



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE  
CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - SBFIS**

**RAIMUNDO NONATO FARIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO  
EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA DE *Phanera flexuosa*  
(MORIC.) L. P. QUEIROZ (CAESALPINIOIDEAE) E DA  
INIBIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus*  
*aureus* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.**

Vitória da Conquista - BA  
2012

**RAIMUNDO NONATO FARIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO  
EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA DE *Phanera flexuosa*  
(MORIC.) L. P. QUEIROZ (CAESALPINIOIDEAE) E DA  
INIBIÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda

Co-Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Vitória da Conquista - BA  
2012

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Faria, Raimundo Nonato

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (Caesalpinioideae) e da inibição de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos / Raimundo Nonato Faria - 2012.  
129 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regiane Yatsuda; Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012.

1. Plantas Medicinais – *Phanera flexuosa* (Moric.). 2. Farmacorresistência Bacteriana - *Staphylococcus aureus* - MRSA. I. Universidade Federal da Bahia. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. II. Título.

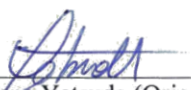
CDU – 633.88

**RAIMUNDO NONATO FARIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO  
EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA DE PHANERA  
FLEXUOSA (MORIC.) L.P. QUEIROZ  
(CAESALPINIOIDEAE) E DA INIBIÇÃO DE FATORES  
DE VIRULÊNCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS**

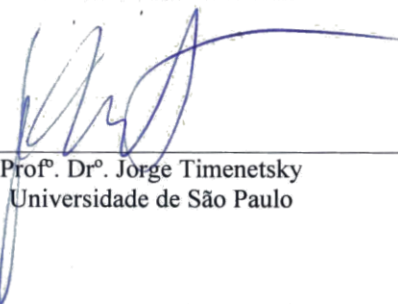
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas/ Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 30 de março de 2012.



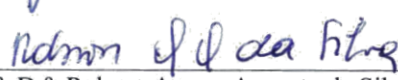
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda (Orientadora)  
Universidade Federal da Bahia



---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Jorge Timenetsky  
Universidade de São Paulo



---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Robson Amaro Augusto da Silva  
Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho aos meus pais, **Pedro Paulo de Farias** e **Margarida Maria de Farias**, que sempre me proporcionaram as melhores condições possíveis para o aprendizado, o desenvolvimento do caráter e da honestidade e permitir uma vida de tantas alegrias.

A **Deliene Martins de Carvalho**, por ser minha companheira amada, meu porto seguro e a força que me aconselha e sustenta nos momentos difíceis, *mo anam cara*.

Ao meu filho **João Pedro de Carvalho Faria**, a luz que ilumina meu horizonte e me faz querer voltar pra casa a cada dia, te amo.

Aos meus sogros **Newton Rodrigues Carvalho** e **Hermelina Martins de Carvalho**, pois sei o quanto torceram por mim e o quanto regozizam-se com esta conquista.

À **Sonaly Martins de Carvalho Araújo**, **Ana Clara Carvalho Araújo** e **Newton Cleber Martins de Carvalho** por existirem e serem uma continuidade da minha família.

Aos professores **Regiane Yatsuda** e **Lucas M. Marques** por suas presenças, amizade e orientações constantes.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus, Jhavé, Alah**, que tem sempre colocado nos caminhos trilhados por mim, pessoas maravilhosas que me acolheram, orientaram e tornaram-se bálsamo nos momentos de dificuldade.

Agradeço às Instituições financiadoras, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq UNIVERSAL 014/2008; 13389/2010-0), **Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia** (FAPESB/PPSUS 0008/2009).

O ingresso no mestrado me abriu um grande horizonte de conhecimentos, de oportunidades e, sem dúvida alguma, um imenso prazer. Hoje tenho a certeza que ninguém caminha sozinho, sempre existe alguém em quem se apoiar nos momentos de fraqueza, ou compartilhar os momentos de alegria. É para elas que apresento meus mais sinceros agradecimentos e carinho.

A **Universidade Federal da Bahia – Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira (UFBA- IMS/CAT)**, por trazer aos rincões do estado baiano a oportunidade e oferta de cursos de graduação e pós-graduação primando pela excelência e qualidade.

Em especial, a minha professora orientadora, **Dra. Regiane Yatsuda**, pela imensa paciência, dedicação, amizade e pela confiança em me aceitar em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos, e por seu exemplo “único” de pesquisadora.

A meu co-orientador de coração, o professor **Dr. Lucas Miranda Marques**, que sempre se mostrou solícito no auxílio em momentos de dificuldade e que abriu as portas da sua família para proporcionar vivências enriquecedoras pessoais e acadêmicas.

Às heroicas professoras **Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães, Dra. Telma de Jesus Soares e Dra. Najara de Oliveira Belo**, por todo empenho, zelo e perseverança para fazer com que o Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da UFBA, continue como um projeto para a geração de profissionais qualificados e comprometidos com a qualidade acadêmica.

A todos os docentes do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFMG, em especial àqueles que participaram mais diretamente da minha formação acadêmica e científica: **Prof. Dr. André Klein, Prof. Dr. Steyner Cortes, Profa. Dra. Miriam T. P. Lopes, Profa. Dra. Janetti N. Francischi, Prof. Dr. Fabrício Moreira, Profa. Dra. Daniele Aguiar, Prof. Dr. Jorge Pesquero e Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte**.

Ao **Prof. Dr. Jorge Timenetsky, Aricelma Pinheiro Franca, Denise Jaqueto, Carlos Augusto Scachetti Almeida, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli, Beatriz A. Cortez, Roberto Cabado M. Junior, Profa. Dra. Dolores Úrsula Mehnet, Telma Alves Monezi, Angelita M. O. Gusmão dos Santos** e demais amigos e professores do ICB-USP que nos receberam carinhosamente e permitiram a realização dos experimentos necessários ao sucesso dessa dissertação.

Aos colegas discentes do programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do ICB/UFMG, por proporcionarem um ambiente acadêmico acolhedor, compartilhando convívio edificante e descontraído que minimizaram as saudades e a distância dos entes

familiares na minha estadia em Belo Horizonte-MG: **Pedro Henrique Gobira Nunes, Ana Flávia Santos Almeida, Thércia Guedes Viana, Giovane Galdino de Souza, Raphael Gomes Ferreira, Viviane Saito, Lindisley Ferreira Gomides, Danielle Bernardes, Alessandra de Castro Montandon, Amilton Cerqueira de Andrade, Rogério Pereira Bilheiro, Paulo Marcelo de Andrade Lima, Lukas Miranda Cangussu Gomes Oliveira, Rosária Dias Aires, Cynthia Dela Cruz,** e tantos outros que pude conviver neste período.

Aos pesquisadores **Dr. Marcelo H. Napimoga, Dra. Juliana T. Clemente-Napimonga, Dr. Humberto M. Spindola, Dra. Mary Ann Folgio, Dr. Pedro Luiz Rosalen e Msc. Avaldo de Oliveira S. Filho** pelo amparo, auxílio, suporte técnico e disponibilidade para a pesquisa.

À **Érika Pereira de Souza e Joseline Cezário Duarte**, por sua amizade, conversas, ensinamentos, convivência e por serem meus guias nos primeiros passos no convívio no grupo de pesquisa e na rotina do laboratório.

Ao “esquadrão dourado”, que com tanto afínco e dedicação ajudou-me na rotina exaustiva dos experimentos realizados, em especial a **Gladistone Correia Messias e Geysa Silva Santos**, assim como a **Márcio Augusto Meira Santana, Mússio Pirajá Mattos e Tiara Oliveira Castro**.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Farmacologia: **Andressa Araújo Oliveira, Camila Brito Cardoso, Cassya Maviony Fiuza Andrade, Daniel Dias Sampaio, Emanuella Gomes Maia, Keila Silva de Jesus, Maiana Ferraz Andrade, Mahala Correia Cláudio, Monique Dutra Fonseca, Naira Kelle Barbosa Ribeiro, Priscila Silva Cunegundes, Rafael Santos Dantas Miranda Dórea, Roberta Alves Mota, e Vinícius Saboia Meireles** por toda amizade e ajuda do transcorrer desta conquista. Nem tenho palavras para agradecer a todos vocês pelo carinho e pelo cuidado que tiveram comigo. Mostrando que realmente temos uma equipe, que sabemos trabalhar em grupo e isso é uma lição que levaremos para toda a nossa vida, um grande ensinamento, além de muitos outros, que se insere neste grande universo que é a nossa pesquisa. Saibam que eu fui apenas à porta-voz de um trabalho desenvolvido com muito empenho de todos, e que se hoje tenho um título eu ofereço todo o reconhecimento a vocês.

Aos amigos e companheiros de laboratório do Programa de Educação Tutorial (PET): **Aparecido Almeida Conceição, Andressa Rodrigues de Oliveira Sousa, Aracely Vieira de Melo, Deivid Alan Luz Santos, Iaquine Santos Da Silva, Jeisa Zielle de Souza Rodrigues, Manoel Neres Santos Junior, Marcelly Machado Santos, Nayara Silva de Macedo, Pedro Aldo Silva Cunegundes, Qeren Hapuk Rodrigues Ferreira e Saulo Rocha Sales**, que apesar de estarem no projeto mais recentemente, puderam contribuir de forma relevante para a consecução de nosso trabalho até o presente instante, e que com certeza irão fazer mais ainda no futuro. Os méritos também são de vocês.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Microbiologia: **Danilo Cordeiro Cariri da Silva, Guilherme Barreto Campos, Simone Gomes de Souza, Daniel Santos Sousa, Verena Macedo e Aline Amorim**, que propiciaram os alicerces sobre o qual nosso projeto se desenvolveu e que sempre se mostraram receptivos, cuidadosos e atenciosos em todos os momentos em que foram solicitados. Que nossa amizade e companheirismo estendam-se além dos limites do tempo e do espaço. Obrigado!

Aos meus colegas de jornada **Anna Carolina Saúde Dantas, Daniela de Oliveira Gusmão, Everaldo Nery de Andrade, Gleisy Kelly Neves Gonçalves, Jacqueline Pereira da Silva, Leda Maria de Castro Coimbra, Lilianny Souza de Brito Amaral, Samira Itana de Souza e Thiago Henrique Caldeira de Oliveira.** Também aos novos colegas: **Erika Pereira de Souza, Luciano E. dos Santos, Jussara A. Silva, Grazielle P. L. dos Santos e Clarissa L. S. e Souza** que enfrentarão as lutas e batalhas por que passamos, mas que apesar de difíceis, são extremamente engrandecedoras e gratificantes. Força sempre!

A **Nádia Mariza Ledo Costa e Juliana Ledo Costa** por abrirem seu lar e me acolherem na minha estadia em Belo Horizonte-MG; permitindo um ambiente de conforto e descontração durante os momentos difíceis do afastamento do lar.

A **Alexandre Pereira Flores**, colega e amigo especial que me acolheu inicialmente em Vitória da Conquista, e sua companheira **Janaína Santos Albuquerque** que permitiram minha adaptação a esta maravilhosa cidade, que apesar de fria em clima exulta calor no coração.

Aos meus **ex-alunos e amigos da Faculdade Guanambi**, que sempre foram e serão a razão precípua do meu ingresso na vida acadêmica e na busca da qualificação contínua neste objetivo; e que mesma na ausência nunca deixaram de manifestar apreço, carinho e desejo de compartilharmos outras vivências.



"Educar é crescer. E crescer é viver. Educação é, assim, vida no sentido mais autêntico da palavra."

**Anísio Spínola Teixeira.**

(1900-1971)

FARIA, Raimundo Nonato. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera Flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (CAESALPINIOIDEAE) e da inibição dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos.** Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

## RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno envolvido em infecções noscomiais e comunitárias. O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric) L.P.Queiroz (EFPF), conhecida como escada de macaco, coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (BA), sobre o crescimento bacteriano e sobre alguns fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (MRSA), isolados de ambientes hospitalares de Vitória da Conquista (BA). O EFPF foi testado nas concentrações entre 4000 a 125 µg/mL na determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Foram estudados *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e 31 isolados resistentes a oxacilina em antibiograma e que apresentaram o gene *mecA* em reação de PCR. Na CIM, as placas foram incubadas a 37°C, 24h, sendo interpretadas de acordo com o crescimento bacteriano e confirmado com o corante ressazurina. Como controle dos experimentos, foi utilizado o veículo, etanol (10%, v/v). Verificou-se a inibição de formação do biofilme de MRSA em 3, 5, 7 e 24 h, após a exposição ao EFPF, avaliou-se a formação de biomassa total com cristal de violeta, viabilidade celular com MTT e morfologia do biofilme usando microscopia confocal após 24 h (isolados clínicos 16A e 92). Foi realizada curva de crescimento de MRSA avaliando a absorbância e viabilidade da cultura bacteriana suplementada com 1% glicose, e tratada com o veículo ou EFPF em concentração subinibitória (CIM<sub>50</sub>). Nos tempos de 5 e 24 h de exposição ao EFPF, da curva foi analisada a expressão gênica de *α-hla*, *PVL*, *sea*, *seb*, *spa*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR* dos isolados 16A e 112. Foram realizadas 03 triplicatas para cada experimento e análise estatística. Todos os isolados testados e a cepa ATCC apresentaram CIM ente 125 e 4000 µg/mL, sendo resultados relevantes de CIM (125 µg/mL) foram obtidos para a cepa ATCC 43300 e para os isolados 27A, 27B, 28, 29, 33A, 43.1, 47.1, 52, 76, 85.1, 85.2, 92 e 113. Quanto ao CBM, ocorreu para os isolados 47.1 e 92 (4000 µg/mL), isolado 12D (1000 µg/mL), e isolado 29 (500 µg/mL). Na inibição de formação de biofilme, os resultados em redução de células viáveis e formação da biomassa total ocorreram nos tempos de 7 e 24h, sendo que na concentração 5000 µg/mL foi efetiva no biofilme de 24 h. Quanto à curva de crescimento, a atividade antimicrobiana de EFPF ocorreu na fase final exponencial e estacionária inicial avaliada pela redução de absorbância, e também a redução da viabilidade celular do EFPF em relação ao veículo nas cepas testadas. Houve diminuição da expressão de *PVL* do isolado 16A tratado com EFPF (p<0,05), aumento da expressão de *icaC*, *icaR* e *spa* do isolado 16A em relação ao veículo (p<0,05). O EFPF apresenta atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e influencia a expressão de fatores de virulência das cepas MRSA testadas, sendo um potencial antimicrobiano e promissora fonte para o isolamento de substâncias bioativas contra microrganismos multirresistentes. PIBIC/CNPq, CNPq Universal 14/2008, 14/2010, 13389/2010-0, Decit/SCTIE/MS (CNPq/FAPESB/SESAB), PERMANECER /UFBA, MEC-PET/SESU/SECAD.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. *Phanera Flexuosa* (Moric.). Farmacoresistência bacteriana. *Staphylococcus aureus*. MRSA.

