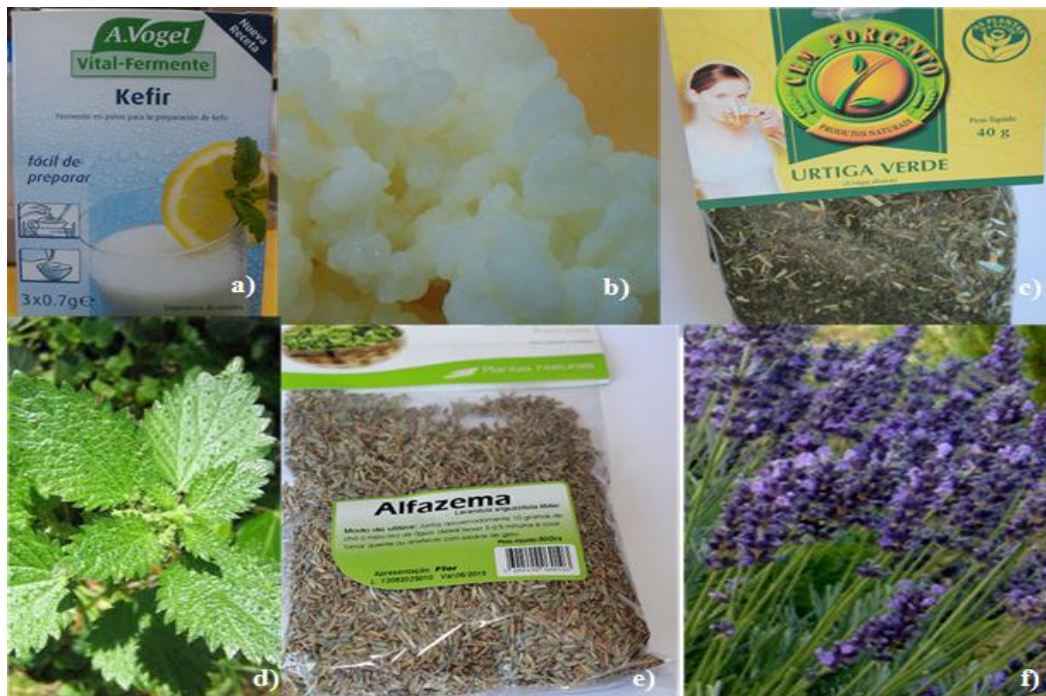


Figura 3.1. Amostras utilizadas de kefir, urtiga e lavanda.

Legenda: a) - b) kefir liofilizado e em leite; c) - d) urtiga comercial e colhida; e) - f) lavanda comercial e colhida.

O material vegetal colhido foi transportado para o laboratório onde foi feita a sua secagem, à temperatura ambiente, em envelopes de papel, no escuro, até ser utilizado. Antes de serem usadas, as amostras foram botanicamente identificadas, por forma a assegurar que eram estas as espécies que iriam ser usadas no trabalho experimental.

Os grãos de kefir foram adquiridos, liofilizados, numa superfície comercial de Vila Real, sendo que os grãos de kefir natural foram obtidos de uma sementeira já existente que se encontrava a crescer em leite de vaca.

3.2. Preparação dos extratos

3.2.1. Preparação dos extratos do Kéfigel®

Para a preparação dos extratos do produto comercial Kéfigel®, foram testados dois métodos: (i) diluição direta em DMSO a 10% (dimetilsulfóxido, Sigma; Portugal), com concentrações a variar de 40 a 80% (m/v); e (ii) diluição em DMSO a 10% com o gel inicialmente liofilizado, na concentração final de 40 mg.mL⁻¹. O *sreenning* da atividade antibacteriana do Kéfigel® foi feito com os extratos liofilizados e dissolvido em DMSO, bem como o produto em bruto, ou seja diretamente.

3.2.2. Preparação dos extratos das plantas

No caso do material colhido, para a obtenção dos extratos de lavanda e de urtiga as flores, folhas e caules foram cortadas em pequenos bocados com uma tesoura de poda. Para todas as amostras vegetais procedeu-se a extração sólido-líquido, baseada na adição de amostra e solvente, de acordo com as metodologias adotadas por Xu e Chang (2007); Özen (2009) e Bahramikia e Yazdanparast (2010), com algumas modificações. Pesaram-se 15 g de amostra (Precisa 205 A, Superbal series, Switzerland), para balões Erlenmeyer e adicionou-se o solvente. Nesta etapa foram testados três solventes, água desionizada, acetona 80% e etanol 70%.

Os balões com o solvente de água e etanol juntamente com a amostra vegetal, foram colocados em banho-maria com agitação, no escuro (1083, GFL-Gesells chaft für Labortechnik mbH, Germany), sendo que os balões com o solvente acetona e a amostra vegetal foram colocados no escuro, à temperatura ambiente, durante a noite. Posteriormente todas as amostras foram filtradas com papel de filtro (Whatman nº1441).

Em seguida, procedeu-se à evaporação completa no evaporador rotativo (Modelo Heidolph OB 2000, Switzerland) a 40°C (à exceção do solvente aquoso que foi ao liofilizador), sendo no fim pesados novamente para a determinação do rendimento de extração.

Finalmente os extratos foram dissolvidos em DMSO a 10%, a uma concentração final de 100 mg.mL⁻¹, a fim de serem testados. Na figura 3.2. encontram-se exemplificadas algumas das etapas da extração sólido-liquido adotado neste trabalho.

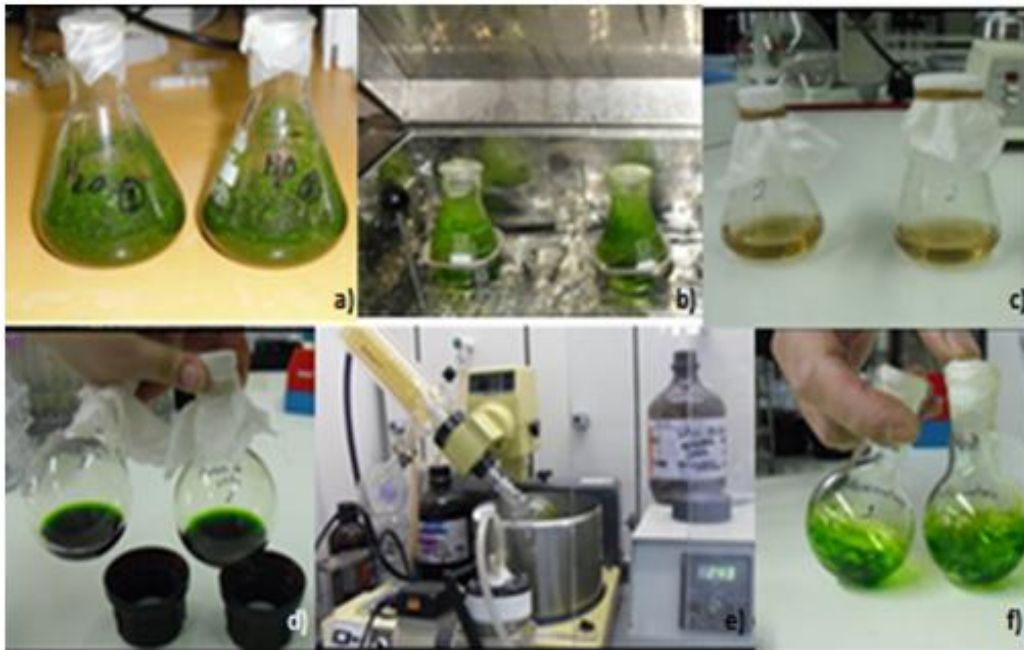


Figura 3.2. Etapas da extração sólido-liquido.

Legenda: a) adição dos solventes; b) banho-maria com agitação; c) extrato aquoso depois da filtração; d) extrato etanólico depois de filtrado; e) - f) evaporação no evaporador rotativo.

3.2.3. Preparação dos extratos dos grãos de kefir

Os extratos dos grãos de kefir foram obtidos por diluição em DMSO a 10%, a uma concentração final de 100 mg.mL⁻¹, no caso dos grãos comerciais diretamente, já que se encontravam liofilizados, e no caso do kefir em leite após prévia liofilização.

O soro do kefir foi obtido através da centrifugação dos grãos, aproveitando-se o sobrenadante e desprezando-se o precipitado.

3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Antes de se proceder à avaliação do efeito antimicrobiano dos diferentes extratos, os isolados usados neste trabalho foram caracterizados pela coloração diferencial de Gram, prova da catalase e por testes Api Staph BioMérieux®.

3.3.1. Origem dos isolados

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos de amostras recolhidas pelos profissionais de saúde do serviço da Consulta do Pé Diabético (serviço de cirurgia) do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (CHTMAD), no âmbito dum protocolo estabelecido com a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Departamento de Ciências Veterinárias - ECAV.

Neste estudo, o produto biológico foi analisado no Serviço de Patologia Clínica do CHTMAD e posteriormente as estirpes bacterianas foram transportadas, de acordo com os procedimentos referidos nas normas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (DCV-ECAV, UTAD).

3.3.2. Isolados utilizados

Às estirpes utilizadas foi-lhes atribuída uma referência constituída por letras (MJMC) e números, sendo que os números reconhecem a diversidade de colónias.

Assim, foram utilizadas neste estudo 20 estirpes de *Staphylococcus aureus*, sendo que 10 foram identificadas como resistentes à meticilina (MRSA) e 10 sensíveis à meticilina (MSSA). De acordo com a tabela 3.1. pode-se observar a descrição dos isolados obtidos por cada amostra de úlceras crónicas plantares, a idade e o sexo do doente diabético, bem como a referência atribuída a cada isolado bacteriano, a sua presumível identificação e a suscetibilidade à meticilina.

Tabela 3.1. Descrição dos isolados utilizados neste trabalho.

Referência	Idade	Sexo	Estirpe
MJMC001	85	F	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC002	58	M	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC003	42	F	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC004	58	M	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC007	79	M	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC008	91	F	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC009	51	M	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC010	71	M	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC011	83	F	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC014	40	M	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC016	47	F	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC018	76	M	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC020	64	M	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC021	49	M	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC022	76	F	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC024	64	F	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC025	72	M	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC026	77	M	<i>S. aureus</i> MSSA
MJMC027	66	M	<i>S. aureus</i> MRSA
MJMC029	64	M	<i>S. aureus</i> MRSA

3.3.3. Meios de Cultura

Neste trabalho foram utilizados os seguintes meios de cultura: (1) BHI (Brain Heart Infusion) – meio complexo e rico em nutrientes que facilita o crescimento dos microrganismos e (2 e 3) agar MH (*Mueller Hinton*) sólido e líquido – meio complexo de utilização obrigatória de acordo com as normas CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2009) para a realização dos testes de suscetibilidade a antibióticos. A composição e preparação destes meios encontram-se indicadas no Anexo I.

3.3.4. Confirmação dos isolados bacterianos

A caracterização dos isolados pode ser obtida através de uma grande variedade de provas. Neste trabalho consideraram-se a coloração diferencial de Gram, e a prova da catalase.