FARIA, Raimundo Nonato. **Evaluation of the antimicrobial activity of ethanolic leaf extract of *Phanera flexuosa* (Moric.) L.P. Queiroz (CAESALPINIOIDEAE) and inhibition of the virulence factors of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics** Thesis (MsC) - Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a pathogen involved in nosocomial and community infections. The aim of this study was to analyze *in vitro* antimicrobial activity of ethanol extract of leaf *Phanera flexuosa* (Moric) L.P. Queiroz (EFPF), known as monkey ladder, collected in the National Forest Contendas Sincorá (BA) on bacterial growth and on some virulence factors of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), isolated from hospital environments of Vitória da Conquista (BA). The EFPF was tested at concentrations between 4000 to 125 µg/mL in the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). We studied *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and 31 isolates resistant to oxacillin in sensitivity and that had the *mecA* gene in PCR. In the MIC, the plates were incubated at 37°C, 24 are interpreted according to the bacterial growth and confirmed with the dye resazurin. As control experiments, we used the vehicle, ethanol (10% v/v). There was inhibition of biofilm formation of MRSA 3, 5, 7 and 24 h after exposure to EFPF evaluated to complete the formation of biomass with crystal violet, with MTT cell viability and morphology of the biofilm using microscopy confocal after 24 h (16A and 92 clinical isolates). Growth curve was performed by evaluating the absorbance of MRSA and viability of bacterial cultures supplemented with 1% glucose, and treated with vehicle or in EFPF subinhibitory concentration (MIC<sub>50</sub>). In times of 5 and 24 h of exposure to EFPF, the curve was analyzed the gene expression of *hla-α*, *PVL*, *sea*, *seb*, *spa*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR* in isolates 16A and 112. 03 triplicates were performed for each experiment and statistical analysis. All isolates and ATCC strains showed MIC being 125 and 4000 µg/mL, with relevant results from CIM (125 µg/mL) were obtained for strain ATCC 43300 and isolates 27A, 27B, 28, 29, 33A, 43.1, 47.1, 52, 76, 85.1, 85.2, 92 and 113. As to the CBM was isolated for the 47.1 and 92 (4000 µg/ml) isolated 12D (1000 µg/mL), 29 and isolated (500 µg/mL). Inhibition of biofilm formation, results in reduced formation of viable cells and total biomass of the 7 and 24 times, and the concentration 5000 µg/mL was effective in the biofilm 24 h. The growth curve, the antimicrobial activity of EFPF occurred at the end of exponential and stationary initial absorbance measured by the reduction, and also the reduction of cell viability versus vehicle EFPF the strains tested. There was decreased expression of *PVL* treated with isolate 16A EFPF (p <0.05), increased expression of *icaC*, *icaR* and *spa* 16A isolated from the vehicle (p <0.05). The EFPF showed antimicrobial activity against *S. aureus* and influences the expression of virulence factors of MRSA strains tested, and an antimicrobial potential and promising source for the isolation of bioactive compounds against multidrug-resistant microorganisms. PIBIC / CNPq, CNPq Universal 14/2008, 14/2010, 13389/2010-0, Decit / SCTIE / MS (CNPq / FAPESB / SESAB), STAY / UFBA, MEC-PET/SESU/SECAD.

**Keywords:** Medicinal plants. *Phanera flexuosa* Moric.; *Staphylococcus aureus*. MRSA. Antimicrobial activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz. Folhas e caule em seu <i>habitat</i> na Floresta Nacional (FLONA) de Contendas do Sincorá- BA.....	40
Figura 2A	Inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> ATCC 43300 resistente a antibióticos pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	53
Figura 2B	Viabilidade celular do biofilme de <i>S. aureus</i> ATCC 43300 resistente a antibióticos – MRSA pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	53
Figura 3A	Inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 16A) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	54
Figura 3B	Viabilidade celular do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 16A) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	54
Figura 4A	Inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 29) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	55
Figura 4B	Viabilidade celular do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 29) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	55
Figura 5A	Inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 92) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	56
Figura 5B	Viabilidade celular do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 92) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	57
Figura 6A	Inibição da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 112) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	58
Figura 6B	Viabilidade celular do biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a antibióticos – MRSA (isolado 112) pelo extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz – EFPP.....	58
Figura 7	Micrografia dos biofilmes do isolado <i>S. aureus</i> 16A tratados com veículo ou o extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz (EFPP) pela microscopia confocal a laser.....	60

Figura 8	Micrografia dos biofilmes do isolado <i>S. aureus</i> 92 tratados com veículo ou o extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Moric.) L.P. Queiroz (EFPF) pela microscopia confocal a laser.....	61
Figura 9	Determinação da liberação da interleucina IL-1 $\beta$ por macrófagos J774 estimulados com endotoxinas de <i>S. aureus</i> tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v).....	62
Figura 10	Determinação da liberação da interleucina IL-6 por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de <i>S. aureus</i> tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v).....	63
Figura 11	Determinação da liberação da interleucina IL-10 por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de <i>S. aureus</i> tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v).....	64
Figura 12	Determinação da liberação da interleucina TNF- $\alpha$ por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de <i>S. aureus</i> tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v).....	65
Figura 13	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de <i>Phanera flexuosa</i> (EFPF) sobre o crescimento planctônico de <i>S. aureus</i> ATCC 43300.	66
Figura 14	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de <i>Phanera flexuosa</i> (EFPF) sobre o crescimento planctônico do isolado <i>S. aureus</i> 112...	67
Figura 15	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de <i>Phanera flexuosa</i> (EFPF) sobre o crescimento planctônico do isolado <i>S. aureus</i> 16A...	68
Figura 16	Influência do extrato etanólico das folhas de <i>Phanera flexuosa</i> (EFPF) sobre a expressão do gene <i>sea</i> na formação do biofilme de 24 h de <i>S. aureus</i> ATCC 43300.....	69
Figura 17	Influência do extrato etanólico das folhas de <i>Phanera flexuosa</i> (EFPF) sobre a expressão dos genes $\alpha$ - <i>hla</i> , <i>PVL</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> e <i>spa</i> na formação do biofilme de 24 h do isolado de <i>S. aureus</i> 112.....	70
Figura 18	Influência do extrato etanólico das folhas de <i>Phanera flexuosa</i> (EFPF) sobre a expressão do gene $\alpha$ - <i>hla</i> , <i>PVL</i> e <i>spa</i> na formação do biofilme de 24 h do isolado de <i>S. aureus</i> 16A.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos primers utilizados na amplificação das regiões promotoras dos genes .....	49
Tabela 2	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i> (Mor.) L.P. Queiroz - EFPP na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e na concentração bactericida mínima (CBM) de <i>S. aureus</i> resistentes a antibióticos (MRSA).....	51
Tabela 3	Avaliação da presença dos genes de virulência dos <i>S. aureus</i> (MRSA) pelo método de PCR.....	68
Tabela 4	características dos isolados selecionados para avaliação dos fatores de virulência.....	88
Tabela 5	Protocolos de ciclos das reações de PCR.....	89
Tabela 6	Protocolo das quantidades de reagentes por tipo de PCR (x1).....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>agr</i>	Acessory gene regulator
AIP	Autoinducing peptide
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain Heart Infusion
CA-MRSA	Community-Acquired Methicilin resistant <i>S. aureus</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
ClfA/B	Clumping factor A/B
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
D.P.	Desvio padrão
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EFPF	Extrato etanólico da folha de <i>Phanera flexuosa</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – ensaio imuno-enzimático em fase sólida
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia
FDA	Food and Drug Administration
<i>fnb</i>	Fibronectinas estafilocócicas
FLONA	Floresta nacional Contendas do Sincorá
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
EPI	Eflux Pump inihibtors
g	Gramas
h	Horas
HA-MRSA	Hospital-Acquired Methicilin resistant <i>S. aureus</i>
<i>ica</i>	Intercelular adhesin lócus
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IH	Infecção Hospitalar
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
LTA	Ácido lipoteicóico
M	Molar
Min	Minutos
MHC II	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
mL	Mililitros

MRSA	Methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Ministério da Saúde
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Óxido Nítrico
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	Penicilin Binding Protein
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Peptídeoglicano
PNSG	Polissacarídeo Poli-N-succinil- $\beta$ -1,6-glicosamina
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Polyssacaridic intercelular adhesin
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
RNA	Ácido ribonucléico
<i>SarA</i>	Staphylococcal accessory regulator
<i>SCCmec</i>	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
Sea	Enterotoxina estafilocócica tipo A
Seb	Enterotoxina estafilocócica tipo B
Sec	Enterotoxina estafilocócica tipo C
Sed	Enterotoxina estafilocócica tipo D
Spa	Proteína A estafilocócica
TAE	Tampão TRIS-ácido acético EDTA
TLR2	Tooll Like Receptor tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TSB	Tryptone soy broth
TSST-1	Toxina da Síndrome do choque tóxico 1
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UNESCO	Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura
VRE	Vancomycin resistant <i>Enterococcus faecium</i>
v/v	Relação entre volume e volume
$\mu$ M	Micromol
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ g	Microgramas
VISA	Vancomycin intermediate resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	19
2.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS.....	19
2.1.1	Antibioticoterapia.....	20
2.2	RESISTÊNCIA MICROBIANA E INFECÇÕES HOSPITALARES.....	24
2.2.1	Resistência Microbiana.....	24
2.2.2	Infecções Hospitalares.....	25
2.3	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	28
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
2.3.2	Fatores de virulência de <i>S. aureus</i> .....	32
2.4	BIODIVERSIDADE BRASILEIRA.....	37
2.5	<i>Phanera flexuosa</i> (MORIC.) L. P. Queiroz.....	39
2.5.1	Características Botânicas e de localização da <i>Phanera flexuosa</i> .....	39
2.5.2	Composição química e usos medicinais.....	40
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL.....	43
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS.....	43
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EFPP.....	43
4.3.1	Microrganismos.....	44
4.3.2	Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico da folha de <i>P. flexuosa</i> (EFPP) contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA).....	44

<b>4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EFPP SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>S. AUREUS</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.1 Inibição da formação do biofilme.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.2 Avaliação da morfologia do biofilme tratado com EFPP.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.3 Ensaio de liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF-<math>\alpha</math>) e interleucinas (IL-1<math>\beta</math>, IL-6 e IL-10) por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de <i>S. aureus</i> tratados com EFPP.....</b>	<b>47</b>
<b>4.4.4 Avaliação da expressão gênica dos fatores de virulência do <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>50</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 TESTE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EFPP CONTRA <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR EFPP.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DO BIOFILME TRATADO COM EFPP.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-<math>\alpha</math>) E INTERLEUCINAS (IL-1<math>\beta</math>, IL-6 E IL-10) POR MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM EXOTOXINAS DE <i>S. aureus</i> TRATADOS COM EFPP...</b>	<b>61</b>
<b>5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA.....</b>	<b>65</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS), denomina como plantas medicinais todas as espécies silvestres ou cultivadas, quando utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar, modificar um processo fisiológico normal ou patológico ou quando estas são fontes de fármacos ou de seus precursores (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2000). Em 1978, a OMS reconheceu os medicamentos de origem vegetal como recurso terapêutico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001) e recomendou aos países que executassem levantamentos regionais e identificação botânica de espécies vegetais usadas na medicina popular tradicional; estimulassem e indicasse o uso das plantas medicinais com eficácia e segurança comprovadas e contraindicassem o emprego das práticas medicinais populares consideradas inúteis ou prejudiciais (CAVALCANTE, 2010).

A busca de alternativas terapêuticas complementares à farmacoterapia tradicional converteu-se recentemente numa diretriz importante no contexto da saúde pública. Atualmente, a pesquisa de plantas medicinais é eixo fundamental nas políticas de saúde implementadas pelas esferas governamentais como parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006).

As plantas medicinais participam de forma fundamental no aumento do mercado de medicamentos, particularmente no desenvolvimento de fitoterápicos e na identificação de novas moléculas ou protótipos básicos para geração de novos medicamentos sintéticos (YATSUDA, 2004), visto que muitos constituintes de plantas e/ou seus derivados semissintéticos constituem uma parcela apreciável dos fármacos de ponta recém-introduzidos no mercado. Trata-se de um mercado poderoso, por isso, há a necessidade de buscar novas moléculas para assegurar a competitividade na produção de novos medicamentos patenteados. Além disto, também representam a oportunidade de elaborar os medicamentos denominados fitoterápicos, que são extratos vegetais padronizados e validados do ponto de vista da sua eficácia, segurança e qualidade (BHATTARAM; GRAEF; KOHLERT, 2002).

O uso de fitoterápicos no Brasil constitui um mercado de US\$ 400 milhões, e ainda são recomendadas pela Organização das Nações Unidas, que reconheceu o uso de plantas medicinais por 2/3 da população da Terra (BARATA, 2010). Estima-se que o Brasil possui aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas, das quais apenas 8% foram estudadas para identificação de moléculas bioativas e, quatro mil são reconhecidas como plantas medicinais (BRASIL, 2004).

A população brasileira utiliza as plantas medicinais como antimicrobianos, uma forma alternativa para tratamento de diversas infecções. As doenças infecciosas são a segunda causa de morte no mundo e terceira causa de morte em países em desenvolvimento (FAUCI, 2001). Atualmente, a pressão de seleção de microrganismos resistentes pelos antimicrobianos é consequente não só do uso indiscriminado dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar, ao uso terapêutico ou profilático destas drogas em medicina e odontologia humanas, como também de seu emprego em medicina veterinária, na conservação de alimentos, no combate a elementos biológicos daninhos aos seres humanos e na engorda de animais destinados à alimentação. Atualmente, os microrganismos multirresistentes são uma preocupação global, acarretando prejuízos financeiros e sociais estimados em 25.000 mortes e gasto com custos hospitalares por volta de 1,5 bilhão de euros na Europa e 35 bilhões de dólares nos Estados Unidos ao ano, gerando um significativo aumento dos custos totais para o sistema de saúde (LEUNG *et al.*, 2011).

Devido ao rápido aumento mundial da resistência microbiana aos antibióticos disponíveis no mercado, é necessária a pesquisa por novos antimicrobianos contra essas cepas resistentes. Paradoxalmente, a busca por novos agentes antimicrobianos tem declinado nos últimos anos, sendo que as grandes companhias farmacêuticas têm extinguido ou diminuído seus programas de pesquisa (SPELLBERG *et al.*, 2004).

Assim, é importante estudar plantas da caatinga como a *Phanera flexuosa*, conhecida popularmente como escada de macaco, uma planta ainda pouco estudada apesar do seu uso pela população do semiárido. Também é importante avaliar a atividade antimicrobiana da *Phanera flexuosa*, principalmente frente os microrganismos multirresistentes, no intuito de descobrir novos antimicrobianos, assim como, avaliar a influência desse extrato sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*, um dos principais patógenos resistentes envolvidos nas infecções hospitalares.

A descoberta de novos produtos de origem natural ou compostos químicos isolados com atividade biológica é de grande interesse científico, ambiental, tecnológico e econômico para o Brasil, principalmente considerando o possível desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos, além da geração de patentes. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (Moric.) L.P. Queiroz (Caesalpinioideae) contra *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, e sua influência sobre os fatores de virulência desses isolados de ambientes hospitalares de Vitória da Conquista – BA.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais têm formado a base dos cuidados em saúde em todo o mundo, desde os primórdios da humanidade até os dias atuais, sendo que são de grande importância no comércio internacional. O reconhecimento de seu valor clínico, farmacêutico e econômico continua a crescer, embora isso varie muito entre os países. As plantas são importantes fontes para a investigação farmacológica e desenvolvimento de medicamentos, não só quando fitocompostos bioativos são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese de drogas ou como modelos para os compostos farmacologicamente ativos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

O valor dos produtos naturais é claramente reconhecido na descoberta de novos compostos bioativos, sendo que, das novas drogas aprovadas pelo FDA desde 1983 até 1994, 28% procedem inteiramente de produtos naturais, 39% são derivados de produtos naturais e 33% são drogas de origem sintética (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

As espécies vegetais apresentam a capacidade de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias que não estão necessariamente relacionadas de forma direta com a manutenção da vida da planta, mas garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, sendo chamados de metabólitos secundários. A sua produção é determinada por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas. Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente apresentam atividades farmacológicas importantes (SANTOS, 2007).

Os fitofármacos, moléculas com ações terapêuticas de origem vegetal representam uma alternativa tecnológica e econômica em relação ao elevadíssimo custo de desenvolvimento de um novo medicamento realizado através da análise combinatória e síntese de moléculas a partir de moldes biológicos que apresentam diversos efeitos indesejáveis, tais como a própria dificuldade de adaptação ao receptor biológico (LASTRES *et al.*, 2001).

Além disso, as preparações vegetais têm uma característica muito especial que as distinguem de drogas químicas: uma única planta pode conter um grande número de fitocompostos bioativos e ainda mais em uma combinação de plantas. Essa complexidade é um dos desafios mais importantes para a tentativa de identificar um único composto bioativo no universo enorme que inclui um único extrato bruto (MENDONÇA-FILHO, 2006).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e seus metabólitos secundários, tais como alcalóides, esteróides, triterpenos, taninos, saponinas, flavonóides, lignanas (ARRUDA, 2008), têm sido objeto de constante estudo que inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações e extratos totais da droga vegetal (ZANETTI, 2002).

### 2.1.1 Antibioticoterapia

Desde os primórdios da existência humana, o homem vem sendo acometido por doenças de origem microbiana (CLEVELAND *et al.*, 2001; RILEY; WERTZ, 2002). Embora na história da humanidade, a luta contra infecções causadas por microrganismos existe há mais de 50.000 anos, só recentemente foi descoberta a natureza infecciosa de algumas doenças. No início, utilizando-se de conhecimentos empíricos, buscava-se na natureza a cura para todos os tipos de doenças, onde inclusive, se usava extratos vegetais e venenos de animais (WHITE, 2002; PAGES, 2004).

Em 1910, Paul Ehrlich, um médico alemão, após testar centenas de substâncias encontrou um agente quimioterápico efetivo no combate da sífilis, chamado salvarsan, um derivado de arsênico (MCDERMOTT *et al.*, 2003). Em 1929, o primeiro antibiótico, a penicilina G, foi descoberta por Fleming, seguido pelo surgimento de derivados sulfonamídicos na década de 30 e novas classes de antibióticos nos anos seguintes (CHOPRA *et al.*, 2002; BUYNAK *et al.*, 2004).

A penicilina liga-se às proteínas de ligação de penicilina (PBP – *penicilin binding protein*) e possui 04 isoformas (PBP1, 2, 3 e 4), distintamente expressas pelo microrganismo. Ao ser internalizado pelo microrganismo, o fármaco atua ao inibir a atividade de transpeptidase realizada por estas PBP's, responsável pela ligação cruzada entre a N-acetil-glucosamina e o ácido N-acetil-murâmico, que formam o arcabouço da rede do peptidoglicano, principal constituinte da parede celular bacteriana. O evento final é a inativação do agente inibidor de enzimas autolíticas da parede celular bacteriana, levando a célula à lise (TIPPER, 1985; RANG *et al.*, 2007)

A introdução da benzilpenicilina teve um efeito marcante nas taxas de mortalidade provocada por *S. aureus*. Desde então, inúmeros pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais usando-se um ou mais esquemas terapêuticos com antibióticos. Porém, o uso indiscriminado de tais drogas resultou no aparecimento de patógenos resistentes, o que tornou necessário o emprego cada vez maior de novos fármacos (FALCÃO *et al.*, 2002).

A evolução das cepas de bactérias resistentes e multirresistentes através da história tem sido rápida e preocupante. Em 1944, foram descritas as primeiras cepas produtoras de penicilinase em ambiente hospitalar, até então raramente encontradas (ERSON, 2005; ROLAIN; RAULT, 2005). O aumento da prevalência de *S. aureus* resistentes a benzilpenicilina foi inicialmente superado pela introdução das penicilinas semissintéticas, e décadas mais tarde, pelas penicilinas sintéticas (CHAMBERS, 2001).

Em 1959, a meticilina foi introduzida para o tratamento das infecções causadas por *S. aureus* resistentes a penicilinas. No entanto, em 1961, no Reino Unido, ocorreram os primeiros relatos de cepas isoladas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA – *methicilin resistant S. aureus*), que rapidamente apareceram em outros países europeus, com surtos hospitalares provocados por estes organismos. Rapidamente, houve relatos de MRSA isolados no Japão, Austrália, Estados Unidos e na América Latina (POWERS, 2004). A resistência à meticilina e à oxacilina se deve a alteração na expressão das proteínas de ligação a penicilina (PBP's), onde uma variante mutante, a PBP2a tem menor afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, mantendo suas funções na fisiológica do microrganismo, garantindo sua multiplicação (MALOUIN; BRYAN, 1986).

Uma vez que a grande maioria dos clones de MRSA, internacionalmente disseminados nos hospitais, apresentava frequentemente multirresistência a drogas, a vancomicina tornou-se o antibiótico de escolha para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos. A vancomicina é um glicopeptídeo conhecido desde 1956, mas não foi utilizado anteriormente devido o sucesso da meticilina, da oxacilina e de outras isoxazolilpenicilinas (MAINARDI *et al.*, 1995). Os glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina, ainda constituem a terapêutica de escolha nas infecções por MRSA. Contudo, há relatos de cepas de *S. aureus* apresentando susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos, isolados com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e os resistentes à vancomicina (VRSA) no Japão e nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL PREVENTION, 2002; HIRAMATSU *et al.*, 1997).

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes

naturais, como as plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas (DUARTE, 2006).

Entre os anos 1980-2000, as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Dentre as razões que justificam a necessidade urgente do surgimento de novos agentes antibióticos podemos destacar: as doenças infecciosas que são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; as altas taxas de resistência microbiana em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA; e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos atuais fármacos em uso, com maior seletividade e menor toxicidade (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

As plantas podem contribuir na descoberta de novos antibióticos na medida em que é possível que metabólitos secundários com atividade antimicrobiana sejam biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de microrganismos patogênicos às plantas. Gibbons (2004) cita vários exemplos de metabólitos isolados de plantas frente à *Staphylococcus sp.* As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas que dão origem a compostos, tais como, fenóis, terpenos, alcalóides, lecitinas, polipeptídios e poliacetilenos. Além dessas classes, outras substâncias de origem vegetal mostram certa atividade antimicrobiana, como: poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos e glicosídeos (NOGUEIRA, 2000). Os vegetais ricos em taninos, flavonóides, óleos essenciais e poli fenóis estão entre os extratos mais avaliados para esta atividade (COUTINHO *et al.*, 2008). Deste modo, a diversidade de moléculas encontradas nas plantas faz das mesmas promissoras fontes de novos agentes antimicrobianos (COUTINHO *et al.*, 2008).

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1943, Osborn pesquisando a atividade de 2300 plantas superiores contra *S. aureus* e *Escherichia coli*, verificou que as plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microrganismos (PEDERSON; FISHER, 1984). No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal iniciaram-se com Cardoso e Santos (1948) que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas indicadas em terapêutica popular como anti-inflamatórios ou cicatrizantes/antimicrobianos. Destas plantas, cinco extratos apresentaram atividade contra *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus X-19* (SANDERS; WEATHERWAX; MCCLUNG, 1945).



O estudo científico de plantas medicinais usados na medicina tradicional é essencial para diminuir os riscos de efeitos adversos para a população, comprovar a atividade biológica das plantas e perpetuar o conhecimento tradicional sobre essas plantas medicinais. Também é importante que sejam realizados estudos para garantir que estes fármacos naturais sejam seguros, estáveis, padronizados e mais seletivos quanto a sua atividade biológica.

Os produtos naturais são responsáveis diretamente ou indiretamente por cerca de 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem pode chegar a aproximadamente 70% (PHILLIPSON, 2001; YUNES; CALIXTO, 2001). Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas no nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo (ESTEVAM, 2006).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana contra MRSA também aumentou significativamente nos últimos anos. Machado *et al.* (2003) estudando 14 extratos de plantas usadas tradicionalmente no Brasil para tratamento de doenças infecciosas, verificaram que *Punica granatum* (romã) inibiu linhagens de *S. aureus* sensíveis e resistentes (MRSA) a metilicina, concluindo que esta substância apresenta potencial como agente no tratamento de infecções causadas por MRSA. Silva *et al.* (2007) avaliaram a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Anacardium occidentale* (cajueiro) sobre MRSA e obtiveram Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 6,25 mg/mL do extrato, para 4 amostras MRSA. A atividade antimicrobiana positiva do extrato do cajueiro frente a amostras de *S. aureus*, pode ser devido à presença de compostos como taninos (compostos polifenólicos) e alcalóides previamente encontrados na planta, uma vez que estes compostos têm comprovada ação antimicrobiana, e que compostos fenólicos possuem uma ação inespecífica sobre o microrganismo, rompendo a parede celular bacteriana e inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma (HASLAM, 1996; JORGE *et al.*, 1996; AKINPELU, 2001).

Agente modificador de resistência ou da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo revertem à resistência bacteriana a certos antibióticos, ou seja, potencializam a atividade de um antibiótico contra uma cepa resistente (DE MARCO; CUSHING; FREMPONG-MANSO, 2007; GIBBONS, 2004). Dentre esses modificadores, destacamos vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) que alteram a susceptibilidade microbiana aos antibióticos por inibição de bombas de efluxo

(GIBBONS, 2004). A reserpina é um composto isolado da planta *Rawolfia serpentina* conhecida como inibidora de bomba de efluxo (EPI - *efflux pump inhibitors*), em vários microrganismos multirresistentes, incluindo *S. aureus* (GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003; STAVRI *et al.*, 2007; OLUWATUYI; KAATZ; GIBBONS, 2004). Entretanto, a toxicidade da reserpina e seus efeitos adversos em seres humanos, mesmo em baixas concentrações (MASHOUR; LIN; FRISHMAN, 1998), limitou o seu uso, justificando-se assim a busca de EPIs alternativas. Mohtar *et al.* (2009) avaliou o potencial de 13 alcalóides como inibidores e/ou agentes modificadores da resistência através da inibição da bomba de efluxo contra *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e em cinco outros MRSA isolados, apresentando diferentes níveis de susceptibilidade à vancomicina. A notável atividade inibitória de efluxo foi detectada pelo quinino, piperina e harmalina, usando a reserpina como controle positivo. Os resultados deste estudo sustentam a opinião de que um grande número de fitocompostos possui potencial farmacológico e ainda não foram descobertas.

## **2.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA E INFECÇÕES HOSPITALARES**

### **2.2.1 Resistência microbiana**

O uso indiscriminado dos antimicrobianos na comunidade e também no ambiente hospitalar é um fator de risco importante para aparecimento e disseminação da resistência microbiana (ANVISA, 2005). A pressão de seleção de microrganismos resistentes pelos antimicrobianos é consequente não só ao uso terapêutico ou profilático destas drogas em medicina e odontologia humanas, como também de seu emprego em medicina veterinária, na conservação de alimentos, no combate a elementos biológicos daninhos aos seres humanos e na engorda de animais destinados à alimentação. Em geral, bactérias têm a habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos (NASCIMENTO *et al.*, 2000), pois são frequentes os relatos sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis as drogas de uso na rotina, mas que se tornam resistentes a todos, ou a quase todos, fármacos disponíveis no mercado (SAKAGAMI; KAJAMURA, 2002).

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (JACOBY, 2005; HOOPER, 2005; BOMONO; SZABO, 2006; MIN *et al.*, 2007). Esses mecanismos incluem:

- a) modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibiótico;
- c) substituição do sítio de ligação da droga;
- d) diminuição da permeabilidade ao antibiótico;
- e) aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete;
- f) efluxo do antibiótico, por intermédio de transporte ativo (ROUVEIX, 2007)
- g) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

Esses mecanismos podem coexistir em uma mesma cepa bacteriana que, ainda pode desenvolver resistência cruzada contra distintos antibióticos (NEU, 1992; GOLD; MOELLERING, 1996; RUSSEL, 2002; CHOPRA *et al.*, 2002). A resistência pode ser consequência da ação de outros fatores, como o sítio de infecção onde se encontra a cepa bacteriana e a concentração do antibiótico.

A colonização por *S. aureus*, especialmente envolvendo amostras multirresistentes, em pacientes hospitalizados e profissionais de saúde, representa um sério problema para a saúde pública (SCOTT; BLOOMFIELD, 1990). O Ministério da Saúde (MS), na portaria nº 2.616 de 12/05/1998, define infecção hospitalar (IH) como a infecção adquirida após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. São também infecções hospitalares aquelas manifestadas após 72 horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período (BRASIL, 1998).

### **2.2.2 Infecções hospitalares (IH)**

As infecções hospitalares constituem atualmente um problema de saúde pública. Inferências epidemiológicas as colocam como uma das principais causas de morbimortalidade, além de constituírem significativa carga social, emocional e econômica para os pacientes e para todo o sistema de saúde. No Brasil, mesmo com a legislação vigente no país, os índices de IH permanecem altos, em torno de 15,5%, o que corresponde a 1,18 episódios de infecção por paciente internado nos hospitais brasileiros. Além disso, considera-se mais um agravante, o fato das instituições públicas de saúde possuírem a maior taxa de

prevalência de IH no país, com 18,4% (PRADE, 1995). Uma infecção hospitalar acresce, em média, 5 a 10 dias ao período de internação. Além disso, os gastos relacionados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos da infecção hospitalar fazem com que o custo do tratamento dos clientes com IH seja três vezes maior que o custo dos clientes sem infecção.

Dados da literatura internacional demonstram, por exemplo, que as unidades de terapia intensiva são propícias ao aparecimento e disseminação da resistência microbiana. Os pacientes mais vulneráveis para adquirirem bactérias multirresistentes são os internados em setores críticos do Hospital, como Unidades de Terapia Intensiva, Berçário de neonatos, Setor de Diálise e Transplantados, ou que necessitem de observação mais rigorosa e utilização de procedimentos terapêuticos invasivos (RICHARDS *et al.*, 1999; 2000). Os pacientes desses ambientes estão em estado mais grave e são submetidos aos vários procedimentos invasivos que regionalmente utilizam antibióticos de amplo espectro de ação. Alguns locais e materiais reutilizados nos hospitais são descritos na literatura como fatores de risco para a aquisição de microrganismos antibiótico-resistentes, para o surgimento de infecções nosocomiais e a disseminação destes como algumas cepas de estafilococos e bacilos Gram-negativos.

Outra característica, que contribui para a sua persistência em hospitais, é a capacidade dessas cepas de sobreviver por longos períodos de tempo fora do corpo humano (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006). Estudos sobre as características do biofilme formado pelos *S. aureus* revelaram que essas cepas são capazes de persistir por até 7 meses sobre superfícies inanimadas secas (SCOTT; BLOOMFIELD, 1990; WAGENVOORT; PENDERS, 1997; NEELY; MALEY, 2000), principalmente se essas superfícies forem plásticas (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006). As superfícies inanimadas e os equipamentos são possíveis fontes de bactérias, principalmente as resistentes (DREES *et al.*, 2008; KAYABAS *et al.*, 2008). Não raramente é apontada a contaminação de equipamentos, superfícies e soluções de limpeza por microrganismos de importância epidemiológica. Estes dados se tornam extremamente relevantes em hospitais, onde as superfícies estão frequentemente contaminadas com patógenos nosocomiais e em contato com as mãos, representam importantes vetores de transmissão cruzada.