Coloração diferencial de Gram

Esta técnica permite dividir as bactérias em Gram positivo e Gram negativo, que coram de violeta e vermelho respetivamente. As diferentes colorações devem-se às diferenças na composição química da parede celular. A metodologia empregue para a coloração de Gram encontra-se na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Coloração diferencial pelo método de Gram

Esfregaço	1. Depositar uma gota do meio de cultura sobre a lâmina e espalhar em camada muito fina;
	2. Deixar secar ao ar, ou colocar sobre a chama de um bico de Busen a uma altura onde, com a mão, se suporte o calor, para se evitar a carbonização do esfregaço;
	3. Passar lentamente a lâmina três vezes pela chama;
	4. Deixar arrefecer;
Técnica de coloração	5. Fixar a lâmina numa pinça de Morais Sarmiento;
	6. Cobrir o esfregaço com violeta de metilo durante 1 minuto;
	7. Despejar o excesso do corante;
	8. Adicionar Lugol que atua durante 30 segundos;
	9. Remover o mordente;
	10. Lavar com álcool e/ou acetona até que o produto da lavagem fique transparente;
	11. Lavar com água;
	12. Fazer atuar o corante de contraste, vermelho neutro, durante 1 a 2 minutos;
	13. Lavar de novo com água;
	14. Secar a lâmina entre duas folhas de papel de filtro;
	15. Observar com objetiva x100, utilizar óleo de imersão.

Adaptado de: <http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>

Prova da catalase

Este teste bioquímico (Tabela 3.3) é utilizado para comprovar a presença de catalase, enzima que destrói o peróxido de oxigénio (H₂O₂), originando H₂O e CO₂, e que aparece na maioria dos seres vivos, incluindo nas bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo. A deteção da enzima faz-se juntando às células uma gota de água oxigenada a 3%, ocorrendo ou não a libertação de O₂ visível pelo despreendimento gasoso.

A catalase é produzida por muitos microrganismos e é usualmente empregue para diferenciar *Staphylococcus* (catalase positivos) de *Streptococcus* (catalase negativos).

Tabela 3.3. Prova da catalase.

-
1. Numa lâmina desengordurada e passada previamente ao bico Bunsen, colocar uma gota de água oxigenada;
 2. De um meio sem sangue, recolher uma pequena porção da colónia em estudo e colocar sobre a água oxigenada;
 3. Se se verificar efervescência considera-se a reação como sendo positiva, ou seja, revelou-se a produção de catalase.
-

3.3.5. Identificação dos isolados bacterianos

A identificação das estirpes bacterianas foi efetuada por métodos fenotípicos, nomeadamente através de biotipificação numérica - Api Staph BioMérieux®, tendo sido executada de acordo com as instruções referidas pelo fabricante.

3.3.6. “Screening” de suscetibilidade e classificação da atividade antimicrobiana.

Os ensaios de suscetibilidade dos isolados ao Kéfigel® (em DMSO e bruto), aos extratos vegetais e aos extratos de grãos de kefir, bem como ao soro dos grãos de kefir, foi realizado pelo método de difusão em disco, em meio agar Mueller-Hinton (Oxoid), com base no método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) e de acordo com os procedimentos adaptados do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Trata-se de um método prático, amplamente utilizado em rotina nos laboratórios de

análises microbiológicas para bactérias de crescimento rápido, apresentando uma grande flexibilidade na escolha do número e do tipo de composto a utilizar.

O método adaptado consiste na difusão em agar do composto, com potenciais propriedades antimicrobianas, depositado num disco estéril de papel-de-filtro. A ocorrência de um efeito antibacteriano observa-se pela formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano.

Inicialmente foram preparadas as placas de Petri (92×16 mm, Sarstedt, Germany) contendo 20 mL do meio de cultura Mueller Hinton agar (pH 7,2 a 7,4) adequado ao crescimento da maioria das bactérias. Após a sua preparação, esterilização em autoclave (Modelo 075-L, JSM) e distribuição na câmara de fluxo-laminar (Faster Ultrasafe 48, Faster, S r. l., Ferrara, Italy), procedeu-se à preparação do inóculo a utilizar nos ensaios, a partir dos isolados a testar. Para tal, em condições de assepsia, procedeu-se à realização de uma suspensão em 2 mL de soro fisiológico (Cloreto de sódio, MERCK) com a finalidade de se obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de MacFarland (Figura 3.3).

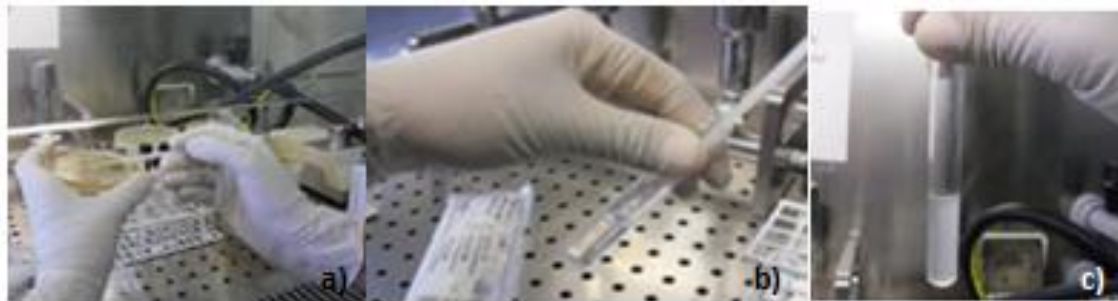


Figura 3.3. Preparação da suspensão bacteriana.

Legenda: a) retirar uma porção de estirpe bacteriana; b) incorporação no soro fisiológico; c) acerto da suspensão bacteriana (0,5 na escala de MacFarland).

Em seguida, na câmara de fluxo-laminar procedeu-se à inoculação das placas pelo método de esgotamento à superfície com a ajuda do distribuidor mecânico (Inoculador 5100 5983, modelo Retro C80, Tipo 01).

Após esta operação, foram colocados discos brancos estéreis de 6 mm de diâmetro (Oxoid CT0998B), onde foram depositados os compostos a testar (Figura 3.4). Foram adicionados 15 μ L de cada composto e utilizados como controlo negativo, o

solvente de ressuspensão (DMSO a 10%) e como controlo positivo, a gentamicina (CN₁₀ - Oxoid CT0024B).

Todos os extratos vegetais, bem como os extratos de grãos de kefir, foram testados a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹, enquanto o extrato do produto comercial Kéfigel® foi testado a uma concentração de 40 mg.mL⁻¹ e em bruto (diretamente). O soro do kefir foi testado diretamente.

Após 24 horas de incubação a 37°C foram registados os diâmetros dos halos de inibição. Todos os compostos foram testados em triplicado e a suscetibilidade foi expressa como média dos halos de inibição (mm) ± EPM (erro padrão da média).

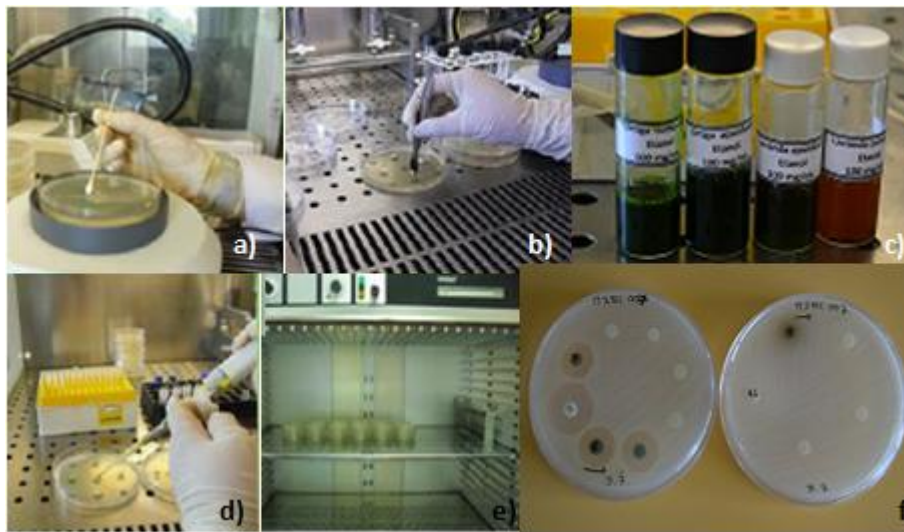


Figura 3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

Legenda: a) inoculação da estirpe bacteriana; b) colocação de discos brancos estéreis; c) alguns dos extratos em estudo; d) colocação dos extratos nos discos; e) incubação na estufa a 7°C; f) exemplo de halos de inibição dos extratos.

A atividade antimicrobiana dos extratos testados foi classificada segundo Aires *et al.*, (2009a), como:

Não Eficaz (-) quando o halo de inibição = 0;

Eficácia Moderada (+) quando 0 < halo inibição < halo de inibição do antibiótico;

Boa Eficácia (++) quando o halo de inibição do antibiótico < halo de inibição < 2× halo de inibição do antibiótico;

Elevada Eficácia (+++) quando o halo de inibição > 2× halo de inibição do antibiótico.

Para a determinação da eficácia antibacteriana relativa, utilizou-se a fórmula segundo Aires *et al.*, 2009b.

$$\text{Eficácia Antibacteriana Relativa (\%)} = \frac{[(\text{halo}_{\text{composto}}) - (\text{halo}_{\text{controlo negativo}})]}{(\text{halo}_{\text{gentamicina}})} \times 100$$

3.3.7. Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de cada estirpe foi determinada, de acordo com os resultados obtidos no *screening*, para a gentamicina e para os extratos vegetais etanólicos. O método utilizado para a determinação das CMI foi a microdiluição em placa, usando a resazurina como indicador de crescimento bacteriano, de acordo com a metodologia adaptada de Sarker *et al.*, (2007). Este método consiste numa oxidação-redução, em que a resazurina se torna rosa e fluorescente quando a “resorufina” é reduzida por oxirredutases existentes no interior das células viáveis, permitindo a deteção de crescimento microbiano em volumes extremamente pequenos de solução sem a utilização de um espectrofotómetro.

Inicialmente, preparou-se a suspensão bacteriana, transferindo-se em condições assépticas uma pequena porção da cultura em estudo para um frasco contendo 50 mL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid) e incubou-se a 37°C com agitação de 50 rpm (Unitronic Orbital 320, J. P. Selecta) de modo a obter culturas “*overnight*” para cada ensaio. Após 12-18 horas de incubação procedeu-se à leitura da densidade ótica (DO) a 500 nm, estando esta compreendida entre 0,5 e 1,0.

A solução de resazurina foi preparada dissolvendo 135 mg em 40 mL de água destilada esterilizada.

Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços de fundo plano e tampa (Tissue Culture Testplates, Orange Scientific, 96 Wells Flat, USA), sendo distribuídos asepticamente 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid) nos poços da coluna 1, 2, 4, 5 e 6. Em toda a coluna 1 foi depositado 20 µL de suspensão bacteriana com 20 µL do indicador (resazurina) sendo esta coluna utilizada como controlo de crescimento bacteriano. Por sua vez na coluna 2, foi testada a gentamicina na concentração de 4 mg.mL⁻¹, adicionando-se 100 µL sendo feitas depois 8 diluições seriadas (4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 e 0,03 mg.mL⁻¹) após as quais se introduziu 20 µL de suspensão bacteriana e 20 µL de resazurina. De igual forma se procedeu nos poços da primeira linha das colunas 4, 5 e 6 (3 repetições) onde foram colocados 100 µL extratos vegetais

etanólicos de forma a ter a concentração de $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em cada poço e, em seguida procedeu-se às mesmas diluições seriadas transferindo-se $100\ \mu\text{L}$ da linha A até à linha H, exceto o extrato etanólico de alfazema que de acordo com os resultados obtidos, teve uma concentração de $100\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ na coluna 1, seguindo as 8 diluições seriadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e $0,78\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). As placas foram tapadas e incubadas a 37°C durante 24 horas. Este procedimento foi realizado para as 20 estirpes em estudo.