Alguns locais e materiais reutilizados nos hospitais são descritos na literatura como fatores de risco para a aquisição de microrganismos antibiótico-resistentes, para o surgimento de infecções nosocomiais e a disseminação destes como algumas cepas de estafilococos e bacilos Gram-negativos. Amrutkar *et al.* (2006) citam que existem vários outros fatores de risco que podem colocar os pacientes em risco de candidemia e bacteremia, como o uso de materiais termossensíveis que são desinfetados e reutilizáveis, incluindo-se cateteres

intravenosos, instrumentos para nutrição parenteral, ventilação mecânica, entre outros materiais como máscara de nebulizadores (CATHERINE *et al.*, 2007; KIKUCHI *et al.*, 2007).

Os profissionais da saúde também têm sido apontados, por meio de suas mãos, como importantes fatores de disseminação do MRSA no ambiente hospitalar. Estes profissionais adquirem transitoriamente o microrganismo através do contato com o paciente infectado, ou mesmo, colonizado, ou ainda pelo contato indireto, através do ambiente, via reservatórios inanimados (BOYCE; POTTER-BYNOE; CHENEVERT, 1997).

No Brasil, a frequência de isolamento de *S. aureus* MRSA e sua relação com infecções hospitalares atingem valores elevados. Em muitos hospitais brasileiros, a prevalência de isolamento de cepas de MRSA varia de 40 a 80% (OLIVEIRA *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2005). Um estudo realizado no Hospital Espanhol em Salvador (BA) demonstrou que em 9 anos a prevalência dessas bactérias resistentes à meticilina/oxacilina foi de 28%, sendo que os lugares com maior detecção dessas bactérias foram a UTI (59%), a unidade de hemodiálise (43%), unidade de doenças infectocontagiosas (34%), unidade neonatal (18,5%) quando comparados com os outros locais do hospital (BRITES *et al.*, 2006). Foram relatados por Souza e Figueiredo (2008), 68 casos de infecções atribuídas ao *S. aureus* resistente à oxacilina entre fevereiro de 2003 a janeiro de 2006 no Hospital Universitário Regional de Maringá. A avaliação de diferentes materiais clínicos detectou maior prevalência de isolamento em pontas de catéter (39,2%) e em secreções orotraqueais (34,2%).

Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, enterococos resistentes à vancomicina e bastonetes Gram negativos multirresistentes estão tornando prevalentes também em hospitais infantis (BIZARRO; GALLAGHER, 2007). A vancomicina era o único antibiótico efetivo contra os MRSA, mas, em 1997, foram descritos *S. aureus* com resistência à vancomicina e à teicoplanina. Estafilococos com resistência aos glicopeptídeos foram recentemente encontrados no Brasil. Registrou-se o isolamento de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina no Rio de Janeiro, em São Paulo e Porto Alegre e de estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo (OTÍLIA; 1999; MAMIZUKA; OLIVEIRA, 2000).

Assim, a aquisição de MRSA pode levar a consequências adversas graves para os pacientes, além de ampliar o tempo de hospitalização e aumentar os custos relacionados com a assistência médico-hospitalar (HUANG; PLATT, 2003). Deste modo, nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas têm sido motivadas para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a tais medicamentos.

## 2.3. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

### 2.3.1 *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Micrococcaceae e apresentam forma de coco, tendendo a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. São gram positivos, possuindo diâmetro variando entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$ , imóveis e não formam esporos. Possuem metabolismo fermentativo e respiratório, neste último, vindo a produzir catalase (VARNAN; EVANS, 1991; KLOOS; BANNERMAN, 1999). Crescem em meios comuns, pH 7, à temperatura de 37°C. O ágar manitol-sal é um meio seletivo para essa espécie, devido à capacidade desse microrganismo fermentar o manitol com produção de ácido láctico. As colônias formadas, após 18-24 horas de incubação, são arredondadas, lisas e brilhantes. A cor da colônia varia do acinzentado ao amarelo-ouro. Na cultura em ágar sangue é característica a formação de um halo de beta hemólise ao redor das colônias (KONEMAN *et al.*, 2001).

*Staphylococcus* spp. possui uma distribuição ubiqüitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região nasofaríngea de mamíferos e aves (ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001). Atualmente, o gênero é composto por 38 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2005), sendo que algumas são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, tanto em seres humanos como em animais (TRABULSI; TEIXEIRA; BUERIS, 2004). Dentre estas espécies, destaca-se *S. aureus* como a mais envolvida em doenças em seres humanos (KONEMAN *et al.*, 2001).

Os *S. aureus* são normalmente encontrados colonizando a pele e membranas mucosas de humanos. Elevadas concentrações desse microrganismo podem estar colonizando as axilas, porção anterior das narinas e o períneo. Porém, essas bactérias também podem estar distribuídas em outros nichos, como orofaringe, boca, vagina, trato intestinal e glândulas mamárias (WERTHEIM *et al.*, 2005). A capacidade de um patógeno de superar as defesas do organismo humano, conseguir colonizá-lo e manifestar a sua patogenicidade são os fatores responsáveis pela variação no quadro de sinais e sintomas que caracterizam as patologias (CARDOSO *et al.*, 2007; ROUVEIX, 2007). A patogenicidade das bactérias é determinada

pelo desenvolvimento de mecanismos que contribuem para o aumento de sua capacidade de infecção e que ajudam a burlar o sistema imunológico do hospedeiro (CHOPRA *et al.*, 2002).

O *S. aureus* também é o principal patógeno envolvido em uma grande variedade de manifestações clínicas, tais como infecções de feridas, pneumonia, septicemia e endocardite tanto em países desenvolvidos como os Estados Unidos, e também aqueles em desenvolvimento. É um microrganismo único quando comparado a outros clinicamente relevantes, pois apresenta três características fundamentais: apresenta uma série de fatores de virulência, apresenta capacidade crescente de desenvolver resistência a antibióticos, e é responsável por infecções nosocomiais e comunitárias (JACOBSSON, 2009). Agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina, são os fármacos de escolha para o tratamento das infecções graves por *S. aureus*. Contudo, a partir da introdução dos mesmos a partir da década de 1940, rapidamente surgiram cepas resistentes, por meio da produção de  $\beta$ -lactamases (penicilinasas), enzimas que inativam tais fármacos. A seguir, foram introduzidas novas drogas resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases, tais como a meticilina no uso clínico, surgindo posteriormente o *S. aureus* resistente à meticilina.

O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) surgiu a partir de 1960, como importante patógeno hospitalar em todo o mundo (CHAMBERS, 2009; DIEKEMA *et al.*, 2001; HIRAMATSU *et al.*, 2002). Inicialmente, restritas ao ambiente hospitalar (*hospital-acquired methicillin resistant S. aureus*, HA-MRSA), as cepas resistentes tomaram um novo perfil a partir da década de 1990, com infecções comunitárias (*community-acquired methicillin resistant S. aureus*, CA-MRSA) relevantes em indivíduos saudáveis e não sujeitos aos fatores de risco do ambiente hospitalar, tais como cirurgias, imunossupressão e outros (KOBAYASHI; DeLEO, 2009). O aumento da prevalência de MRSA tornou-se uma grande ameaça para o setor da saúde em todo o mundo, devido principalmente à sua virulência, opções terapêuticas limitadas e sua distribuição em ambos os ambientes, hospitalar e comunidade (HULETSKY *et al.*, 2004).

A resistência dos *S. aureus* a meticilina é causada principalmente pela aquisição exógena do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP – *penicilin binding protein*) com baixa afinidade de ligação ao antibiótico, denominada por PBP2a ou PBP2' (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

O gene *mecA*, confere a expressão da resistência à meticilina/oxacilina em *S. aureus*. O gene *mecA* é carregado por um elemento genético móvel de 26 a 67 kilobases, denominado cassete cromossômico estafilocócico (*staphylococcal cassette chromosome mec - SCCmec*)

(KURODA *et al.*, 2001), responsáveis por codificar a proteína de ligação alterada, resultando no quadro de multirresistência. O sequenciamento de várias linhagens de MRSA tem revelado oito diferentes alótipos de *SCCmec*, tipos I-V, todos carregando dois componentes genéticos essenciais combinados, conhecidos como complexo gênico *mec* e o complexo gênico cassete cromossômico recombinase (*ccr*). Os isolados de MRSA associados ou adquiridos na comunidade (CA-MRSA) apresentam características fenotípicas e genéticas distintas, quando comparadas às cepas típicas isoladas nos hospitais (HA-MRSA). O *SCCmec* tipo I (34 kb) foi detectado na cepa NCTC 10442, o primeiro MRSA isolado em 1961, no Reino Unido. O tipo II (52 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada no Japão em 1982, denominada N315, e o tipo III (66 kb) foi identificado em uma cepa de MRSA, isolada em 1985 na Nova Zelândia e foi denominada 82/2082.

Posteriormente, foi identificado em duas cepas associadas a infecções comunitárias, o menor elemento *mec*, o tipo IV (20 a 24 kb), que confere aos MRSA um perfil de sensibilidade diferente dos outros três tipos, sendo sensível às outras classes de antimicrobianos, que não os  $\beta$ -lactâmicos. (DUARTE; LENCASTRE, 2002; OKUMA *et al.*, 2002). O *mec* tipo V (28kb) foi descrito a partir do cromossomo de uma cepa de MRSA, de origem comunitária, isolada na Austrália, denominada WIS (WBG8318). Este elemento foi estruturalmente similar ao *SCCmec* tipo IV. (ITO *et al.*, 2004). No final de 2006, outro tipo *SCCmec* foi proposto - o tipo VI. Cepas características deste tipo possuem o complexo *mecB*, o *ccrAB* alótipo 4 e uma região específica J1. Quinze cepas de MRSA contendo *SCCmec* tipo VI foram inicialmente descritas no hospital Dona Estefânia (Lisboa) e outras quatro cepas foram encontradas em outros três hospitais, sendo dois também situados em Lisboa e outro em Coimbra (OLIVEIRA; MILHEIRIÇO; DE LENCASTRE, 2006).

Em 2008, Higuchi *et al.* (2008) demonstrou a presença do *SCCmec* tipo VII, em cepas CA-MRSA pertencendo ao tipo de sequência multilocus (ST) 59 de Taiwan, tinha 41.347 pares de base em tamanho e flanqueado por 19 pares de bases de sequências attL e attR. A região central de 21.245 pares de bases contém o complexo *mec* (C2b) e outro *ccrC* gene (*ccrC2*), e era altamente homólogo ao *SCCmecV*, mas com substituições, inserções e rearranjos. A porção final do lado 3' apresentou uma sequência única de 10.191 pares de bases.

Os *SCCmec* tipos I, II e III estão associados a cepas de origem hospitalar que têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos  $\beta$ -lactâmicos como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol e quinolonas



(HIRAMATSU *et al.*, 1997). Muitos isolados de MRSA que apresentam múltipla resistência são susceptíveis apenas aos glicopeptídeos como a vancomicina. Os SCC*mec* tipo IV e V não possuem nenhum outro determinante de resistência a antimicrobianos além do gene *mecA*, o que explica uma das principais características dos isolados comunitários de MRSA, a sensibilidade a diversos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos. (DUARTE; LENCASTRE, 2002; ENRIGHT *et al.*, 2002; OKUMA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2004).

O complexo gene *mec* corresponde às regiões do gene *mecA* e dos reguladores para a expressão do *mecA* (*mecR1* e *mecI*), e ainda o complexo gene *ccr*, correspondendo à região onde se encontram os genes para as recombinases, as quais são responsáveis pela mobilidade do SCC*mec*. O gene *mecA* é um segmento de DNA exógeno, ou seja, que não é nativo do *S. aureus*, de 2,1 Kb, e é controlado pelos genes *mecR1* e *mecI*. O produto do gene *mecI* reprime a expressão do *mecA* ao se ligar ao operador, sendo esta repressão é revertida pela presença de metilina ou qualquer outro  $\beta$ -lactâmico no meio (mecanismo de indução). Já a proteína *mecR1*, um produto do gene *mecR1*, é uma proteína de membrana envolvida em um sistema de transdução de sinal, a qual reconhece a presença de  $\beta$ -lactâmicos através de seu domínio extracelular ligador à penicilina. Seu domínio citoplasmático apresenta atividade de protease e degrada o *mecI*, permitindo assim a transcrição do gene *mecA*. (McKINNEY *et al.*, 2001).

Além desses genes, outros elementos genéticos também podem estar presentes, dentre eles os elementos de inserção IS431 e IS257, os plasmídeos pUB110 e pT181 e o transposon Tn554, que carrega genes de resistência à eritromicina e à espectinomicina. Em adição, a presença de mais de uma cópia do IS256 parece servir como “*hot spot*” (regiões de elevada frequência de recombinações) para a inserção de outros genes de resistência às drogas. Assim, torna-se claro o porquê dos MRSA apresentarem, frequentemente, múltipla resistência aos antimicrobianos associado à presença do gene *mecA* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000).

O gene *mecA* é regulado pelos genes *mecI* e *mecR1*, similarmente à regulação do *blaZ* pelos genes *blaI* e *blaR1* frente à exposição à penicilina. Na verdade, *mecI* e *mecR1* são homólogos ao *blaI* e *blaR1*. A expressão dessa resistência pode ser homogênea ou heterogênea. Na expressão homogênea todas as colônias expressam resistência à oxacilina e na heterogênea é expressa apenas por parte das colônias apesar da presença do gene *mecA*, dificultando a interpretação do teste (ROSSI; ANDREZZI, 2006).

Alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais, o gene *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), auxiliam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos. Foram identificados muitos desses genes *fem*, denominados

*femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL *et al.*, 1995). O gene *femA* é essencial para a expressão da resistência dos MRSA e parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos. Outro importante mecanismo de resistência é o efluxo em MRSA, sendo este identificado como um dos principais contribuintes para a resistência de vários antibióticos estruturalmente independentes. As bombas de efluxo são proteínas integrantes da membrana plasmática bacteriana e que têm sido responsabilizadas por diversos casos de resistência a drogas, as quais são expelidas para fora da célula (PIDDOCK, 2006).

### 2.3.2 Fatores de virulência de *S. aureus*

A capacidade de colonização e patogenicidade de *S. aureus* são provenientes de seus fatores de virulência. Tais fatores permitem sua aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, invadem as defesas imunológicas e proporcionam a invasão celular, penetração tecidual ou adesão a superfícies de catéteres e próteses. Esses diferentes mecanismos de sobrevivência, que partem dos constituintes de parede celular e da produção de enzimas e toxinas oferecem proteção ao microrganismo e permitem sua disseminação (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). As lesões superficiais decorrentes de *S. aureus* incluem infecções cutâneas como impetigo, foliculite, terçol, furúnculo, carbúnculo e mastite (LEVINSON; JAWETZ, 2005). Em caráter sistêmico pode ocasionar pneumonia, artrite, endocardite e bacteremia (STAPLETON; TAYLOR, 2002). *S. aureus* também estão relacionados à osteomielites. A expressão de adesinas que permitem a fixação aos componentes da matriz óssea, o fato de sobreviver intracelularmente em osteoblastos e a capacidade de formar biofilmes na superfície de materiais estranhos ao organismo como as próteses, armam em conjunto, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e tornam essas cepas tolerantes à ação dos antimicrobianos (DAVIS, 2005).

A formação do biofilme bacteriano tem sido descrita desde que Van Leeuwenhoek descreveu as placas bacterianas de seus próprios dentes no século XVII. Entretanto, demorou até 1978 para que houvesse o entendimento da importância dessas estruturas nos ecossistemas, e seu significado médico, por meio dos conhecimentos obtidos para explicar sua estrutura e relevância. (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Biofilmes são complexas comunidades microbianas fixadas em uma superfície e embebidas em uma matriz extracelular. Estas comunidades podem se fixar em uma grande

variedade de superfícies com composições químicas diversas. Esforços têm sido realizados para compreender como se dá o processo de adesão, desenvolvimento e maturação dos biofilmes, assim como a sua capacidade de desagregamento e dispersão, disseminando-se para outras superfícies (BOLES; HORSWILL, 2011).

Do ponto de vista médico, a formação de biofilmes representa um importante mecanismo de virulência microbiano, pois ao aderir a superfícies e produzir uma matriz polissacarídica, o microrganismo garante a continuidade do processo infeccioso, assim como maior resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e também maior resistência aos antimicrobianos que as células planctônicas do mesmo agente patogênico (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL, 2008; BRYERS, 2008).

Há uma clara percepção de que as células bacterianas em crescimento nos biofilmes se comportam distintamente das células com crescimento planctônico, com alteração no padrão e na taxa de expressão gênica de moléculas essenciais para seu metabolismo, assim como de fatores de virulência (MACK *et al.*, 2004). Nestas situações, assume papel preponderante um sistema de intercomunicação celular conhecido como *quorum sensing*, que é constituído por pequenas moléculas secretadas pelas células bacterianas (AIP- *autoinducing peptide*) moduladas pelo complexo gênico *agr* (*accessory gene regulator*) e também pelos complexos *SarA* e RNIII, dentre outros (YARWOOD *et al.*, 2004). Foi demonstrado que nas populações bacterianas em biofilme existem “variantes” que expressam distintamente fatores de virulência relacionados ao processo de adesão e crescimento bacteriano dos próprios biofilmes, como as adesinas, fibronectinas entre outros, e que são geralmente modulados pelo complexo *agr* (YARWOOD *et al.*, 2007).

A formação do biofilme é um processo dividido em etapas que depende da aderência do microrganismo à superfície a ser colonizada, seguida da secreção das moléculas de adesão intercelulares, secreção da matriz polissacarídica, consolidação da estrutura e em seguida o destacamento de frações ou pedaços que facilitam a dispersão e persistência da infecção. O fundamental neste processo é a produção da adesina polissacarídica intercelular (PIA – *polysaccharidic intercelular adhesin*) que é codificada pelo operon *ica* (*intercelular adhesin locus*) (FLUCKIGER *et al.*, 2005) nos *S. aureus*.

Tal operon contém os genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* que produzem enzimas responsáveis pela síntese do principal componente da PIA, o polissacarídeo poli-N-succinil- $\beta$ -1,6-glicosamina (PNSG), que apresenta resposta imunogênica e tem sido testado como potencial alvo de vacinas; além do gene *icaR* um modulador negativo do sistema de expressão (WILSON *et al.*, 2011). O gene *icaA* é responsável pela produção de proteína transmembrana

com função de N-acetil-glucosamina transferase, e que para a sua ótima atividade, requer a co-expressão do produto do gene *icaD*. O polissacarídeo produzido alcança um tamanho máximo de cerca de 20 resíduos, sendo necessária a co-expressão do produto do gene *icaC* para obtenção de estruturas de maior extensão. O produto do gene *icaC* também está envolvido na translocação do produto de síntese polissacarídica para a superfície celular, enquanto o produto do *icaB* é responsável pela desacetilação do carboidrato que é relevante para os mecanismos de adesão intercelular e com as superfícies que são substrato para a instalação do biofilme (O’GARA, 2007). O papel dos genes *icaA* e *icaD* para formação de biofilmes, tanto em *S. aureus* quanto *S. epidermidis* foi demonstrado a partir do isolamento de microrganismos de catéteres urinários de pacientes, apresentando uma importante correlação entre os isolados fortemente produtores de biofilme e a presença de tais genes nas espécies estudadas (GAD *et al.*, 2009).

O produto do gene *icaR* é membro da família TetR de proteínas regulatórias, e localiza-se no mesmo *locus*, sendo divergentemente transcrito em relação ao *icaADBC*. Ele é responsável pela regulação negativa, ligando-se ao promotor 5’ do códon de inicialização do gene *icaA*. A transcrição de *icaADBC* também é regulada positivamente pelo regulador global *SarA* e pelo fator *SigB* em condições de stress e por algumas cepas (CUE *et al.*, 2009)

Além disso, estudos recentes têm demonstrado mecanismos independentes do operon *ica* e da presença de PIA para formação de biofilmes, pois isolados que não possuem esses genes, isolados defectivos, têm mantido esta propriedade patogênica. O papel dos reguladores globais *agr* e *SarA* têm sido elucidado, atuando de formas divergentes, enquanto o sistema *SarA* está envolvido no ataque e adesão às superfícies, o sistema *agr* parece estar envolvido nos mecanismos de dispersão (LAUDERDALE *et al.*, 2009)

Análise de isolados clínicos de *S. aureus* das infecções de próteses articulares, bacteremia, ou infecções relacionadas a cateteres demonstraram a presença do locus *ica* na maioria dos isolados, mas porcentagens variantes dessas cepas apresentaram falta de produção de PIA *in vitro* (ARCIOLA; BALDASSARRI; MONTANARO, 2001; CRAMTON, 1999, 2001; FOWLER, 2001; KNOBLOCH *et al.*, 2002; MARTÍN-LÓPEZ *et al.*, 2002; PEACOCK, 2002; ROHDE *et al.*, 2001). Recentes publicações demonstram que outros fatores influenciam a produção de PIA ou de biofilme, como glicose e outros açúcares, alta osmolaridade e anaerobiose (CRAMTON, 2001; GERKE *et al.*, 1998; KNOBLOCH *et al.*, 2001, 2002; MACK; SIEMSEN; LAUFS, 1992; RACHID *et al.*, 2000 ).

As fibronectinas estafilocócicas (*fnbA* e *fnbB*) têm sido amplamente investigadas pelo seu papel de adesão as estruturas de células eucarióticas *in vitro* e *in vivo*, sendo que tais

adesinas exercem participação relevante no processo de fixação aos tecidos colonizados e internalização por células fagocíticas, e assim, contribuindo para o desenvolvimento do curso letal da infecção (SHINJI *et al.*, 2011). De fato, as fibronectinas estafilocócicas atuam como MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), ou seja, são moléculas capazes de reconhecer proteínas presentes no plasma e na matriz extracelular (fibronectina, fibrinogênio e elastina) e expressam variação genotípica e fenotípica, funcionando como mecanismo de evasão as ações do sistema imune (BURKE *et al.*, 2010).

Além das fibronectinas, outros fatores de virulência apresentam importância para a adesão tecidual e invasão celular, destacando-se a Proteína A (Spa), o *clumping factor A* e B (CfIA e CfIB), atuando também como mecanismos de evasão as respostas imunológicas do hospedeiro, tanto humano quanto animal (STUTZ; STEPHAN; TASARA, 2011). A proteína A (Spa), presente na maioria das cepas de *S. aureus*, é capaz de interagir com diversos tipos de receptores em células eucarióticas, superfícies e plaquetas (HENRY-STANLEY *et al.*, 2011; NGUYEN; GHEBREHIWET; PEERSCHKE, 2000; MERINO *et al.*, 2009) se liga a porção Fc da molécula de IgG, alterando a ligação da imunoglobulina com receptores de macrófagos e outras células fagocíticas, além de componentes séricos importantes pra defesa imune, gerando efeitos anticomplementares, quimiotáticos e antifagocitários, funcionando como mecanismo de evasão à resposta do hospedeiro (STUTZ; STEPHAN; TASARA, 2011).

A capacidade de ligação da Spa com diversas estruturas contribui para a aderência de *S. aureus* as variadas superfícies levando à sua persistência nas infecções e a complicações dos quadros como endocardite (NGUYEN; GHEBREHIWET; PEERSCHKE, 2000), formação de biofilmes em cateteres (HENRY-STANLEY *et al.*, 2011) até mesmo em ausência de PIA (MERINO *et al.*, 2009). Pode ainda desencadear a cascata pró-inflamatória nas vias aéreas por ativação do receptor 1 de TNF- $\alpha$  (DAVID; DAUM, 2010).

Os *clumping factors A* e B (CfIA e CfIB) são componentes da família das MSCRAMMs capazes de se ligar ao fibrinogênio no plasma humano e causar coagulação intravascular. Ele também é capaz de se ligar ao fator I, que estimula a clivagem do fragmento C3b na superfície de células de *S. aureus*, para sua forma inativa C3bi, que perde sua função de opsonina, com isso funcionando como um mecanismo de evasão da resposta imune para o microrganismo (WILSON *et al.*, 2011). A capacidade de se ligar a estruturas proteicas como fibrinogênio e outras proteínas da matriz extracelular, além de sua imunogenicidade, tem levado a realização de estudos que visam definir o papel dos CfIA e CfIB em patologias,

como a septicemia (COLQUE-NAVARRO *et al.*, 2000) e a artrite séptica (JOSEFSSON *et al.*, 2001).

O *S. aureus* apresenta em sua parede celular, polissacarídeos, proteínas antigênicas e moléculas como o ácido teicóico, o glicanopeptídeo, a proteína A, além de cápsula e adesinas que são capazes de induzir resposta imunológica no hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2001). O ácido teicóico é capaz de ativar a via alternativa do complemento e estimular a produção de citocinas. O glicanopeptídeo atua como agente quimiotático e induz a produção de interleucina 1 (IL-1) e opsoninas, facilitando a fagocitose. A cápsula protege o microrganismo da fagocitose, tornando-o mais virulento e com maior capacidade de invasão tecidual. A cápsula é uma estrutura polissacarídica que envolve a parede celular da maioria das cepas de *S. aureus*, protegendo a bactéria da fagocitose mediada pelo complemento (C3b) por parte dos neutrófilos polimorfonucleares, aumentando a virulência e a capacidade de invasão nos tecidos e na corrente sanguínea. As adesinas pertencem à estrutura gelatinosa do glicocálix e promovem a aderência às células do hospedeiro através da interação com receptores químicos (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Além disso, o *S. aureus* produz numerosas enzimas que favorecem a invasão e destruição tecidual do hospedeiro, assim como a disseminação para demais sítios anatômicos (GORDON; LOWY, 2008). A mais conhecida é a coagulase, característica do próprio *S. aureus*, que coagula o plasma, ocasionando um emparedamento do sítio infectado, com o objetivo de retardar a migração de neutrófilos e dificultar a fagocitose celular (LEVINSON; JAWETZ, 2005). Outras enzimas incluem a catalase, desoxirribonuclease (DNase), hialuronidase, lipases, proteases e estafiloquinase ou fibrinolisinase. Esta última estimula a transformação de plasminogênio em plasmina, que possui a capacidade de dissolver coágulos (TRABULSI *et al.*, 2004). A catalase converte o peróxido de hidrogênio, tóxico ao *S. aureus*, em oxigênio e água (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem ao grupo de exotoxinas conhecidas como toxinas pirogênicas superantígenos (DINGES *et al.*, 2000), sendo um grupo de proteínas de cadeia curta, de baixo peso molecular (27 a 34 KDa), produzidas por algumas espécies de *S. aureus* (BHATIA; ZAHOR, 2007). As enterotoxinas causam distúrbio alimentar caracterizado por vômito proeminente e diarreia aquosa sem sangue. Apesar de *S. aureus* ser produtor de uma grande variedade de enterotoxinas, a Enterotoxina A é a mais relacionada a casos e surtos de intoxicação alimentar, sendo responsável por mais de 75% dos surtos, seguida, em ordem decrescente de frequência, por SED, SEC e SEB (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 2004). Varnan e Evans (1991) e Rasooly e Rasooly (1998) afirmam que há diferença na

“potência” das enterotoxinas, sendo a SEA a mais potente, seguida da SED. Os genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *segv*, *seh*, *sei*, *seiv*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq*) codificadores das enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes em bacteriófagos, plasmídeos, no cromossomo e em ilhas de patogenicidade cromossomal (BAYLES; IANDOLO, 1989; KURODA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1998).

As cepas MRSA comunitárias (CA-MRSA) podem tornar-se altamente patogênicas através da produção de toxinas. Constatou-se a produção de até 18 toxinas que são raramente encontradas em isolados de MRSA hospitalar, podendo se destacar a PVL (Leucocidina de Pantón-Valentine) (FEY *et al.*, 2003). Essa exotoxina é codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* (LOPES, 2005) e está intimamente associada a infecções severas de pele e partes moles, assim como à pneumonia necrotizante (GILLET *et al.*, 2002). À semelhança da  $\alpha$ -hla (alfa-hemolisina), a PVL pertence à família das  $\beta$ -PFTs ( *$\beta$ -barrel pore-forming toxins*), proteínas de estrutura responsáveis pela formação de poros nas membranas de células eucarióticas. Enquanto a  $\alpha$ -hla forma poros normalmente hexaméricos ou heptaméricos, principalmente em hemácias, a PVL forma poros octaméricos, principalmente em leucócitos, sendo secretada em monômeros solúveis que se unem para formar um poro de alta condutância, levando ao desequilíbrio iônico na célula e consequente lise (MILES *et al.*, 2002).

Apesar da forte associação entre a expressão de PVL a cepas comunitárias de MRSA, em especial aquelas portadoras de *SCCmec* do tipo IV, seu papel na virulência e como marcador de CA-MRSA é ainda inconclusivo (LINDSAY, 2009). Estudos têm demonstrado que cepas de HA-MRSA portadoras do *SCCmec* tipo III podem expressar PVL, ainda que em taxas de ocorrência mais baixas que aquelas encontradas em cepas comunitárias (AKOGLU *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

## 2.4 BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

O Brasil tem quase um terço da flora mundial representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante. Entretanto, apesar da rica biodiversidade brasileira, ainda são poucos os estudos de plantas medicinais, incluindo espécies nativas e exóticas, sobre sua atividade antimicrobiana e sua influência sobre fatores de virulência dos *S. aureus* resistentes a antibióticos. Além disso, muito pouco tem sido feito para transformar este potencial em

produtos e patentes, garantindo a repartição social dos benefícios, a proteção e manutenção destes ecossistemas (GOTTLIEB *et al.*, 1996). O desenvolvimento local e, no caso, a partir de cada bioma, representa uma alternativa concreta e viável para chegarmos a novos produtos e metodologias baseado na vantagem competitiva dos nossos recursos naturais, promovendo um grande salto tecnológico na produção de medicamentos (FEHER; SCHIMIDT, 2003).

Dentro deste contexto, um importante bioma brasileiro a ser estudado é o Semiárido, um ecossistema complexo, sendo a área de maior abrangência territorial (969.589,4 km) dentre os espaços naturais da região Nordeste. A área do Semiárido abrange 1133 municípios dos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Norte de Minas Gerais, totalizando uma população de 20.858.264 milhões de pessoas. A Caatinga é a vegetação com predominância no Semiárido, sendo esta reconhecida em 2001 pela UNESCO como Reserva da Biosfera, ocupa uma área de 734.478 km<sup>2</sup> (cerca de 7 % do território brasileiro) e é o único bioma exclusivamente brasileiro (SILVA *et al.*, 2003). Isto significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em outro lugar do mundo, além da nossa região Semiárida brasileira.