A leitura foi realizada de forma visual através da observação da mudança de cor azul (original da resazurina) para rosa (caracterizado pela redução da resazurina). Nos poços onde a cor permaneceu azul, ou seja, não ocorreu redução do corante, indica inviabilidade bacteriana. Por sua vez, nos poços onde se observou mudança de cor de azul para rosa considerou-se que havia viabilidade bacteriana. Deste modo foi determinada a concentração mínima inibitória, ou seja, a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento microbiano.

Para completar o estudo das CMI's realizou-se ainda um ensaio *in vitro* complementar a este, no qual se procedeu a sementeira em meio sólido Mueller-Hinton do inóculo presente no alvéolo da microplaca, logo a seguir ao alvéolo considerado como CMI. O objetivo deste ensaio foi o determinar se os extratos tinham um efeito bactericida ou bacteriostático. Este ensaio *in vitro* é também designado como Concentração Mínima Bactericida (CMB). Após o plaqueamento, as placas são deixadas a incubar durante a noite a $37\ ^\circ\text{C}$ para confirmar se existe ou não crescimento bacteriano. Se não ocorrer crescimento então considera-se que o extrato tem um efeito bactericida enquanto se houver crescimento o extrato é considerado com efeito bacteriostático.

3.3.8. Atividade do Kéfigel® - produto comercial

Em função dos resultados obtidos, o potencial de ação biológica do produto Kéfigel®, foi avaliado pelo efeito exercido na taxa de crescimento específico dos microrganismos. Estes ensaios foram desenvolvidos em microplacas, através de leituras no espectrofotómetro de $1\text{h}30\text{min}$ em $1\text{h}30\text{min}$ até às 9 h de crescimento.

As diferentes suspensões bacterianas a usar neste ensaio, foram inicialmente ajustadas por densidade ótica, estando esta compreendida entre 0,2-0,3.

Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços de fundo plano e tampa, sendo distribuídos asepticamente $200\ \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton nos poços da coluna

1 e 100 μL nos poços da coluna 2 e 3. Na coluna 2 foi adicionado 100 μL de gentamicina na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} , e na coluna 3 foi adicionado 100 μL de extrato de Kéfigel® (40 mg.mL^{-1}). Na coluna 5 foram colocados 200 μL de suspensão bacteriana como indicador de crescimento da estirpe, na coluna 6 e 7 foram colocados 100 μL de suspensão bacteriana sendo adicionado posteriormente 100 μL de gentamicina na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} e 100 μL de extrato de Kéfigel®.

Nas linhas B e C (repetições) fez-se o mesmo procedimento anteriormente indicado. Este procedimento foi realizado para as 20 estirpes em estudo.

O cálculo da taxa específica de crescimento (μ) foi feito, tendo em conta a fase de crescimento exponencial, usando a fórmula:

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu t$$

Sendo o N_t : número de microrganismos após o tempo de crescimento exponencial; t: tempo; N_0 : número de microrganismos inicial; μ : taxa específica de crescimento.

3.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa SPSS V.17 (SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA), com a comparação de médias analisada através do teste de Wilcoxon.

4. Resultados e Discussão

4.1. Confirmação dos isolados

Coloração diferencial pelo método de Gram

Uma das provas realizadas para a caracterização dos isolados bacterianos foi a coloração de Gram, com a finalidade de confirmar o Gram dos 20 isolados testados. Verificou-se que a totalidade dos isolados eram Gram positivo, devido à cor violeta (Figura 4.1) que apresentaram. As bactérias de Gram positivo, devido à constituição da sua parede celular, têm a capacidade de reter o corante violeta de metilo (um dos corantes utilizado na coloração de Gram).

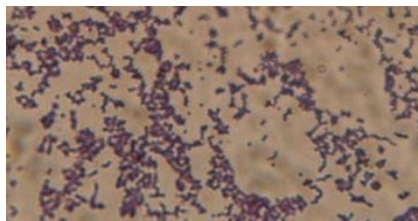


Figura 4.1. Coloração de Gram.

Fonte: este Trabalho

Prova da catalase

Todos os 20 isolados avaliados neste estudo apresentaram uma reação positiva (Figura 4.2), pois em contacto com a água oxigenada observou-se efervescência. Assim, pode-se constatar que os isolados apresentam a enzima que degrada o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, sendo por isso catalase positiva.

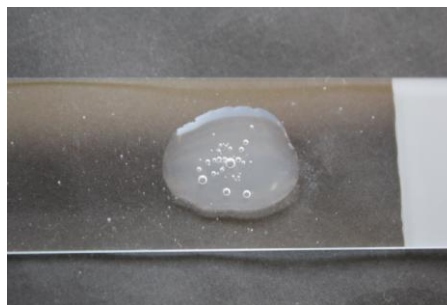


Figura 4.2. Prova da catalase.

Fonte: este Trabalho

4.2. Identificação dos isolados bacterianos

Pelo método de biotipificação numérica (Api Staph BioMérieux®), foi observado que os 20 isolados testados pertencem à espécie *Staphylococcus aureus* (Figura 4.3). De realçar que o código obtido era diferente para vários isolados assim como a percentagem de identificação obtida.

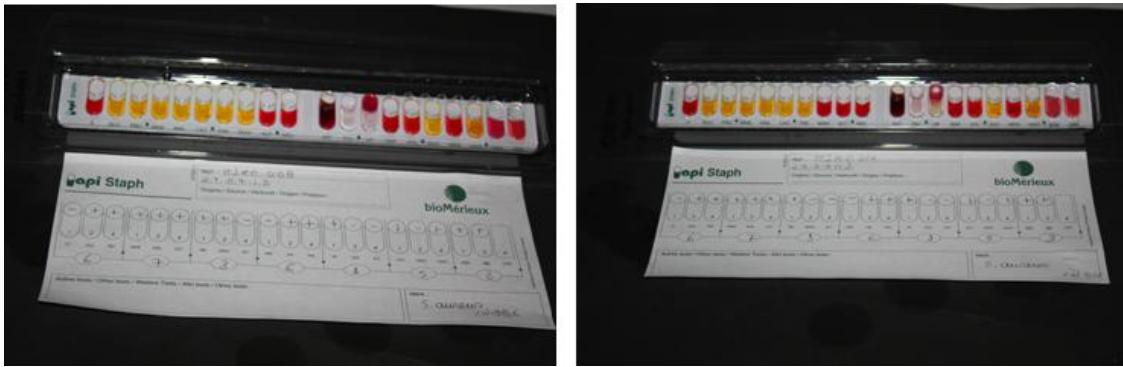


Figura 4.3. Resultados dos testes do Api Staph BioMérieux®.

Fonte: este Trabalho

4.3. “Screening” de suscetibilidade e classificação da atividade antimicrobiana

No presente estudo foi testada a capacidade antimicrobiana do produto comercial Kéfigel® e dos respetivos componentes, extrato de urtiga e lavanda em diferentes solventes, e grãos de kefir, em estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e sensíveis à meticilina (MSSA), isoladas de infeções de úlceras de pé diabético. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4.1 a 4.4. O antibiótico, gentamicina (CN₁₀), foi testado na concentração recomendada pelo CLSI (2009) e, para além de controlo, serviu como um termo de comparação. Os resultados do “screening” da atividade antibacteriana traduzem-se nas medições dos halos de inibição observados (expressos em milímetros), para os diferentes compostos e para as diferentes estirpes de *S. aureus*. Com esta análise pretendeu-se apenas avaliar se existe ou não um potencial efeito antibacteriano (traduzido pelo halo de inibição).

Verificou-se que apenas os extratos etanólicos de urtiga e lavanda apresentaram atividade antibacteriana, avaliada por este método. Já para os extratos aquosos e

acetónicos das plantas, e extratos de grãos de kefir e Kéfigel®, por este método de avaliação da atividade antibacteriana, não foi detetada a formação de halos de inibição.

Da análise dos resultados apresentados nas tabelas, podemos observar que apenas os extratos etanólicos apresentam atividade antibacteriana e destes, aqueles que foram obtidos de amostras apanhadas diretamente do campo, foram os que apresentaram uma atividade superior comparativamente aos extratos oriundos de amostras comerciais (Tabelas 4.2 e 4.3). De entre os diferentes extratos, a atividade antibacteriana variou entre: (i) os 11,3 e os 19,3 mm na urtiga apanhada; (ii) os 11,6 e os 20,3 mm na urtiga comprada; (iii) entre os 8,7 e os 21,3 mm na lavanda apanhada; e (iv) os 7,3 e os 11,0 mm na lavanda comprada. As diferenças entre os valores médios de atividade antibacteriana foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) para os extratos de lavanda, enquanto que para os extratos de urtiga foram não significativas ($p > 0,05$), o que sugere que para a lavanda a atividade antibacteriana depende da origem da planta (Tabela 4.3).

Comparando a atividade antibacteriana de todos os extratos com a do antibiótico comercial (gentamicina), de acordo com a classificação proposta por Aires *et al* (2009a), verificamos que entre os extratos etanólicos se observou eficácia moderada numa estirpe de urtiga apanhada (MJMC026) e em 2 estirpes de lavanda apanhada (MJMC002 e MJMC004), o que significa que para a generalidade das estirpes estudadas e neste método de determinação da atividade antibacteriana, o antibiótico utilizado como padrão revelou ser mais eficaz. Contudo, pela proximidade de valores médios dos halos de inibição, entre os extratos apanhados etanólicos e o antibiótico, podemos claramente constatar que estes extratos podem ser um instrumento importante na opção terapêutica contra a microbiota do pé diabético.

Tabela 4.1. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos controlos determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm).

Estirpe	<u>DMSO</u>	<u>Gentamicina</u>
MJMC 001 (MSSA)	n. d.	17,7 ± 0,6
MJMC 002 (MSSA)	n. d.	19,7 ± 0,6
MJMC 003 (MRSA)	n. d.	24,7 ± 1,5
MJMC 004 (MSSA)	n. d.	20,7 ± 1,2
MJMC 007 (MSSA)	n. d.	22,3 ± 1,2
MJMC 008 (MSSA)	n. d.	20,3 ± 1,5
MJMC 009 (MRSA)	n. d.	22,7 ± 1,5
MJMC 010 (MRSA)	n. d.	20,0 ± 1,0
MJMC 011 (MRSA)	n. d.	20,7 ± 1,5
MJMC 014 (MRSA)	n. d.	21,0 ± 2,7
MJMC 016 (MSSA)	n. d.	20,7 ± 2,3
MJMC 018 (MSSA)	n. d.	20,7 ± 2,5
MJMC 020 (MRSA)	n. d.	21,3 ± 1,5
MJMC 021 (MSSA)	n. d.	23,0 ± 0,0
MJMC 022 (MRSA)	n. d.	21,3 ± 1,5
MJMC 024 (MSSA)	n. d.	20,3 ± 1,2
MJMC 025 (MRSA)	n. d.	19,3 ± 1,5
MJMC 026 (MSSA)	n. d.	19,7 ± 1,5
MJMC 027 (MRSA)	n. d.	21,0 ± 1,0
MJMC 029 (MRSA)	n. d.	19,3 ± 0,6

Legenda: n. d. – nada detetado

Tabela 4.2. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de urtiga, em diferentes solventes, determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm) e respetiva classificação (entre parêntesis).