A diversidade biológica, principalmente na flora, as várias formas de manifestações culturais e até mesmo os diferentes microclimas fazem do Semiárido Brasileiro uma região extremamente rica e com grande potencial para o desenvolvimento sustentável (SILVA *et al.*, 2003). Além disso, encontramos um grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais cujos valores farmacêuticos são conhecidos e importantes para as populações locais. No entanto, carecem de pesquisas e estudos de interação do conhecimento popular e científico no uso das plantas medicinais, sendo pertinente a preocupação com as empresas de grupos econômicos internacionais, que ao descobrirem as riquezas e o valor medicinal das plantas da Caatinga, podem patentear compostos bioativos isolados dessas plantas.

Neste contexto, a planta medicinal que foi utilizada neste trabalho foi coletada de forma sustentável para garantir a conservação da espécie *Phanera flexuosa*, conhecida popularmente como escada de macaco na região de Contendas do Sincorá (BA). A planta foi coletada na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá (FLONA). A FLONA é uma área de reserva ambiental (11.034,34 hectares), situada no Semiárido da Bahia, com vegetação predominante de caatinga, com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas, que tem como objetivos: i) a gestão do uso múltiplo e sustentável dos recursos naturais renováveis; ii) a manutenção e proteção dos recursos hídricos e da biodiversidade local; iii) educação ambiental e pesquisa científica. Nesta região foram identificadas 2.897 plantas, destas 71 espécies, 51 gêneros e 23 famílias botânicas. Entre essas famílias, algumas espécies



já foram descritas com atividades antimicrobianas na literatura, como *Jatropha gossypifolia* (KUMAR *et al.*, 2006), *Acacia nilotica* (ABD *et al.*, 1992) e *Annona glabra* já com princípio ativo antimicrobiano isolado e identificado como o ácido caurenóico (PADMAJA *et al.*, 1995).

## **2.5 *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz.**

### **2.5.1 Características botânicas e de localização da *Phanera flexuosa***

O gênero *Phanera* é de ocorrência pantropical e possui cerca de 300 espécies, contemplando árvores, arbustos e cipós com folhas simples inteiras, biloboladas ou bifoliadas, que normalmente causam controvérsias taxonômicas (HAO *et al.*, 2003). No Brasil, em especial, a ocorrência de tal gênero é amplamente distribuída em biomas tão diversos quanto às florestas tropicais, com alto teor de umidade, assim como, em áreas de seca como a caatinga, e a similaridade nas características morfológicas têm sido objetivo de exaustivas tentativas taxonômicas (VAZ, 2010).

A espécie vegetal a ser estudada é a *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz., uma subespécie do gênero *Phanera* *lour.* (WUNDERLIN; EILERS, 2009), da subfamília botânica Caesalpinioideae ou Caesalpinaceae, pertencente à família Leguminosae (Fabaceae). Apesar dessas controvérsias taxonômicas, a *Phanera flexuosa* foi primariamente descrita no século XIX, com coleções encontradas no Rio de Janeiro (Pl. Nouv. Amer. 80, t. 53. 1840). Está identificada no *Taxonomy browser* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sob o número de identificação (ID) 653095, e tem a sinonímia de *Bauhinia flexuosa* e *Bauhinia flexuosa* Moric. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>). Em 2006, Queiroz propôs a nova nomenclatura *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz.

A *P. flexuosa* apresenta-se como um arbusto escandente, com caule muito extenso e flexível, podendo chegar a até 20 metros de comprimento, com folhas alternas e bilobadas, e flores pequenas de coloração branco-amarelada, sendo hermafroditas (QUEIROZ, 2006). Devido o formato do seu caule é conhecida popularmente como escada de macaco na região da FLONA, sendo indicada para o tratamento da impotência sexual pela medicina popular local.

Distribui-se nas zonas de mata seca sazonal de Minas Gerais e da Bahia, com altitudes inferiores a 450 m, florescendo e frutificando normalmente no mês de abril (WUNDERLIN; EILERS, 2009).



**Figura 1** - *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz.  
Folhas e caule em seu *habitat* na FLONA Contendas do Sincorá- BA.

### 2.5.2 Composição química e usos medicinais

Em extensa revisão sobre o gênero *Bauhinia* feita por Cechinel Filho (2009), confirma-se o consolidado uso popular destas plantas, destacando-se o seu uso no tratamento do diabetes mellitus do tipo II, infecções, dores e inflamações. A espécie mais bem estudada até o presente momento é a *Bauhinia forficata*, conhecida popularmente como “pata de vaca” ou “casco de vaca”, cujo principal uso é no tratamento do diabetes (MENEZES *et al.*, 2007). Em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, os resultados obtidos foram contraditórios, porém sugestivos da necessidade de maior aprofundamento nas abordagens utilizadas até o presente momento, sendo demonstrado que a possível atividade deve-se a compostos fenólicos como os flavonóides, em especial, o kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside (kaempferitrin).

Apesar de não ser exclusivo do gênero *Bauhinia*, ocorrendo em larga variedade de famílias, estudos indicam uma forte associação entre o consumo de vegetais ricos em kaempferol e a melhora na saúde, tendo sido relatadas diversas propriedades farmacológicas

como: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, ansiolítica, cardioprotetora, neuroprotetora, analgésica, antidiabética e antialérgica (CALDERON-MONTAÑO *et al.*, 2011).

Existem relativamente poucos estudos de atividade biológica realizados com espécies do gênero *Bauhinia*, principalmente do gênero *Phanera*. Os estudos devem ser realizados de forma multidisciplinar (MACIEL *et al.*, 2002), a fim de melhorar as formas de extração e isolamento dos compostos biologicamente ativos (BIANCO; SANTOS, 2003; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2010) e melhor investigar as propriedades farmacológicas de tais compostos; assim como, garantir a correta identificação e utilização de tais plantas (MELO *et al.*, 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005; ENGEL *et al.*, 2008).

Para o desenvolvimento desta pesquisa, a espécie vegetal estudada foi a *Phanera Flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz, conhecida popularmente como escada de macaco (Fig. 01), escolhida a partir da indicação do uso popular em um estudo etnofarmacológico realizado com a população local de Palmeiras, distrito do município de Contendas do Sincorá (DUARTE *et al.*, 2008). Segundo os dados obtidos, a escada de macaco é utilizada popularmente sob a forma de “garrafada” (infusão em aguardente), para o tratamento de impotência sexual (DUARTE *et al.*, 2008). Além disso, a escolha desta planta baseou-se no fato da espécie *Phanera flexuosa* ainda não ter sido estudada quanto a sua atividade antimicrobiana, ao contrário de outras espécies do gênero *Bauhinia*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz e sua influência sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos isolados de ambiente hospitalar de Vitória da Conquista – BA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar a atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* Moric. contra isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos de ambiente hospitalar de Vitória da Conquista – BA;
- b) Avaliar a atividade inibitória do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* Moric. na formação de biofilme bacteriano “in vitro”, assim como na viabilidade celular no biofilme;
- c) Avaliar a influência do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* Moric. na expressão de fatores de virulência de *S. aureus* MRSA por meio da avaliação genotípica;
- d) Avaliar a importância dos espécimes botânicos pré-selecionados na biodiversidade local, incluindo a sua distribuição e ocorrência, necessidade de preservação e cultivo, baseado em estudos descritos na literatura;
- e) Realizar estudos taxonômicos e confeccionar as exsiccatas das espécies coletadas pré-selecionadas no estudo etnofarmacológico, estabelecendo relação entre a nomenclatura popular e a científica;
- f) Analisar os resultados e promover a divulgação dos mesmos por meio de publicações em periódicos nacionais e internacionais, comunicações em congressos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

A espécie vegetal *Phanera Flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz, conhecida popularmente como escada de macaco, foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), uma área com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas, localizada no semiárido baiano, com predominância de caatinga. Para a coleta da planta, foi concedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (N 12292-1) e a Autorização para atividade com finalidade científica (N 13258-1). A espécie coletada foi devidamente localizada, fotografada, catalogada, e depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Vitória da Conquista, com os números de vouchers 4927 (1ª Coleta), 4961 e 4966 (2ª Coleta) e 4981 (3ª Coleta), sob coordenação do Prof. MsC. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsiccatas foram preparadas seguindo as orientações de MORI e colaboradores, (1989) e a identificação taxonômica feita por comparação no herbário e através de literatura.

### 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

O extrato etanólico foi preparado a partir das folhas secas e moídas da planta *P. flexuosa*, maceradas em etanol 99° Gl, com agitação esporádica por 03 dias. Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até a eliminação do etanol, e secos à temperatura ambiente; fornecendo o extrato etanólico das folhas de *P. flexuosa* para os testes biológicos (YATSUDA *et al.*, 2005; CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001; VILEGAS; MARCHI; LANCAS, 1997; DUARTE *et al.*, 2003). O rendimento final médio obtido foi de 15,72% em relação ao peso seco das folhas. O extrato etanólico das folhas de *P. flexuosa* (EFPF) foi solubilizado em 10 % de etanol (v/v) para ser testado quanto à atividade antimicrobiana e influência nos fatores de virulência.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EFPF

### 4.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados na determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima foram: *S. aureus* ATCC 29213 INCQS 0001 (sensível a oxacilina), *S. aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (resistente a oxacilina), além de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos isoladas de dois hospitais públicos da cidade de Vitória da Conquista, Bahia.

Ao longo do ano de 2007 a 2010, foram feitas coletas na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e UTI neonatal dos hospitais. Estas coletas foram realizadas em ambientes sugestivos de maior contaminação na UTI pediátrica e adulto. Os agentes isolados foram identificados de acordo com as características morfológicas das colônias e morfotintoriais e provas bioquímicas: catalase, coagulase, fermentação da maltose e do manitol. A susceptibilidade dos isolados foi avaliada pelo método de microdiluição com 2% de cloreto de sódio (p/v) usando a técnica de diluição em placa para os seguintes antibióticos: oxacilina/meticilina, azitromicina, clindamicina, vancomicina, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina, segundo metodologia preconizada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Foram obtidas amostras em 117 pontos de coleta, tais como piso, painéis de equipamentos de monitorização cardíaca, bombas de infusão, respiradores, incubadoras, telefones, maçanetas de portas e gavetas, bancadas, pias, torneiras, leitos, pranchetas de prescrição, prontuários, etc. sendo isolados 97 microrganismos identificados como *S. aureus*, dos quais trinta e cinco demonstraram resistência fenotípica a oxacilina no antibiograma. Os isolados resistentes foram submetidos à caracterização genotípica realizada por meio da detecção do gene *mecA* pela técnica de PCR (*polimerase chain reaction*). Dos trinta e cinco isolados, trinta e um foram positivos (88,6%) apresentando o gene *mecA*. Posteriormente foi realizado o sequenciamento do cassete *SCCmec*, demonstrando-se serem os isolados pertencentes ao cassete do tipo III, conhecido como clone epidêmico brasileiro (CAMPOS *et al.*, 2012).

### 4.3.2. Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico das folhas de *P. flexuosa* (EFPF) contra *S. aureus*.

As suspensões bacterianas das cepas resistentes isoladas foram inoculadas em proporção 1:1000 do meio BHI caldo de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de  $1-2 \times 10^5$  ufc/mL. Após a homogeneização das mesmas, um volume de 190  $\mu$ L do inóculo

e 10 µL do EFPF com concentrações finais variando entre 4000 a 125 µg/mL, em diluição seriada de razão 2, foram acrescentados nos poços das placas de poliestireno para realização do teste de CIM em microtitulação. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a leitura visualmente para avaliação do crescimento, por meio da observação de turvação do meio e/ou presença de colônias no fundo dos poços. Nos poços em que não houve crescimento visual foi adicionado o corante resazurina um indicador redox, que na presença de crescimento bacteriano altera a sua coloração azul para róseo-avermelhada. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) a 0,01%, um indicador de óxido-redução, que apresenta a cor azul e é oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração róseo-avermelhada. A CIM foi considerada a menor concentração de EFPF em que não houve crescimento bacteriano visível.

Para a determinação da CBM, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BHI ágar. Uma alíquota de 8 µL das suspensões utilizadas no teste da CIM (poços onde não houve crescimento visível) foi inoculada em placas com BHI ágar. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, sendo feita a seguir a leitura visual das mesmas. A CBM foi considerada como sendo a menor concentração de EFPF que causou 99,9% de morte celular, ou seja, ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar.

#### **4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EFPF SOBRE OS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. aureus***

##### **4.4.1 Inibição da formação do biofilme por EFPF**

Quatro isolados bacterianos (16A, 29, 92 e 112) foram escolhidos após a determinação da CIM e CBM, baseado nos perfis fenotípicos e genotípicos relevantes para o estudo de inibição de formação de biofilme e influência do EFPF nos fatores de virulência. A cepa de *S. aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (MRSA) também foi utilizada para todos os testes a seguir. As cepas de estafilococos foram cultivadas em meio TSB suplementado de glicose (1%), por 18 horas a 37°C, em agitação a 250 rpm. Após este processo, as amostras foram diluídas em meio TSB com 1% de glicose até a densidade ótica (D.O.) de 0,135 de absorvância a 660 nm (0,5 na escala McFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), medido em

espectrofotômetro. O inóculo foi diluído (1:1000) em TSB suplementado com 1% de glicose e distribuído a alíquota de 150 µl nos poços das microplacas de poliestireno. Uma alíquota de 50 µl de etanol (concentração final de 10%, v/v) ou do EFPF (concentração variando de 20000 a 78,125 µg/mL) foram adicionados aos poços, sendo as placas incubadas à 37°C, em agitação a 250 rpm, por períodos de 3, 5, 7 e 24h. Após a incubação, as placas foram lavadas por três vezes com salina (NaCl 0,9%) e colocadas a secar à temperatura ambiente por uma hora. Nas placas secas foram adicionadas 200 µL/poço de Cristal Violeta 0,1%, sendo incubadas por 15 min. à temperatura ambiente. Após este procedimento, cada poço foi lavado com solução salina por 02 vezes, e a seguir as placas coradas foram submetidas à leitura sob filtro de 492 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (Thermo plate<sup>®</sup>) (QUAVE *et al.*, 2008; MARINO *et al.*, 2010). O resultado desse teste foi apresentado em porcentagem de inibição de formação do biofilme tratado com EFPF em relação ao biofilme tratado com o veículo.

As amostras também foram avaliadas quanto à viabilidade celular do biofilme com a utilização do sal MTT (brometo de dimetil-tiazólio e difenil-tetrazólio)(SCHILLACI *et al.*, 2008; ZHANG; LIU, 2002). O processo de formação do biofilme foi semelhante ao descrito na inibição da formação do biofilme revelado por cristal de violeta, diferindo o processo posterior à incubação. Após a incubação nos diferentes tempos (3, 5, 7 e 24 h), a suspensão foi aspirada, seguido de uma lavagem com tampão PBS estéril, secagem das microplacas, e adição em cada poço de 20 µL de MTT e 180 µL de meio TSB com glicose a 1%. Após a incubação em estufa a 37°C por uma hora, novamente o meio foi removido por aspiração e a seguir foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para redissolver os cristais de formazan de coloração azul formados pelos microrganismos vivos. As placas foram incubadas por 10 minutos a 37°C. Após incubação foi realizada leitura a 492 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas com o filtro. O resultado de viabilidade celular do biofilme foi apresentado em porcentagem de biofilme formado viável tratado com EFPF em relação ao tratado com o veículo.