Estirpe	<u>Urtiga I</u>	<u>Urtiga II</u>	<u>Urtiga I</u>	<u>Urtiga II</u>	<u>Urtiga I</u>	<u>Urtiga II</u>
	extrato etanólico	extrato etanólico	extrato acetona	extrato acetona	extrato aquoso	extrato aquoso
MJMC 001 (MSSA)	11,3 ± 0,6 (-)	11,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 002 (MSSA)	17,3 ± 0,6 (-)	16,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 003 (MRSA)	19,3 ± 2,5 (-)	19,0 ± 1,7 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 004 (MSSA)	15,7 ± 1,2 (-)	15,7 ± 1,5 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 007 (MSSA)	18,3 ± 1,5 (-)	16,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 008 (MSSA)	15,3 ± 2,1 (-)	15,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 009 (MRSA)	19,3 ± 2,1 (-)	20,0 ± 2,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 010 (MRSA)	16,7 ± 0,6 (-)	17,3 ± 1,2 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 011 (MRSA)	18,0 ± 1,0 (-)	17,3 ± 1,2 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 014 (MRSA)	16,3 ± 2,1 (-)	16,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 016 (MSSA)	16,7 ± 1,5 (-)	17,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 018 (MSSA)	17,7 ± 0,6 (-)	18,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 020 (MRSA)	17,3 ± 0,6 (-)	18,3 ± 1,5 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 021 (MSSA)	17,3 ± 0,6 (-)	16,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 022 (MRSA)	16,7 ± 0,6 (-)	15,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 024 (MSSA)	17,0 ± 0,0 (-)	16,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 025 (MRSA)	17,7 ± 0,6 (-)	17,7 ± 1,2 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 026 (MSSA)	18,3 ± 0,6 (-)	20,3 ± 1,5 (+)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 027 (MRSA)	18,3 ± 1,5 (-)	18,7 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 029 (MRSA)	16,0 ± 1,0 (-)	17,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)

Os resultados são expressos em termos de valores médios ± EPM (erro padrão da média) de 3 repetições.

Legenda: I-apanhada; II-comprada ; n.d. - atividade antimicrobiana não detetada; classificação da atividade antibacteriana: não eficaz (-); eficácia moderada (+); boa eficácia (++); elevada eficácia (+++).

Tabela 4.3. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de lavanda, em diferentes solventes, determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm) e respetiva classificação (entre parêntesis).

Estirpe	<u>Lavanda I</u>	<u>Lavanda II</u>	<u>Lavanda I</u>	<u>Lavanda II</u>	<u>Lavanda I</u>	<u>Lavanda II</u>
	extrato etanólico	extrato etanólico	extrato acetona	extrato acetona	extrato aquoso	extrato aquoso
MJMC 001 (MSSA)	8,7 ± 0,6 (-)	7,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 002 (MSSA)	21,3 ± 0,6 (+)	n.d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 003 (MRSA)	20,3 ± 1,2 (-)	8,7 ± 1,5 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 004 (MSSA)	20,7 ± 1,5 (+)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 007 (MSSA)	15,7 ± 1,5 (-)	8,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 008 (MSSA)	13,0 ± 1,7 (-)	n.d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 009 (MRSA)	21,3 ± 0,6 (-)	11,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 010 (MRSA)	16,0 ± 1,0 (-)	8,3 ± 1,5 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 011 (MRSA)	20,3 ± 2,5 (-)	8,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 014 (MRSA)	14,0 ± 2,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 016 (MSSA)	17,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 018 (MSSA)	16,3 ± 1,5 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 020 (MRSA)	16,7 ± 1,2 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 021 (MSSA)	17,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 022 (MRSA)	16,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 024 (MSSA)	15,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 025 (MRSA)	17,0 ± 1,0 (-)	8,7 ± 1,5 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 026 (MSSA)	16,7 ± 0,6 (-)	n.d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 027 (MRSA)	17,3 ± 1,5 (-)	9,3 ± 0,6 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 029 (MRSA)	16,7 ± 1,5 (-)	8,0 ± 1,0 (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)

Os resultados são expressos em termos de valores médios ± EPM (erro padrão da média) de 3 repetições.

Legenda: I-apanhada; II-comprada; n.d. - atividade antimicrobiana não detetada; classificação da atividade antibacteriana: não eficaz (-); eficácia moderada (+); boa eficácia (++); elevada eficácia (+++);

Tabela 4.4. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de grãos de Kefir e Kéfigel® determinada pelo diâmetro dos halos de inibição (mm) respetiva classificação (entre parêntesis).

Estirpe	<u>Grão de Kefir</u> (leite)	<u>Grão de Kefir</u> (comprado)	<u>Soro de kefir</u>	<u>Kéfigel®</u> (bruto)	<u>Kéfigel®</u> (DMSO)
MJMC 001 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 002 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 003 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 004 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 007 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 008 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 009 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 010 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 011 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 014 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 016 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 018 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 020 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 021 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 022 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 024 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 025 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 026 (MSSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 027 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)
MJMC 029 (MRSA)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)	n. d. (-)

Os resultados são expressos em termos de valores médios \pm EPM (erro padrão da média) de 3 repetições.

Legenda: n.d. - atividade antimicrobiana não detetada; classificação da atividade antibacteriana: não eficaz (-); eficácia moderada (+); boa eficácia (++); elevada eficácia (+++).

Comparando os resultados obtidos, neste desenho experimental, entre as estirpes sensíveis à meticilina (MSSA) e resistentes à meticilina (MRSA), observámos que os extratos etanólicos de urtiga geralmente apresentaram uma maior atividade antimicrobiana para as estirpes MRSA. Assim, para a urtiga apanhada, os halos de inibição variaram entre 16,0-19,3 mm para as estirpes MRSA, e entre 11,3-18,3 mm para as estirpes MSSA. O mesmo padrão de comportamento foi observado para a urtiga comprada, com valores de halos de inibição entre 15,7-20,0 mm nas estirpes MRSA e 11,7-20,3 mm nas estirpes MSSA (Tabela 4.2). A mesma tendência foi também observada nos extratos de lavanda (apanhada e comprada). De um modo geral para os extratos de lavanda, as estirpes MSSA revelaram ser menos sensíveis, do que as MRSA (Tabela 4.3), mostrando em geral menores halos de inibição.

Na figura 4.4 exemplifica-se o aspeto das placas, após o procedimento experimental efetuado para o “*screening*” inicial em agar sólido com discos.

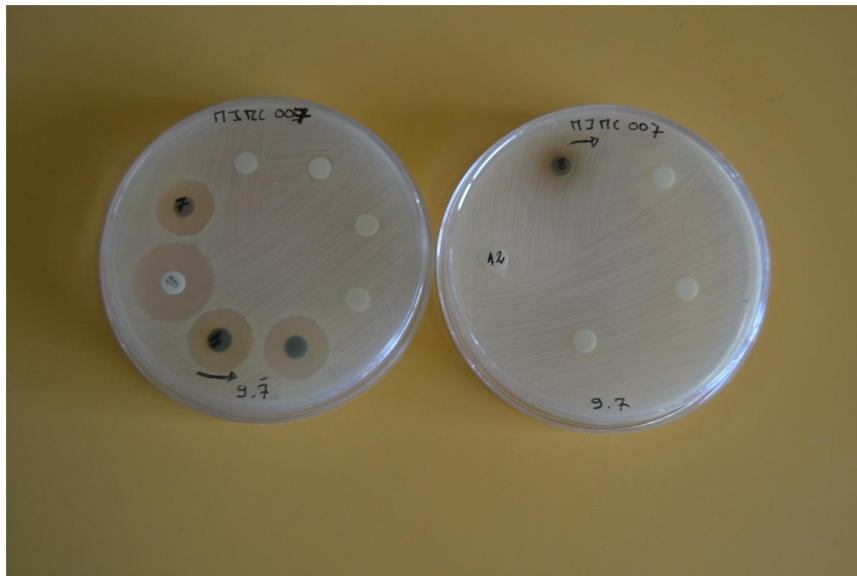


Figura 4.4. Halos de inibição nas placas inoculadas.

Fonte: Este trabalho

Analisando os resultados em termos de eficácia antibacteriana relativa, isto é, quantificando a diferença de atividade antibacteriana entre extratos e antibiótico, observamos que apenas os extratos etanólicos de lavanda comprada apresentam valores menores que 50% de eficácia relativa (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Eficácia antibacteriana relativa (%) dos extratos etanólicos vegetais

Estirpe	<u>Urtiga I</u>	<u>Urtiga II</u>	<u>Lavanda I</u>	<u>Lavanda II</u>
MJMC 001 (MSSA)	65,9 ± 5,5	66,0 ± 1,1	49,0 ± 1,7	41,6 ± 4,7
MJMC 002 (MSSA)	89,7 ± 2,8	84,7 ± 0,5	105,2 ± 5,3	n.d.
MJMC 003 (MRSA)	70,7 ± 15,4	77,5 ± 12,0	82,5 ± 1,6	35,0 ± 4,1
MJMC 004 (MSSA)	76,1 ± 1,3	75,9 ± 8,0	100,2 ± 8,5	n. d.
MJMC 007 (MSSA)	76,1 ± 11,3	74,8 ± 5,8	70,1 ± 3,7	36,0 ± 6,3
MJMC 008 (MSSA)	72,8 ± 6,1	75,6 ± 3,2	64,2 ± 10,3	n.d.
MJMC 009 (MRSA)	81,1 ± 13,1	88,2 ± 6,5	94,5 ± 9,1	48,5 ± 1,3
MJMC 010 (MRSA)	87,2 ± 6,8	86,6 ± 3,0	80,2 ± 7,6	42,0 ± 9,8
MJMC 011 (MRSA)	87,9 ± 2,0	83,9 ± 2,0	98,4 ± 9,8	40,6 ± 5,9
MJMC 014 (MRSA)	77,7 ± 17,0	78,6 ± 9,7	68,1 ± 18,3	n. d.
MJMC 016 (MSSA)	81,3 ± 13,1	86,0 ± 7,3	82,7 ± 5,9	n. d.
MJMC 018 (MSSA)	90,1 ± 8,1	87,7 ± 8,4	79,9 ± 12,9	n. d.
MJMC 020 (MRSA)	83,0 ± 3,4	86,2 ± 8,6	78,4 ± 8,2	n. d.
MJMC 021 (MSSA)	73,9 ± 2,5	72,5 ± 2,5	73,9 ± 4,4	n. d.
MJMC 022 (MRSA)	79,5 ± 5,9	73,8 ± 7,7	75,0 ± 1,1	n. d.
MJMC 024 (MSSA)	85,2 ± 4,9	80,5 ± 4,0	73,9 ± 6,4	n. d.
MJMC 025 (MRSA)	94,6 ± 5,1	91,8 ± 9,8	88,0 ± 2,0	44,6 ± 5,0
MJMC 026 (MSSA)	97,8 ± 10,4	104,2 ± 15,7	85,0 ± 4,0	n.d.
MJMC 027 (MRSA)	92,9 ± 11,5	89,0 ± 2,3	82,9 ± 11,3	44,4 ± 1,4
MJMC 029 (MRSA)	81,6 ± 3,3	89,8 ± 4,9	86,4 ± 10,2	41,5 ± 6,2

Legenda: I-apanhada; II-comprada;

Relativamente aos outros três extratos testados (extrato etanólico de urtigas apanhada e comprada e extrato etanólico de lavanda apanhada) apresentam valores maiores que 50%, o que indica que estes (lavanda apanhada, urtiga comprada e urtiga apanhada) são mais eficazes do que metade do antibiótico na concentração testada, ou seja para baixas concentrações os extratos são mais eficazes. Para três estirpes (MJMC026 com extrato etanólico de urtiga comprada, MJMC002 e MJMC004 com extrato etanólico de lavanda apanhada) obtivemos valores médios superiores a 100%, o que indica que estes extratos são tão eficazes como o antibiótico testado como controlo.

De acordo com a formulação do Kéfigel®, os extratos vegetais de urtiga e lavanda que o compõem são aquosos (informação cedida pelo comerciante) e considerando os resultados obtidos neste trabalho, os extratos de lavanda e de urtiga em água não apresentaram ação antimicrobiana. No entanto convém salientar que o efeito biológico dum extrato vegetal e para o mesmo solvente, aquoso ou outro, depende da fração da planta utilizada, da época de colheita, da temperatura de extração e da concentração do extrato, entre outros (Kunle, *et al.*, 2012, Shahid, 2012). Assim, poderá colocar-se a hipótese de que os extratos aquosos de urtiga e lavanda, se testados numa concentração superior a 100 mg.mL^{-1} , venham a mostrar efeito antibacteriano. Por outro lado, estes resultados sugerem que o efeito antibacteriano atribuído ao Kéfigel® poderá advir da sua composição em urtiga e lavanda e não tanto pelas bactérias lácticas associadas aos grãos de kefir. De facto, relativamente aos grãos de kefir e ao produto comercial, Kéfigel®, extrato e em bruto, verificamos que por este método não se observou nenhuma atividade antibacteriana (Tabela 4.4). Estes resultados foram contraditórios aos observados em outros estudos, já que vários autores atribuíram atividade antibacteriana ao kefir (Pool-Zobel *et al.*, 1993; Zacconi *et al.*, 1995; Ota, 1999; Diniz *et al.*, 2003; Feijó, 2010). Neste contexto, foi implementada outra metodologia para avaliação do efeito biológico do Kéfigel®.

4.4. Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Tendo em conta os resultados obtidos através do “*screening*” inicial, determinaram-se as Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB), somente para os extratos vegetais em etanol.

De acordo com Andrews (2001) a concentração mínima inibitória (CMI) pode ser definida como a concentração mínima de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, após um período de incubação de 18-24 horas. Este parâmetro tem sido amplamente utilizado e é considerado uma ferramenta para a avaliação do perfil de suscetibilidade dos microrganismos a agentes antimicrobianos e/ou estudar novos compostos cuja ação pode apresentar um efeito antimicrobiano.

Na tabela 4.6 apresentam-se os valores médios obtidos para a concentração mínima inibitória dos extratos etanólicos vegetais. Em relação ao extrato de urtiga, os valores de CMI variaram entre 0,0625-0,500 mg.mL⁻¹. Na urtiga apanhada, os valores de CMI mínimos foram encontrados para a estirpe MJMC009 e os máximos para as estirpes MJMC001, MJMC008 e MJMC022. Quanto à urtiga comprada, os CMI mínimos foram encontrados para as estirpes MJMC008, MJMC009, MJMC011 e MJMC014, e os valores máximos para MJMC001. Relativamente ao extrato de lavanda apanhada, as CMI variaram entre 0,0625-1,000mg.mL⁻¹, respetivamente para as estirpes MJMC004 e MJMC001.

Relativamente ao extrato de lavanda comprada apresentou valores de CMI bastante superiores, variando entre 1,5625 mg.mL⁻¹, para MJMC002, MJMC009, MJMC018 e MJMC022, e 25,000 mg.mL⁻¹, para a estirpe MJMC001. Assim em função destes resultados, a estirpe MJMC001 é considerada a menos sensível, apresentando sempre os valores mais altos para as CMI, confirmando os resultados prévios do “*screening*” em disco, nos quais se observaram halos de inibição de menores dimensões. A estirpe MJMC009 é a estirpe que demonstrou ser mais sensível aos extratos, mostrando os valores de CMI mais baixos (Tabela 4.6), confirmando também os valores previamente obtidos no “*screening*”.

Comparando as estirpes MSSA com as estirpes MRSA, no extrato de urtiga apanhada temos variação de valores entre 0,188-0,500 e 0,0625-0,500, respetivamente. No extrato de urtiga comprada os valores variam entre 0,0625-0,500 para estirpes MSSA, e entre os 0,0625-0,250 para as estirpes MRSA. Em relação a lavanda apanhada temos variação entre 0,0625-1,000 para estirpes MSSA, e 0,125-0,250 para as estirpes MRSA, nos extratos de lavanda comprada os valores variam entre 1,5625-25,000 para as estirpes MSSA, e entre 2,3438-18,750 para as estirpes MRSA. Assim, não se verificaram diferenças entre os CMIs para *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina e *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Na figura 4.5 exemplifica-se o aspeto das microplacas, após o procedimento experimental para a obtenção das CMI.

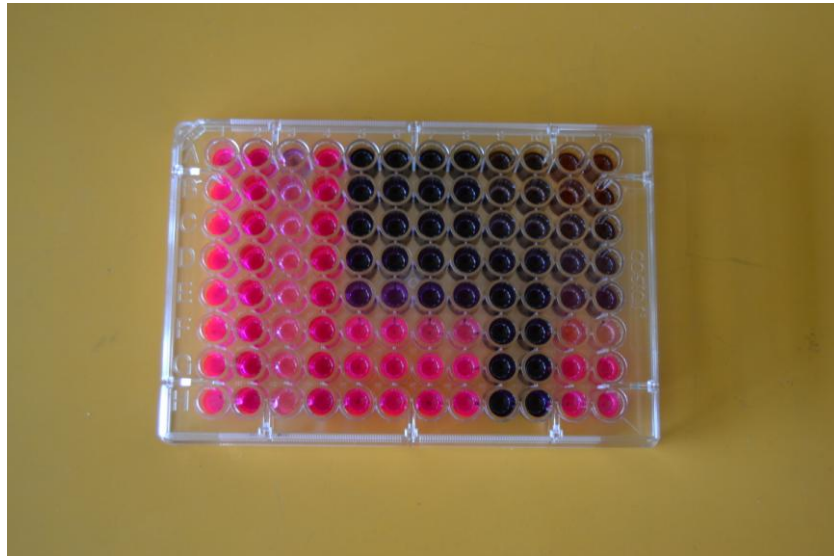


Figura 4.5. Microplacas durante a observação dos resultados das CMIs.

Fonte: Este trabalho

A classificação do efeito, como bactericida ou como bacteriostático, dos extratos vegetais, avaliado pela ausência ou presença de crescimento bacteriano (sementeira em meio sólido Mueller-Hinton do inóculo presente no alvéolo da microplaca, localizado logo após ao alvéolo considerado como CMI), encontra-se na tabela 4.6. Este ensaio conhecido como Concentração Mínima Bactericida (CMB), mostrou que ambos os extratos de urtiga (apanhada e comprada), bem como os extratos de lavanda apanhada, apresentaram maioritariamente efeito bacteriostático. Por outro lado, os extratos de lavanda comprada têm efeito essencialmente bactericida, o que de certo modo é surpreendente, atendendo aos resultados anteriores, nomeadamente porque foram estes os extratos com menor halos de inibição e com menores CMI.

Estes resultados sugerem que o Kéfigel® poderá ter uma atividade antibacteriana, considerada mais de carácter bacteriostático que lhe advém dos extratos vegetais.

Tabela 4.6. Concentração Mínima Inibitória ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Concentração Mínima Bactericida, para os extratos etanólicos de urtiga e lavanda

Estirpe	Urtiga apanhada	Urtiga comprada	Lavanda apanhada	Lavanda comprada
MJMC 001 (MSSA)	0,500 ± 0,000 +	0,500 ± 0,000 +	1,000 ± 0,000 +	25,000 ± 0,000 +
MJMC 002 (MSSA)	0,250 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	1,5625 ± 0,000 *
MJMC 003 (MRSA)	0,250 ± 0,000 *	0,188 ± 0,088+	0,250 ± 0,000 *	6,250 ± 0,000*
MJMC 004 (MSSA)	0,188 ± 0,088 +	0,125 ± 0,000 +	0,0625 ± 0,000 +	12,500 ± 0,000 +
MJMC 007 (MSSA)	0,188 ± 0,088 +	0,125 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	4,688 ± 2,210 *
MJMC 008 (MSSA)	0,500 ± 0,000 +	0,0625 ± 0,530 +	0,250 ± 0,000 +	12,500 ± 0,000 +
MJMC 009 (MRSA)	0,0625 ± 0,000 +	0,0625 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	1,5625 ± 0,000 *
MJMC 010 (MRSA)	0,125 ± 0,000 +	0,188 ± 0,088 +	0,250 ± 0,000 +	3,125 ± 0,000 *
MJMC 011 (MRSA)	0,125 ± 0,000 +	0,0625 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	2,3438 ± 1,1049 *
MJMC 014 (MRSA)	0,125 ± 0,000 +	0,0625 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	2,3438 ± 1,1049 *
MJMC 016 (MSSA)	0,250 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	6,250 ± 0,000 *
MJMC 018 (MSSA)	0,250 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	0,500 ± 0,000 +	1,5625 ± 0,000 *
MJMC 020 (MRSA)	0,125 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	3,125 ± 0,000 *
MJMC 021 (MSSA)	0,188 ± 0,088 +	0,188 ± 0,088 +	0,188 ± 0,088 +	6,250 ± 0,000 *
MJMC 022 (MRSA)	0,500 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	1,5625 ± 0,000 *
MJMC 024 (MSSA)	0,375 ± 0,177 +	0,125 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	6,250 ± 0,000 *
MJMC 025 (MRSA)	0,250 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 +	6,250 ± 0,000 *
MJMC 026 (MSSA)	0,250 ± 0,000 +	0,250 ± 0,000 *	0,250 ± 0,000 +	6,250 ± 0,000 *
MJMC 027 (MRSA)	0,250 ± 0,000 *	0,250 ± 0,000 +	0,125 ± 0,000 +	9,375 ± 4,419 *
MJMC 029 (MRSA)	0,250 ± 0,000 *	0,188 ± 0,088 *	0,250 ± 0,000 +	18,750 ± 8,839 *

Legenda: Mínima Atividade Bacteriana: * - Atividade bactericida; + - Atividade bacteriostática.

Nota: Os resultados são expressos em termos de valores médios ± EPM (erro padrão da média) de 3 repetições.

4.5. Atividade do Kéfigel® - produto comercial

No “*screening*” inicial o Kéfigel® não apresentou aparentemente atividade antibacteriana, assim optou-se por avaliar o seu potencial de ação biológica pelo efeito exercido na taxa de crescimento específico dos microrganismos.

Os ensaios foram realizados em microplacas, com a avaliação do crescimento por densidade ótica durante 9 horas de incubação. Os resultados encontram-se na tabela 4.7 e figuras 4.6 a 4.11.

Verifica-se que a presença do Kéfigel® afeta a maioria das estirpes *S. aureus* MSSA, já que em 8 delas se observou alteração do crescimento. De facto, as estirpes MJMC001, MJMC007, MJMC008, MJMC021 e MJMC024 mostraram praticamente ausência de fase exponencial, comparativamente ao crescimento da bactéria em meio, denotando um efeito bacteriostático pela presença do Kéfigel®, geralmente após as 3 ou 6 horas de incubação, dependendo da estirpe, conforme exemplos das figuras 4.6 e 4.7. A incubação da estirpe MJMC004 com o Kéfigel®, mostrou também um efeito bacteriostático, ausência de fase exponencial marcada, até às 6 horas, seguindo-se um ligeiro aumento na D.O. o que pode sugerir adaptação da estirpe às condições de cultura (Figura 4.8). Por outro lado a incubação das estirpes MJMC018 e MJMC026 com o Kéfigel®, mostrou um efeito bactericida a partir das 6 horas, com uma diminuição acentuada na D.O., conforme exemplo da figura 4.9.

No caso das estirpes MRSA, a presença do Kéfigel® mostrou um efeito bacteriostático em três das estirpes, nomeadamente MJMC003, MJMC010 e MJMC020, conforme tabela 4.7 e exemplos da figura 4.10. Um efeito bactericida foi também observado na estirpe MJMC014, logo nas primeiras horas de incubação (Figura 4.11).