#### **4.4.2. Avaliação da morfologia do biofilme tratado com EFPF**

Posteriormente, foi realizada a avaliação da morfologia dos biofilmes tratados com o EFPF (16A – 5000 e 1250 µg/mL e 92 - 625 µg/mL) ou o veículo (etanol 10%, v/v) pela



metodologia de microscopia confocal (COELHO *et al.*, 2008), com adaptações. A formação do biofilme foi semelhante à descrita no teste de inibição de formação de biofilme de 24 h (item 4.3.3.), com a modificação das amostras terem sido cultivadas em placas de poliestireno de 24 poços, com uma lamínula de vidro no fundo de cada poço. Após a incubação a 37°C por 24 horas, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS estéril e marcadas com SYTO 9 (Invitrogen) e iodeto de propídeo por 1 hora ao abrigo da luz; sendo lavadas novamente por mais 2 vezes com PBS estéril. O corante SYTO 9, que fluoresce verde, penetra em todos os microrganismos viáveis e não viáveis. O iodeto de propídeo penetra apenas nos microrganismos que apresentam danos na membrana celular, fazendo com que estas apresentem fluorescência vermelha, diferenciando assim as células viáveis das mortas. As preparações das células foram montadas com Vecta Shield em lâminas de microscopia. As lâminas foram então deixadas a secar a temperatura ambiente por alguns minutos, e a seguir, embaladas e congeladas a -20°C até serem avaliadas em Microscópio Confocal (Carl Zeiss LSM 510, Germany), equipado com laser Argônio (488 nm de comprimento de onda), e dois laser hélio/neônio (543 nm de comprimento de onda) para diferenciar a luminescência dos fluorocromos.

#### **4.4.3 Ensaio de liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de *S. aureus* tratados com EFPF**

O ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita por Bernardo *et al.* (2004) com algumas modificações. Foi realizado o crescimento dos isolados (16A, 92 e 112) e a cepa de *S. aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (MRSA), em meio TSB caldo suplementado de glicose 1% (v/v), e foi feito o inóculo padrão de 0,135 de absorbância a 660 nm (0,5 na escala McFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A seguir, as cepas foram tratadas com EFPF (*S. aureus* ATCC 43300 - 1250  $\mu$ g/mL, 16A-5000  $\mu$ g/mL, 92 - 625  $\mu$ g/mL, 112 - 625  $\mu$ g/mL) ou o veículo (etanol 10 %, v/v) e submetidas a crescimento em meio MEM (meio mínimo essencial) para a produção de endotoxinas (ácidos lipoteicóicos), sob agitação a 250 rpm, a 37°C por 24 horas. Após este processo, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22  $\mu$ m e utilizado para o ensaio de produção de citocinas. Para este ensaio, foi utilizada a linhagem

de macrófagos J774 crescida em meio MEM adicionada de 5% de soro fetal bovino (SFB). As células foram repicadas em garrafas de crescimento e ao atingir a densidade de  $10^6$  cel/mL, as células foram lavadas e transferidas para placas de microtitulação de 96 poços, na razão de 200  $\mu$ L por poço, e em seguida incubadas com 20  $\mu$ L do sobrenadante obtido das culturas de *S. aureus* tratadas e não tratadas com extrato, incubadas por 24 horas a 37°C, em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi aspirado o sobrenadante da cultura de células, acondicionado em microtubos estéreis e congelados até a dosagem das citocinas pela metodologia de ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*).

As determinações das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  produzidas no sobrenadante da cultura de células J774 foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do Kit utilizado (eBioscience, San Diego, CA). A determinação das citocinas foi realizada em triplicata.

#### **4.4.4 Avaliação da expressão gênica dos fatores de virulência de *S. aureus***

Foi avaliada a influência do EFPF sobre a expressão gênica dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* e *icaR* (genes ligados a formação de biofilme); genes *fnbA* e *fnbB* (fibronectinas estafilocócicas), *sea*, *seb* e *sec* (enterotoxinas estafilocócicas), *CfIA* (*clumping factor*), *Spa* (proteína A), *PVL* (Leucocidina de Pantón- Valentine) e *hla* (codificador de  $\alpha$ -hemolisina). Anteriormente foi avaliado a presença dos respectivos genes nos isolados e na cepa de *S. aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 (MRSA), pela metodologia de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), descrita por Milisavljevic *et al.* (2008).

As cepas de estafilococos foram cultivadas em meio TSB suplementado de glicose (1%), por 18 horas a 37°C, em agitação a 250 rpm. Após este processo, as amostras foram diluídas em meio TSB com 1% de glicose até a densidade ótica (D.O.) de 0,5 de absorbância a 600 nm (equivalente a  $1 \times 10^9$  cel/mL), medido em espectrofotômetro. Foi acrescida a suspensão bacteriana as concentrações subinibitórias do EFPF, 50 % da CIM respectiva a cada microrganismo, ou o veículo (etanol 10%, v/v). Para a cepa ATCC 43300, o EFPF foi testado na concentração de 62,5  $\mu$ g/mL, para o isolado 16A foi testado a 2000  $\mu$ g/mL, e para o isolado 112 a 125  $\mu$ g/mL. As amostras foram incubadas a 37°C, em agitação a 250 rpm, por 24 h. Alíquotas foram removidas nos tempos de 5 e 24 h de incubação, sendo registrada a absorbância a 600 nm, e realizado a análise da viabilidade das células planctônicas por meio

do indicador MTT, com leitura em espectrofotômetro a 492 nm. Parte da amostra foi imediatamente congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para análise por PCR. Posteriormente, as amostras foram submetidas a processo de extração do RNA por fenol/clorofórmio conforme ATSHAN *et al.* (2012). A síntese do cDNA seguiu as orientações do protocolo do fabricante do kit utilizado (iScript™ cDNA Synthesis kit, Bio Rad). Para a realização da PCR, foram utilizados os primers específicos da Invitrogen™ Life Technologies (Invitrogen, CA, EUA) para os genes conforme descrito abaixo, com as sequências de bases de acordo com Milisavljevic *et al.* (2008), Casagrande Proieiti *et al.* (2010) Kocsis *et al.* (2009) e Lee *et al.* (2007).

**Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados na amplificação das regiões promotoras dos genes.

Gene	Primers	Sequência (5'→3')
<i>fnbA</i>	Primer 1 (forward)	GCGGAGATCAAAGACAA
	Primer 2 (reverse)	CCATCTATAGCTGTGTGG
<i>fnbB</i>	Primer 1 (forward)	GGAGAAGGAATTAAGGCG
	Primer 2 (reverse)	GCCGTCGCCTTGAGCGT
$\alpha$ - <i>hla</i>	Primer 1 (forward)	AAAGGTACCATTGCTGGTC
	Primer 2 (reverse)	CAATTG GTA ATC ATC ACG AAC
<i>PVL</i>	Primer 1 (forward)	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA
	Primer 2 (reverse)	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC
<i>Sea</i>	Primer 1 (forward)	AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA
	Primer 2 (reverse)	GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA
<i>Seb</i>	Primer 1 (forward)	TCGCATCAAACCTGACAAACG
	Primer 2 (reverse)	GCAGGTACTCTATAAGTGCC
<i>Sec</i>	Primer 1 (forward)	GACATAAAAGCTAGGAATTT
	Primer 2 (reverse)	AAATCGGATTAACATTATCC
<i>CflA</i>	Primer 1 (forward)	GGCTTCAGTGCTTGTAGG
	Primer 2 (reverse)	TTTTCAGGGTCAATA TAAGC
<i>Spa</i> (região X)	Primer 1 (forward)	CAAGCACCAAAAGAGGAA
	Primer 2 (reverse)	CACCAGGTTTAAACGACAT
<i>16S rRNA</i>	Primer 1 (forward)	CCGCCTGGGGAGTACG
	Primer 2 (reverse)	AAGGGTTGCGCTCGTTGC
<i>icaA</i>	Primer 1 (forward)	TGCACTCAATGAGGGAATCA
	Primer 2 (reverse)	TGCGCCTAATTTTGGATTCT
<i>icaB</i>	Primer 1 (forward)	GCGCACTCGCGTTAAACTAT
	Primer 2 (reverse)	CGTGTGCTTTAAGCCATTGA
<i>icaC</i>	Primer 1 (forward)	TTGTTTTCTTGGCGATTTCA
	Primer 2 (reverse)	TTCCAGTTAGGCTGGTATTGG
<i>icaD</i>	Primer 1 (forward)	AAGCCCAGACAGAGGCAATA
	Primer 2 (reverse)	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA
<i>icaR</i>	Primer 1 (forward)	GATCCTACGCACATCGCTTT
	Primer 2 (reverse)	CCCGAATTTTTGTGAAAAGG

O cDNA foi amplificado no termociclador BIONEER MyGenie™ 96 Thermal Block (BIONEER CORPORATION, Daejeon, Korea) e os reagentes foram fornecidos pela Invitrogen™ Life Technologies (Invitrogen, CA, EUA). Os reagentes e as condições da PCR

estão descritos nos ANEXOS 1 e 2. A temperatura de anelamento variou conforme o par de primers utilizado. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% (Agarose padrão de baixa eletroendosmose - Agargen) elaborado com tampão TAE (40m M TRIS-ácido acético, 2 mM EDTA, pH 8,0), sendo em seguida corado com brometo de etídio (10mg/mL). O tamanho dos produtos da PCR foi determinado por comparação com o padrão 100 pb (Invitrogen). Os géis de agarose contendo os produtos amplificados foram digitalizados e analisados pelo software Image J, que forneceu valores numéricos que permitiram uma comparação semi-quantitativa entre os genes alvo e o gene do controle interno (16s rRNA de *S. aureus*). Foi realizada uma triplicata para cada experimento.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos do ensaio inflamatório da produção de citocinas e avaliação da expressão gênica dos fatores de virulência de *S. aureus* foram analisados estatisticamente. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas. Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e para as comparações entre os grupos foi realizada a análise de variância (ANOVA, 1 fator, abordagem paramétrica) seguida pelo teste Bonferroni usando o software GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 5.00). Quando necessário foi utilizado o teste “t”, seguido de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *P. flexuosa* (EFPF) CONTRA *S. aureus*.

Para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da folha de *Phanera flexuosa* (EFPF) foram realizados os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados de CIM e CBM do EFPF com as bactérias *S. aureus* ATCC 43300, e os isolados identificados previamente como MRSA estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz - EFPF na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e na concentração bactericida mínima (CBM) de *S. aureus* resistentes a antibióticos (MRSA).

Cepas de <i>S. aureus</i>	EFPF	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	125	#
Isolado 16 A	4.000	#
Isolados 41, 59, 61.2, 62, 101	1.000	#
Isolados 17A, 39, 42, 67, 74, 91, 105, 108, 116	500	#
Isolados 12D, 66, 112	250	1.000 (12D)
Isolados 27A, 27B, 28, 29, 33A, 43.1, 47.1, 52, 76, 85.1, 85.2, 92, 113	125	500 (29) e 4.000 (47.1, 92)

# Sem atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.  
Concentrações testadas de 125 a 4.000  $\mu\text{g/mL}$ .

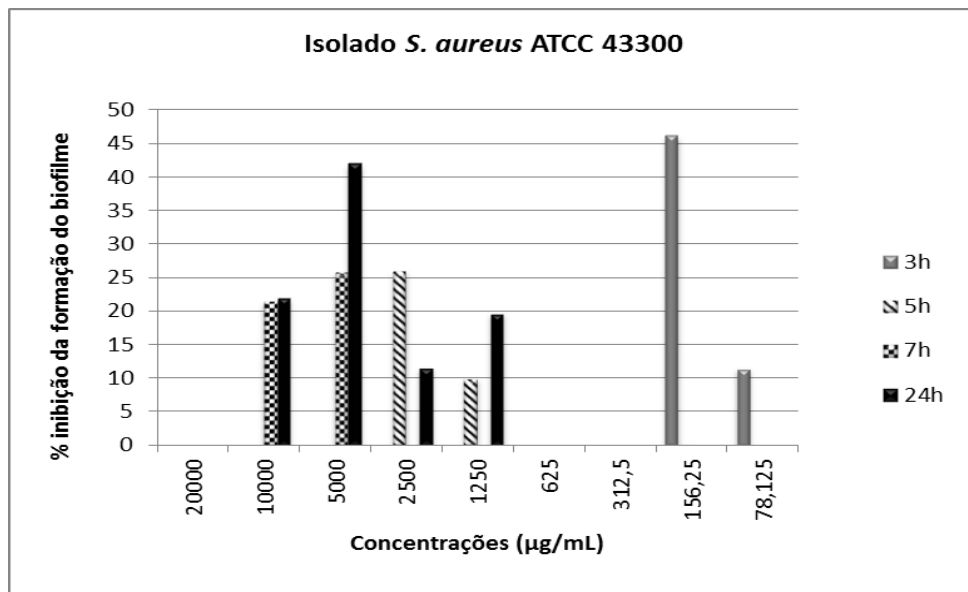
O EFPF apresentou atividade antimicrobiana frente todas as bactérias MRSA testadas, sendo o menor valor de CIM (125  $\mu\text{g/mL}$ ) obtido foi para a cepa ATCC 43300 e para os isolados 27A, 27B, 28, 29, 33A, 43.1, 47.1, 52, 76, 85.1, 85.2, 92 e 113. O isolado 16A apresentou os maiores valores de CIM (4000  $\mu\text{g/mL}$ ). Quanto a atividade bactericida do EFPF, houve atividade somente para quatro isolados: 12D (CBM de 1.000  $\mu\text{g/mL}$ ), 29 (CBM de 500  $\mu\text{g/mL}$ ), 47.1 e 92 (CBM de 4.000  $\mu\text{g/mL}$ ). Não houve atividade bactericida, até a máxima concentração testada de 4.000  $\mu\text{g/mL}$ , para a cepa ATCC 43300, e os isolados 16A, 17A, 39, 41, 42, 59, 61.2, 62, 67, 74, 91, 101, 105, 108, 116. Observa-se que para a maioria

dos isolados MRSA, os valores de CIM foram maiores do que a cepa ATCC 43300, indicando uma maior resistência desses isolados à atividade antimicrobiana do EFPP. Também foi necessária uma concentração no mínimo quatro vezes maior que a CIM para o EFPP apresentar atividade bactericida sobre quatro isolados, 12D, 29, 47.1 e 92.

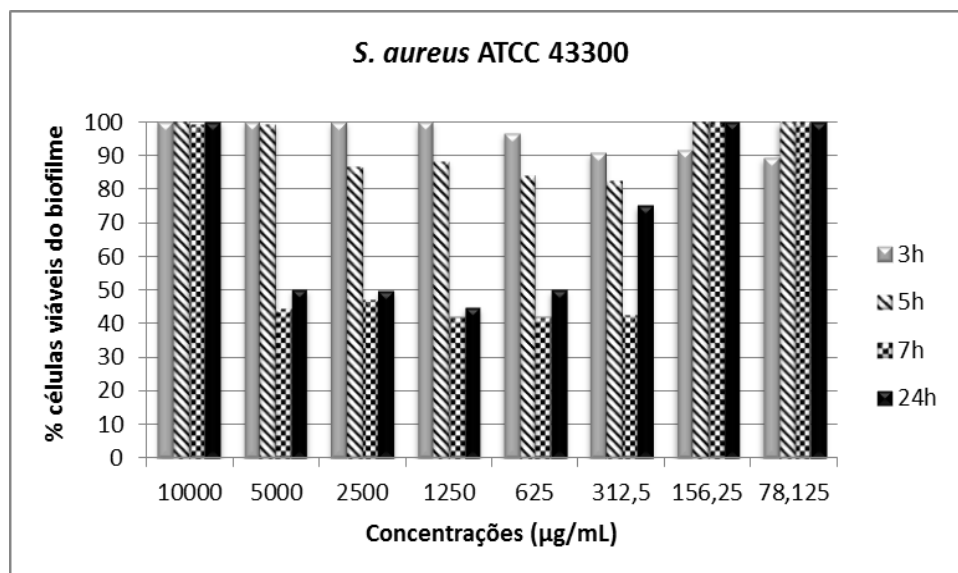
## 5.2 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR EFPP

Foi avaliada a capacidade do EFPP em inibir a formação do biofilme de *S. aureus* MRSA e de alterar a viabilidade dessas células em relação ao biofilme tratado pelo veículo. Para isto, a evolução da formação dos biofilmes foi avaliada em termos de formação da biomassa total (polissacarídeos e bactérias), usando-se para tal a coloração com violeta cristal. Para avaliar a evolução do biofilme em termos de atividade metabólica de células viáveis, utilizou-se a revelação com o MTT.