Assim, os resultados sugerem que a presença do Kéfigel® tem um efeito nas estirpes *S. aureus* isoladas de úlceras do pé diabético e avaliadas neste trabalho sendo que essa ação é mais notória nas estirpes MSSA, comparativamente às estirpes MRSA, já que apresentou atividade em 8 das 10 estirpes. Além disso, os resultados obtidos vêm confirmar a hipótese anterior de que o Kéfigel® tem uma ação mais bacteriostática do que bactericida.

Tabela 4.7. Classificação do efeito no crescimento e valores médios da taxa específica de crescimento (μ).

MSSA	<u>Bactéria + Meio</u> μ	<u>Bactéria + Kefir</u> μ/ efeito	<u>Bactéria + CN</u> μ
MJMC 001	0,145 ± 0,014	Bacteriostático	0,072 ± 0,021
MJMC 002	0,200 ± 0,009	0,148 ± 0,074	0,162 ± 0,021
MJMC 004	0,130 ± 0,003	Bacteriostático	0,106 ± 0,019
MJMC 007	0,137 ± 0,003	Bacteriostático	0,091 ± 0,009
MJMC 008	0,155 ± 0,004	Bacteriostático	0,106 ± 0,008
MJMC 016	0,146 ± 0,017	0,140 ± 0,075	0,104 ± 0,004
MJMC 018	0,152 ± 0,028	Bactericida	0,098 ± 0,010
MJMC 021	0,177 ± 0,040	Bacteriostático	0,090 ± 0,004
MJMC 024	0,104 ± 0,001	Bacteriostático	0,100 ± 0,002
MJMC 026	0,127 ± 0,002	Bactericida	0,108 ± 0,004

MRSA	<u>Bactéria + Meio</u> μ	<u>Bactéria + Kefir</u> μ/ efeito	<u>Bactéria + CN</u> μ
MJMC 003	0,131 ± 0,044	Bacteriostático	0,105 ± 0,009
MJMC 009	0,116 ± 0,048	0,115 ± 0,031	0,143 ± 0,010
MJMC 010	0,155 ± 0,009	Bacteriostático	0,151 ± 0,040
MJMC 011	0,102 ± 0,059	0,093 ± 0,077	0,155 ± 0,026
MJMC 014	0,170 ± 0,040	Bactericida	0,107 ± 0,034
MJMC 020	0,188 ± 0,013	Bacteriostático	0,158 ± 0,005
MJMC 022	0,170 ± 0,004	0,156 ± 0,074	0,128 ± 0,022
MJMC 025	0,164 ± 0,001	0,141 ± 0,045	0,163 ± 0,019
MJMC 027	0,142 ± 0,014	0,123 ± 0,007	0,153 ± 0,032
MJMC 029	0,148 ± 0,012	0,149 ± 0,010	0,160 ± 0,023

Legenda: CN: Gentamicina; μ : taxa específica de crescimento; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

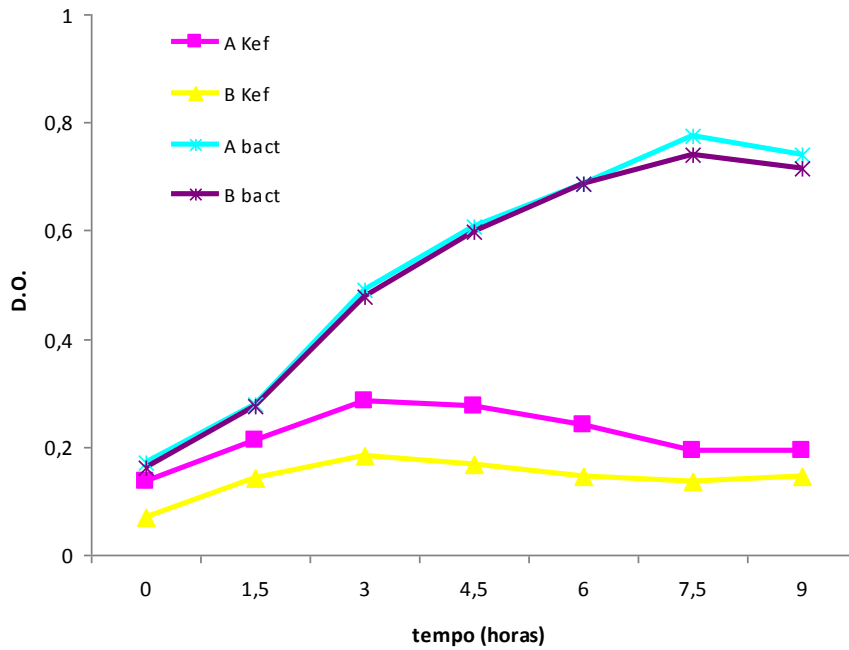


Figura 4.6. Crescimento da estirpe MJMC021 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)

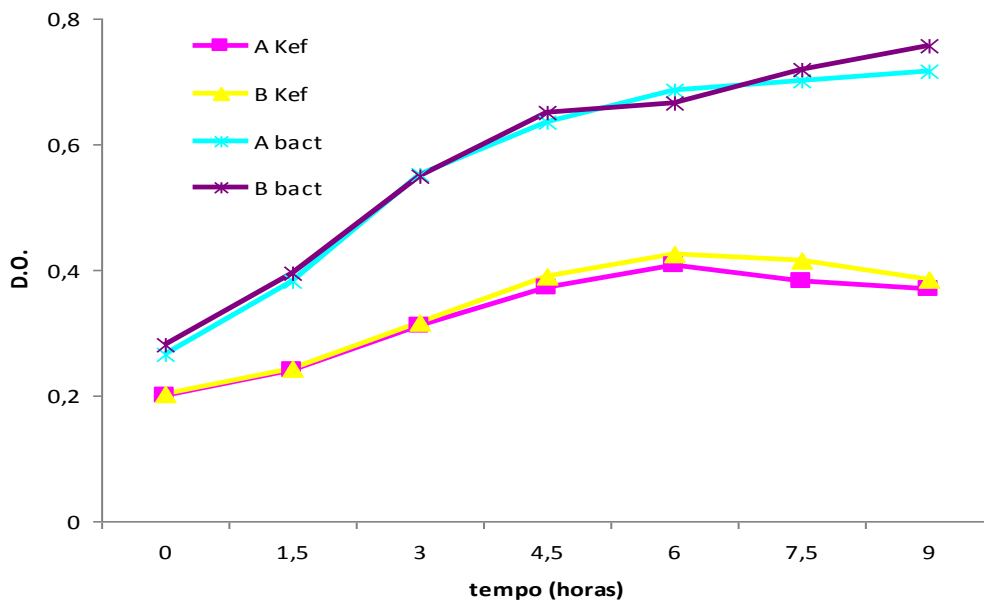


Figura 4.7. Crescimento da estirpe MJMC024 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)

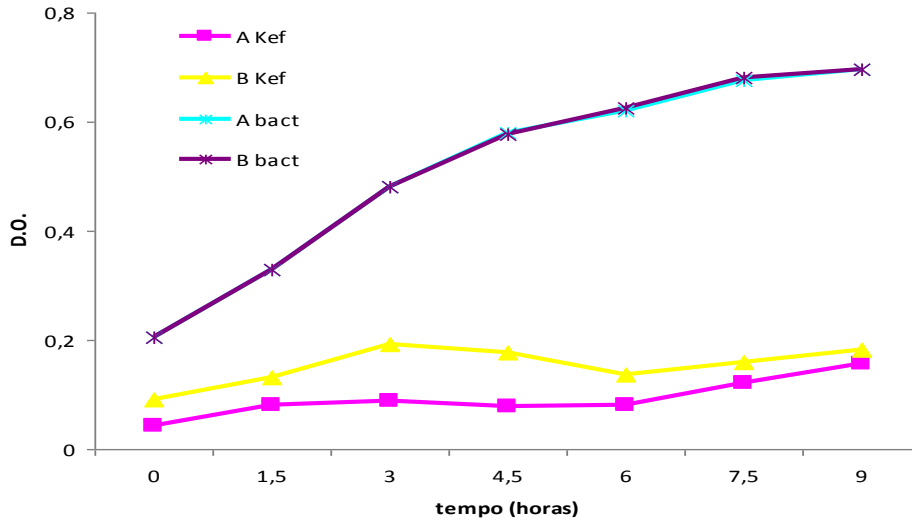


Figura 4.8. Crescimento da estirpe MJMC004 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)

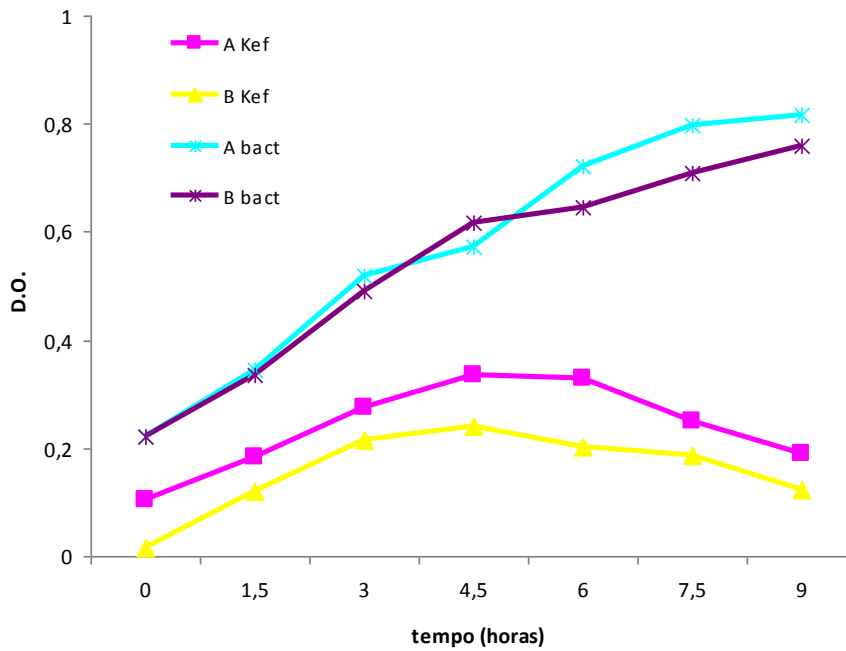


Figura 4.9. Crescimento da estirpe MJMC018 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef).

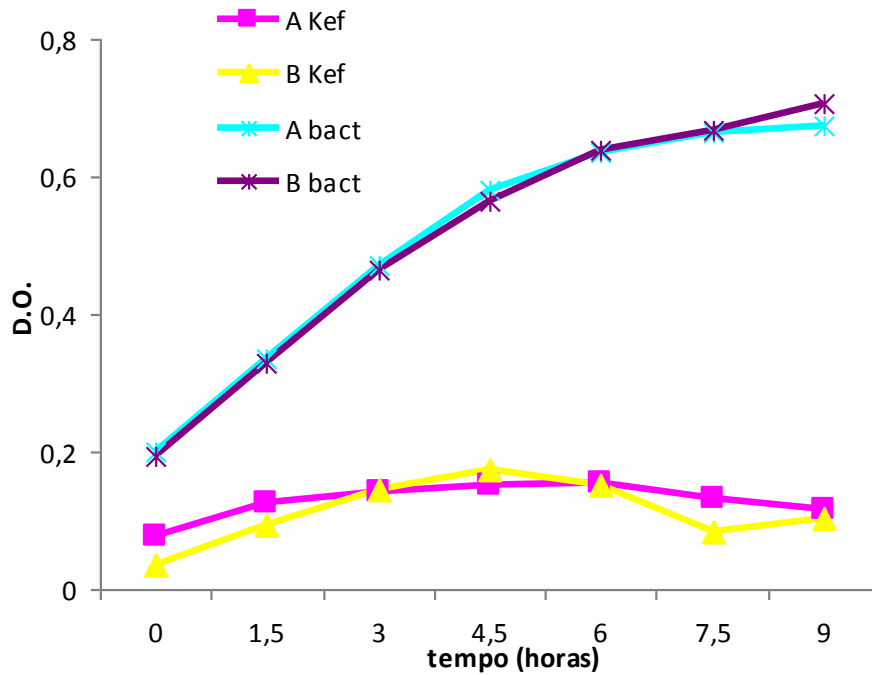


Figura 4.10. Crescimento da estirpe MJMC020 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)

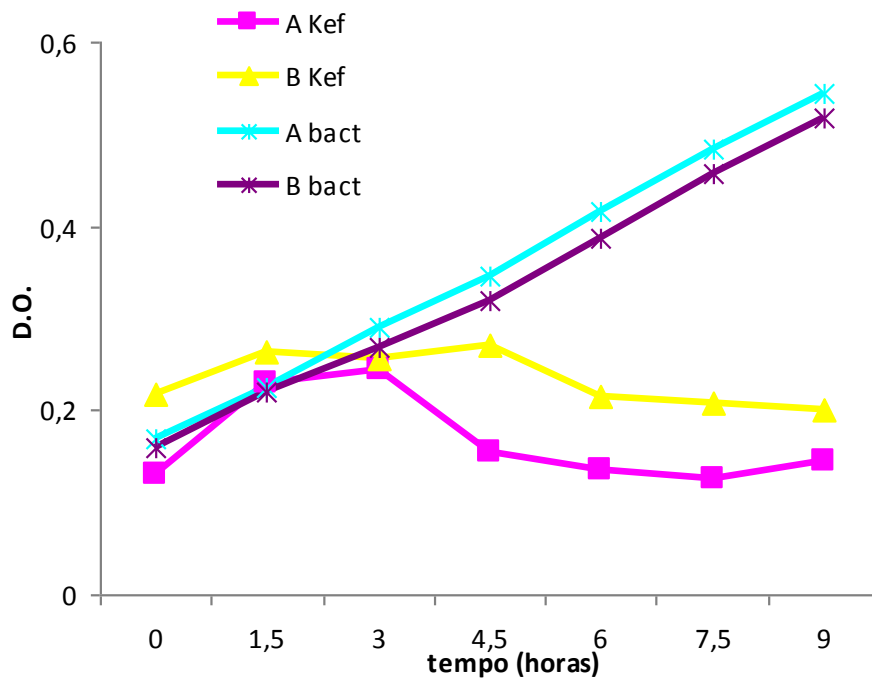


Figura 4.11. Crescimento da estirpe MJMC014 em meio (A bact e B bact) e na presença de extrato de Kéfigel® (A Kef e B Kef)

A incubação das diferentes estirpes na presença da gentamicina, serviu como controlo positivo sendo a concentração testada de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, e ajustados em função da D.O. estabelecida para estes ensaios. Contrariamente ao que seria de esperar, não se observaram diferenças nas taxas de crescimento entre as estirpes incubadas com meio de cultura, comparativamente às estirpes incubadas com caldo Muller-Hinton e gentamicina. Estes resultados provavelmente devem-se à baixa concentração do antibiótico testado. Também as concentrações de Kéfigel® que foram testadas corresponderam na realidade a 50% dos 40 mg.mL^{-1} o que sugere que se a concentração testada aumentar podem ser observados efeitos bactericidas.

Vários estudos referem que a taxa de crescimento de *S. aureus* depende fortemente do tipo de anião no meio de crescimento (Lo Nostro *et al.*, 2005), da temperatura, pH e NaCl (Dengremond e Membré, 1995), pelo que estudos complementares serão necessários de modo a clarificar qual o contributo do Kéfigel® nestes aspetos.

Por outro lado, outros autores notaram que o efeito antibacteriano do kefir resultava da formação de uma película, sobre as lesões tratadas, com efeito bacteriostático, evitando assim a colonização e infeção bacteriana (Rodrigues *et al.*, 2005, Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006). Assim, o Kéfigel® parece ser bastante interessante no potencial controlo das infeções causadas por MSSA e MRSA, associadas a úlceras do pé diabético principalmente em infeções classificadas como infeção leve e em infeção moderada. Poderá ser usado profilaticamente se usado continuamente ou como opção terapêutica em sinergia com os antibióticos, escolhidos de acordo com a gravidade da infeção, permitindo reduzir a dose destes em infeções leves que já se encontram num estado um pouco mais avançado ou que não apresentaram uma boa resposta clínica com o antimicrobiano utilizado inicialmente.

5. Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que os objetivos a que nos propusemos foram atingidos já que conseguimos avaliar o potencial biológico do produto comercial Kéfigel®. Os resultados da concentração mínima inibitória e da mínima atividade bactericida demonstraram que apenas os extratos etanólicos apresentaram atividade antibacteriana, sendo esta maioritariamente bacteriostática. Quanto aos extratos aquosos, estes demonstraram não ter qualquer atividade antibacteriana, na concentração testada. Por outro lado, constatámos que o Kéfigel® apresenta um efeito antibacteriano não tanto por ser bactericida, mas mais por ser bacteriostático, tal como foi demonstrado pelos efeitos na taxa de crescimento.

Assim, somos levados a concluir que o Kéfigel® tal como é comercializado no mercado, tem um potencial interesse como produto antibacteriano se usado frequentemente em feridas de úlceras do pé diabético porque limita a progressão dos isolados *Staphylococcus aureus* associados a esta doença. Não constitui uma alternativa aos antibióticos, mas pode ser utilizado profilaticamente prevenindo assim o risco de infeção. Por outro lado, poderá vir a ser utilizado em associação aos antibióticos, diminuindo assim o tempo de infeção e da possível ocorrência de eventuais fenómenos de resistência. Nesse sentido, mais estudos devem ser feitos, nomeadamente avaliar o efeito do produto em maior concentração e avaliar o efeito sinérgico na presença de antibióticos.

Com o presente estudo podemos referir que o Kéfigel® apresenta alguma atividade biológica e apesar de este já ser um produto aprovado pelo Infarmed, como cosmético, os resultados deste trabalho podem ser inseridos num estudo pré-clínico mais vasto de pesquisa de outras aplicações.

6. Referências Bibliográficas

- Aksu, M. Í., Kaya, M. (2004). Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbial properties of sucuk a Turkish dry-fermented sausage. *Food Control*, 15 591-595.
- Ahmed, L., Goldstein, B. (2006). Diabetes mellitus. *Clinics in Dermatology*, 24 237-246.
- Aires, A., Mota, V. R., Saavedra, M. J., Monteiro, A. A., Simões, M., Rosa, E. A. S., Bennett, R. N. (2009). Initial in vitro evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 2096-2105.
- Aires, A., Mota, V. R., Saavedra, M. J., Rosa, E. A. S., Bennett, R. N. (2009). The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 2086-2095.
- Al Benwan, K., Al Mulla, A., Rotimi, V. O (2012). A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *Journal Infect Public Health*, 5, 1-8.
- Albarrán J. (2001). El pie diabético. *Anales de Medicina Interna*, 18, 9-10.
- Alm, L. (1982). Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Journal of Dairy Science*, 65, 346-353.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal Antimicrob Chemother*, 48 , 5-16.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J. R., Martínez-Hernández, D. (2004) Revisión Probióticos. *Revista Espanhola de Quimioterapia*, 17, 131-139.
- Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal (<http://www.apdp.pt/>)
- Bahramikia, S.; Yazdanparast, R. (2010). Antioxidant Efficacy of *Nasturtium officinale* Extracts Using Various In Vitro Assay Systems. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 3: 283-290.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45(4), 493-496.
- Blanc, B. (1984). The nutritive value of fermented dairy products. *International Dairy Federation Bulletin*, 179, 33-66.

- Benwan, K. A., Mulla, A. A., Rotimi, V. O. (2012). A study of the microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Kuwait. *Journal of Infection and Public Health*, 5, 1-8.
- Bermond P. (1991). Radicaux libres et vieillissement = Fre radicals and aging. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 26, 403-407.
- Boavida, J. M., Fragoso de Almeida, J. P., Massano Cardoso, S., Sequeira Duarte, J., Duarte, R., Ferreira, H., Guerra, F., Medina, J. L., Nunes, J. S., Pereira, M., Raposo, J. (2012). Diabetes: Factos e Números 2011- Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes
- Boulton, A. J. M. (2002). The Diabetic Foot. *Medicine*, 30, 36-40.
- Boulton, A. J. M. (2008). The Diabetic Foot – an update. *Foot and Ankle surgery*, 14, 120-124.
- Brasileiro, J. L., Oliveira, W. T. P., Monteiro, L. B., Chen, J., Jr, E. L. P., Molkenthin, S., Santos, M. A. (2005). Pé diabético: aspetos clínicos. *Jornal Vascular Brasileiro*, 4, 11-21.
- Buse, J. B., Polonsky, K. S., Burant, C. F. (2003). Type 2 Diabetes *mellitus*. In Williams Textbook of Endocrinology 10th ed., P. R. Larsen (ed.). Philadelphia: Saunders, 1427-1468.
- Carvalho, C. B. M., Neto, R., Aragão, L. P., Oliveira, M. M., Nogueira, M. B., e Forti, A. C. (2004). Pé diabético: análise bacteriológica de 141 casos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 48, 406-413.
- Castro, V. P. R. (2012) *Estudo do efeito antimicrobiano de isotiociantos, em isolados de Staphylococcus aureus de origem Humana: Pé diabético*. Relatório final de estágio da UTAD.
- Cavanagh, H. M. A., Wilkison, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oils. *Phytotherapy Research*, 16, 301-308
- Chen, C., Chan, H. M, Kubow, S. (2007). Kefir extracts suppress in vitro proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells bur now normal mammary epithelial cells. *Journal of Medicinal Food*, 10, 416-422.
- CLSI (2009). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2-A10. Wayne, PA:. Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Costa, P., Grosso, C., Gonçalves, S., Andrade, P. B., Valentão, P., Romano, A. (2012) Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chem*, 135, 112-121.
- Cunha, A.P., Nogueira, M.T., Roque, O.R. (2012). *Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A.P., Teixeira, F., Silva, A.P., Roque, O.R. (2010). *Plantas na Terapêutica: Farmacologia e Ensaio Clínicos*, 2.º Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 421-429.
- Diniz, R. O., Perazzo, F. F., Carvalho, J. C. T., Schneedorf, J. M. (2003). Atividade anti-inflamatória de kefir, um probiótico da medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 19-21.
- Dobetsberger, C., Buchbauer, G. (2011). Actions of essential oils on the central nervous system: an updated review. *Flavour Fragr J*, 26, 300-316.
- Elefteriadou, I., Tentolouris, N., Argiana, V., Jude, E., Boulton, A. J. (2010). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Diabetic Foot Infections. *Drugs*, 70, 1785-1797.
- Farnworth, E. R. (2006). Kefir – A complex Probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2, 1-17.
- Feijó, M. B. (2010). - O elixir da saúde In: *Rio Pesquisa* n.11, 13-15.
- Ferreira, W.F.C. & Sousa, J.C.F. (2000). *Microbiologia*, Vol 2. Lisboa: Lidel Edições Técnicas.
- Field, T., Field, T., Cullen, C., Lergie, S., Diego, M., Schanberg, S., Kuhn, C. (2008). Lavender bath oil reduces stress and crying and enhances sleep in very young infants. *Early Hum Dev*, 84, 399-401.
- Gardete Correia, L., Boavida, J. M., Fragoso de Almeida, J. P., Massano Cardoso, S., Sequeira Duarte, J., Duarte, R., Ferreira, H., Guerra, F., Medina, J. L., Nunes, J. S., Pereira, M., Raposo, J. (2013). Diabetes: Factos e Números 2012 – Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63, 364-369

- Gaware, V., Kotade, K., Dolas, R., Dhamak, K., Somwnshis, S., Nikam, V., Khadse, A., Kashid, V. (2011). The magic of Kefir: review. *Pharmacology online* 1,376-386.
- Gonçalves, S., Romano, A. (2012). *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (in press) DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotchadv.2012.09.006>
- Green, M. F., Aliabadi, Z., Green, B. T. (2002). Diabetic Foot: Evaluation and Management. *Southern Medical Journal*, 95, 95-101.
- Gülçin, Í., Küfrevioğlu, Ö. Í., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 2-3, 205-215.
- Halle, C., Leroi, F, Dousset, X., Pidoux, M. (1994). Les kefirs: des associations bactéries lactiques-levures. In: de Roissart H, Luquet FM (Eds). Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques. Vol 2, Uriage, Lorica, 169-182.
- Heydari, I., Radi, V., Razmjou, S., Amiri, A. (2010). Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2, 61-63.
- Karabacak, S., Bozkurt, H., (2008). Effects of *Urtica dioica* and *Hibiscus sabdariffa* on the quality and safety of sucuk (Turkish dry-fermented sausage). *Meat Science*, 3, 288-296.
- Kneifel, W., Ulberth, F., Erhard, F., Jaros, D. (1992). Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. I. Screening of commercially available starter cultures. *Milchwissenschaft*, 47, 362-365.
- Know, C. S., Park, M. J., Cho, J. S., Chang, D. S. (2003). Identification of effective microorganism from kefir fermented milk. *Food Sci Biotech*, 12, 476-479.
- Kritsidima, M., Newton, T., Asimakopoulou, K. (2009). The effect of lavender scent on dental patient anxiety levels: a luster randomized-controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*, 38, 83-87.
- Kubo, M., Odani, T., Nakamura, S. (1992). Pharmacological study on kefir – a fermented milk product in Caucasus. I. On tumor activity. *Yakugaku Zasshi*, 112, 489-495.
- Kunle, O. F., Egharevba, H. O., Ahmadu, P. O. (2012). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* Vol. 4, 101-112.

- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K., Kadowaki, T; Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes *mellitus* (2002). Report of the Committe on the classification and diagnostic criteria of diabetes *mellitus*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 55, 65-85.
- La Rivière, J. W. M., Kooiman, P., Schimdt, K. (1967). Kerifan, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Microbiol*, 59, 269-278.
- Lee, Y-K., Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 241-245.
- Lindsay, J. A. (2008). *Staphylococcus* molecular genetics. *Caister Academic Press*, 264
- Lipsky, B. A., (2004). Medical Treatment of Diabetic Foot Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 104-114.
- Lipsky, B. A., Berendt, A. R., Cornia, P.B., Pile, J.C., Peters, E. J. G., Armstrong, D. G., Deery, H. G., Embil, J. M., Joseph, W. S., Karchmer, A. W., Pinzur, M. S., Senneville, E. (2012). 2012 Infectious Diseases Society of America: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 132-173.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006). Review Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol*, 23, 67-74.
- Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (2000). *The microbiological Safety and Quality of Food*, vol 2. Gaithersburg, Md., EUA: Aspen Publishers.
- Martins, F. S., Nardi, R. M., Arantes, R. M., Rosa, C. A., Neves, M. J., Nicole F. R. (2005). Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *Journal Gen Appl Microbiol*, 51, 83-92
- Mendes, J. J., Marques-Costa, A., Vilela, C., Neves, J., Candeias, N., Cavaco-Silva, P., Melo-Cristino, J. (2012). Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. *Diabetes Res Clin Pract*, 95, 153-161.
- Milman, M. H. S. A., Leme, C. B. M., Borelli, D. T., Katerr, F. R., Baccili, E. C. D. C., Rocha, R. C. M., Senger, M. –H. (2001). Pé diabético: avaliação da evolução e custo hospitalar de pacientes internados no conjunto hospitalar de Sorocaba. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 45, 447-451.

- Moon, T., Wilkinson, J. M., Cavanagh, H. M. A. (2006). Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian Grown *Lavandula* spp. *International Journal of Aromatherapy*, 16, 1, 9-14.
- Ochoa-Vigo, K., Pace, A. E. (2005). Pé diabético: estratégias para prevenção. *Ata Paulista de Enfermagem*, 18, 100-109.
- Orlova, Z. N., Kasatkina, T. N., Okhapkina, V. F. (1980) Use of Robolact and Linolac dry milk mixtures in the overall therapy of infants with acute intestinal infections. *Vopr. Pitan*, 4, 45-57
- Ota, A. (1999) Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic *E.coli* 0-157. *Med. Hypotheses*, 53, 87-88.
- Otes, S., Cagindi, O. (2003). Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54-59
- Özen, T. (2009). Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. *Drug Research*, 66: 187-193.
- Palma Gámiz, J. L., Hernández Madrid, A., Bertomeu Martinez, V., González-Juanatey, J. R., López García-Aranda, V., Calderón Montero, A., Alegría Ezquerra, E., Cadierno Carpintero, M. (2004). Diabetes *mellitus* in clinical cardiology in Spain. Survey by the Working Group on the Heart and Diabetes regarding the importance of diabetes *mellitus* in relation with other cardiovascular diseases. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 57, 661-666.
- Pinto, A., Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., Fernandez, P., La Placa, S., Di Gati, M., Licata, G. (2008). Cardiovascular risk profile and morbidity in subjects affected by type 2 diabetes *mellitus* with and without diabetic foot. *Metabolism*, 57, 676-682.
- Pitta, G. B. B., Castro, A. A., Soares, A. M. M. N., Munis, V. M. T. (2011). Avaliação Epidemiológica de Pacientes com Pé Diabético no Hospital Escola José Carneiro e Unidade de Emergência Armando Lages. *Revista Digital de Podologia*, 38, 8-17.
- Pool-zobel, B. L., Munzner, R., Holzapfel, W. H. (1993) Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* atagenicity assay. *Nutr. Cancer*, 20,261-270
- Powlson, S. A., Coll, A. P. (2010) The treatment of diabetic foot infections. *J Antimicrob Chemother*, 65, 3-9.
- Rathur, H. M., Boulton, A. J. M. (2007). The diabetic foot. *Clinics in Dermatology*, 25, 109-120.

- Riehemann, K., Behnke, B., Schulze-Osthoj, K., (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. *FEBS Letters*, 442, 89-94
- Rocha, J. L. L., Baggio, H.C. C., Cunha, C. A. D., Niclewicz, E. A., Leite, S. A. O., Baptista, M. I. D. K. (2002). Aspectos relevantes da interface entre diabetes *mellitus* e infecção. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 46, 221-229.
- Rodrigues. K. L., Caputo, L. R. G., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., Schneedorf, J. M., (2005). Antimicrobial and healing activity of Kefir and kerifan extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 404-408.
- Rollan, S. (1991). *Journal of Dairy Research*, 58, 497-504 In: Role preventif et curatif d'original-kefir sur les fonctions digestives. *Symbiotic Laboratoire*
- Sacks, D. B., Arnold, M., Bakris, G. L., Bruns, D. E., Horvath, A. R., Kirkman, M. S., Lernmark, A., Metzger, B. E., Nathan, D. M. (2011). Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes *mellitus*. *Clin Chem*, 57,1-47.
- Sader, H. S., Durazzo, A. (2003). Simpósio pé diabético: terapia antimicrobiana nas infecções do pé diabético. *Jornal Vascular Brasileiro*, Vol 2, 1.
- Salminen, S. A., Ouwenhand, A., Benno, Y., Lee, Y. K. (1999). Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci Technol.* 10, 107-110
- Saloff-Coste, C. J. (1998) Kefir. Danone Newsletter, 11 pag.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.
- Schneedorf, J. M. F. S., Anfiteatro, D. (2004). Kefir, um probiótico produzido por microrganismos encapsulados e inflamação. In: Carvalho, J. C. T. *Fitoterápicos Anti-inflamatórios – Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas*. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd.
- Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K. L., Houser, T. A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*, 69, 289-296.
- Shahid, A. A. (2012). Biological activities of extracts and isolated compounds from *Bauhinia galpinii* (Fabaceae) and *Combretum vendae* (Combretaceae) as potential antidiarrhoeal agents. Tese de mestrado
- Shimeld, L. A. (1999), *Essentials of Diagnostic Microbiology*, Delmar Staff, 681pgs

- Silva, S., Cabanelas, N., Esteves, M. C. (2009). Nova Perspectiva para a Diabetes Tipo 1 – A vacina. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 4, 23-26.
- Tahri, A., Yamani, S., Legssyer, A., Aziz, M., Mekhfi, H., Bnouham, M., Ziyat and A. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a conyinuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 95-100.
- Tan, T., Shaw, E. J. Siddiqui, F., Kandaswamy, P., Barry, P. W., Baker, M. (2011). Guidelines – Inpatient management of diabetic foot problems: summary of NICE guidance. *BLM*, 342, 702-707.
- Tison, E. (1992). *Journal of Internal Medicine.*, 251, 29-35. In: Furukawa, N., Iiyama, R., Takahshi, T. (1992). *Role preventif d'original-kefir sur les radicaux libres.* . *Animal Feed Science Technology*, 63,428-436
- Thoreux, K., Schmucker, D.L. (2001). Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *Journal of Nutrition*, 131, 807-812.
- Veves, A., Giurini, J. M., LoGerfo, F. W. (2006). *The diabetic foot 2nd edition* ed.; Humana Press, 2nd edition, 523pgs
- Xu, B. J.; Chang, S. K. C. (2007). A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*, 72: S159-S166.
- World Health Organization (WHO) (2012), acesso em Dezembro de 2012 www.who.int/en
- Yüksekdağ, Z.N. Beyatlı, Y., Aslım, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 663-667.
- Zacconi, C., Parisi, M. G., Sarra, P. G., Dallavalle, P., Bottazzi, V. (1995). Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chickens. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 12, 387-390.
- Zolini, G.P.P. (2006). *Avaliação da atividade de neutrófilos em ratos Wistar (Rattus norvegicus) tratados por Kefir*. Tese de mestrado. Universidade José do Rosário Vellano Unifenas. 37-75.
- Acessos web:
<http://kemahealing.com/herbalism>, consultada em junho de 2013
<http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>, consultada em abril de 2013

Anexos

Anexo I – Meios de cultura

Meio 1- Meio BHI (Brain Heart Infusion) – Oxoid

Composição	g/L
Infusão de cérebro de bezerro	12,5
Infusão de carne de coração	5,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Hidrogenofosfato disódico	2,5
Proteose de peptona	10

Preparação: (a) Suspender 37g em 1L de água destilada; (b) Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15minutos.

Meio 2 – Meio *Mueller-Hinton* agar – Oxoid

Composição	g/L
Infusão de carne desidratada	2
Caseína hidrolisada	17,5
Amido	1,5
Agar-agar	17

Preparação: (a) Suspender 38g em 1L de água destilada; (b) Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15minutos; (c) Distribuir em placas.

Meio 3 – Meio *Mueller-Hinton* Broth – Oxoid

Composição	g/L
Infusão de carne desidratada	2
Caseína hidrolisada	17,5
Amido	1,5

Preparação: (a) Suspender 21g em 1L de água destilada; (b) Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15minutos.