Quanto ao biofilme de *S. aureus* ATCC 43300 (Figura 2A), observa-se que as menores concentrações (156,25 µg/mL) de EFPP conseguiram inibir a formação do biofilme de 3h em aproximadamente 45 % e foram necessárias concentrações maiores para inibir os biofilmes de 5, 7 e 24h, com concentrações e inibição respectivamente de 2500 µg/mL (25%), 5000 µg/mL (25%), 5000 µg/mL (43%). Quanto à viabilidade do biofilme de *S. aureus* ATCC 43300 (Figura 2B), observa-se que as melhores concentrações que reduziram as porcentagens das células viáveis dos biofilmes foram de 312,5 µg/mL para 7 h e 1250 µg/mL para 24 h, com menores porcentagens de células viáveis, entre 40 e 50 %. Para os tempos de crescimento do biofilme de 3 e 5 h observa-se que o EFPP não foi tão efetivo, pois os biofilmes mantiveram o número de células viáveis acima de 80 %. Desta forma, o EFPP precisou de mais tempo para exercer a atividade antimicrobiana e com aumento de concentração para o tempo de 24 h.



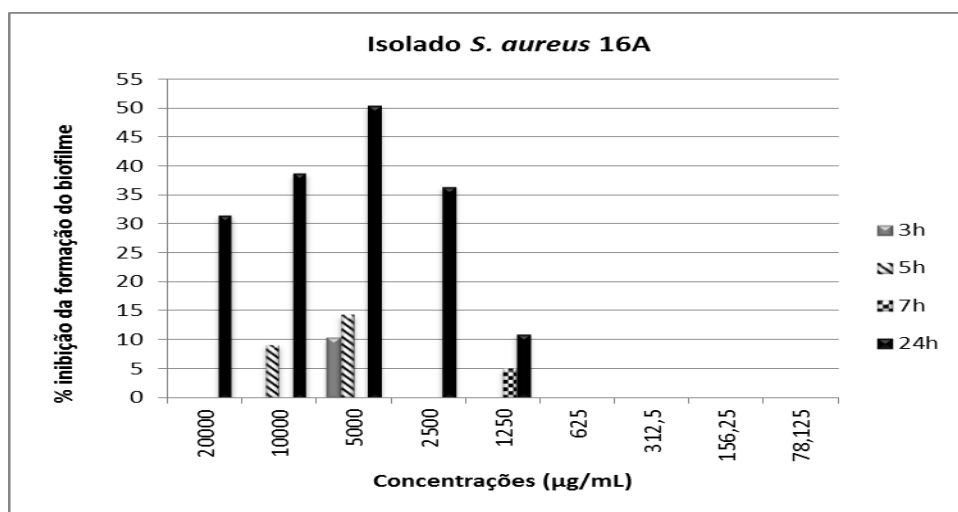
**Figura 2A** – Inibição da formação do biofilme de *S. aureus* ATCC 43300 resistente a antibióticos pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada ao comparar a média dos valores de absorbância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelo EFPP em relação ao veículo.



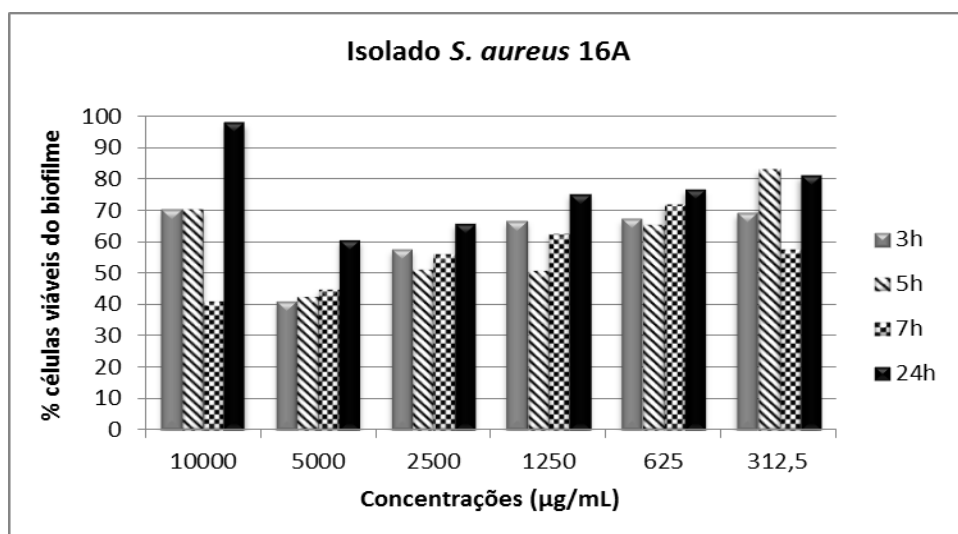
**Figura 2B** – Viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* ATCC 43300 resistente a antibióticos – MRSA pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. O resultado de viabilidade celular do biofilme foi apresentado em porcentagem de biofilme viável formado comparando as médias de absorbância obtidas da leitura do crescimento dos biofilmes tratados com EFPP em relação ao tratado com o veículo.

Para o isolado 16A (Figura 3A), as maiores porcentagens de inibição de formação de biofilme ocorreram para as concentrações maiores de EFPP e no tempo de

24 h, como para a concentração de 5000  $\mu\text{g/mL}$ , com inibição de 50,43 % da formação do biofilme. Para esta cepa, também é necessário um maior tempo de tratamento para que haja a ação inibitória sobre o biofilme. Para a viabilidade celular (Figura 3B), a concentração que conseguiu a menor porcentagem de células viáveis foi de 5000  $\mu\text{g/mL}$ , não só para o tempo de 24 h (60 % células viáveis) como demonstrado com o cristal de violeta, mas também para os demais tempos de 3, 5 e 7 h, com porcentagem de células viáveis entre 40 e 50 %.



**Figura 3A** – Inibição da formação do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 16A) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada ao comparar a média dos valores de absorbância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelo EFPP em relação ao veículo.

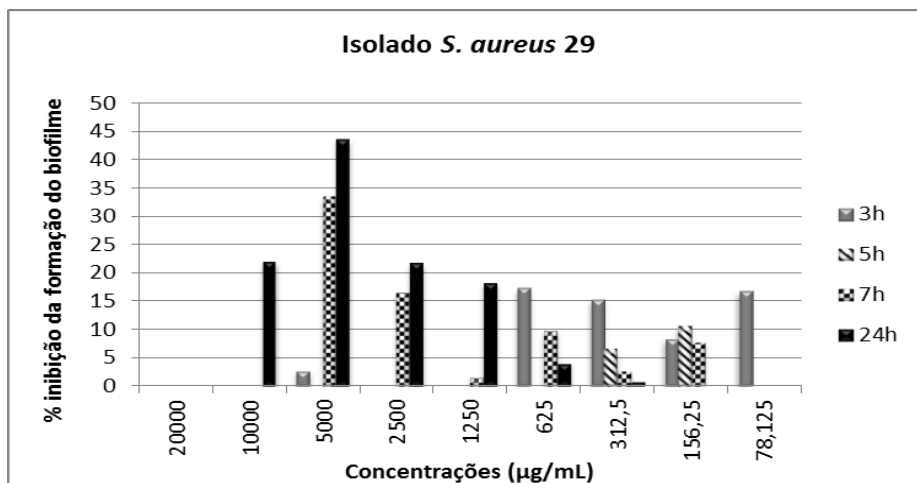


**Figura 3B** – Viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 16A) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz –

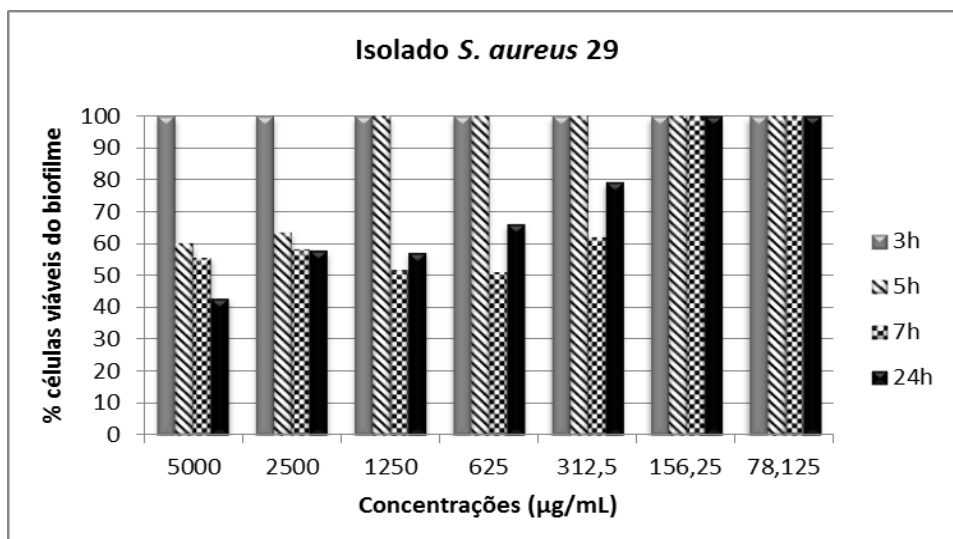


EFPF. O resultado de viabilidade celular do biofilme foi apresentado em porcentagem de biofilme viável formado comparando as médias de absorbância obtidas da leitura do crescimento dos biofilmes tratados com EFPF em relação ao tratado com o veículo.

Para o isolado 29A, a maior inibição de formação foi encontrada para a concentração de 5000 µg/mL para os tempos de 7 e 24 h, sendo que com maior tempo de tratamento (24h) houve redução de aproximadamente 43% da formação do biofilme (Figura 4A). O mesmo resultado foi observado para a viabilidade celular com menor porcentagem (42,96 % =  $9,0 \times 10^7$  UFC/biofilme) para a mesma concentração e 24 h de tratamento (Figura 4B). No tempo de 3 h, nenhuma das concentrações conseguiu diminuir a viabilidade celular dos biofilmes deste isolado.

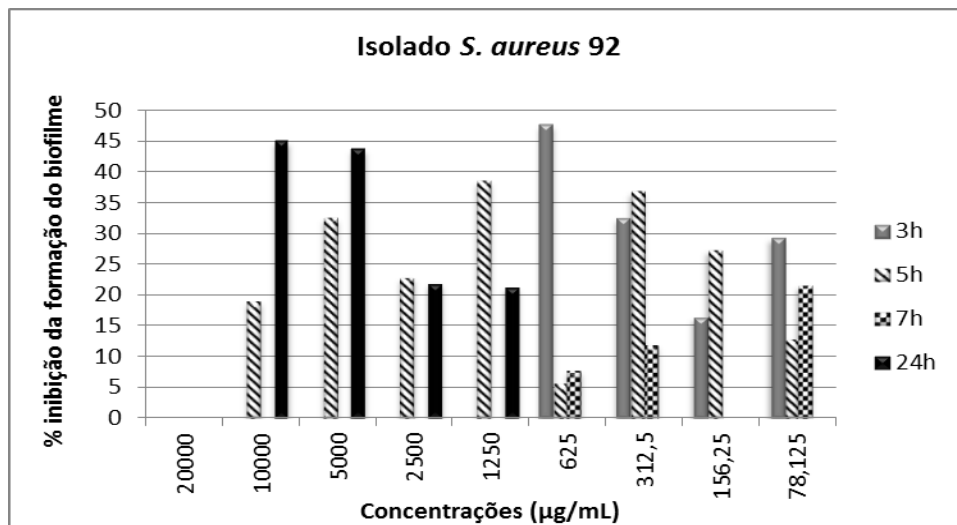


**Figura 4A** – Inibição da formação do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 29) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Morici.) L. P. Queiroz – EFPF. A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada ao comparar a média dos valores de absorbância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelo EFPF em relação ao veículo.

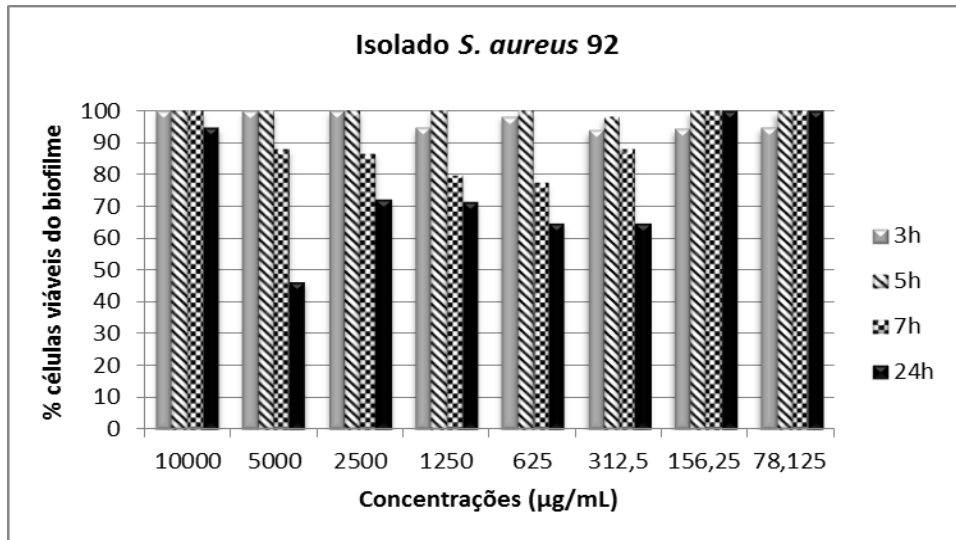


**Figura 4B** – Viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 29) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. O resultado de viabilidade celular do biofilme foi apresentado em porcentagem de biofilme viável formado comparando as médias de absorbância obtidas da leitura do crescimento dos biofilmes tratados com EFPP em relação ao tratado com o veículo.

O EFPP para o isolado 92 apresentou diferente perfil de inibição do biofilme (Figura 5A), sendo que para os menores tempos de crescimento, 3 e 5 h, as concentrações efetivas foram 625 e 1250  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, com inibição de formação entre 35 e 50 %. Já para 7 h foi necessária uma concentração mínima de 78,125  $\mu\text{g/mL}$  para promover 20 % de inibição. E para os biofilmes de 24 h foram necessárias concentrações maiores de 5000 a 10000  $\mu\text{g/mL}$  para haver de 40 a 50 % de inibição da formação deste biofilme. No entanto, no teste de viabilidade celular (Figura 5B), praticamente não houve redução das células viáveis dos biofilmes de 3 e 5h, sendo novamente os melhores resultados obtidos com os biofilmes de 24 h de tratamento com a concentração de 5000  $\mu\text{g/mL}$ , e inibição de 46,21 % ( $1,55 \times 10^7$  UFC/biofilme).

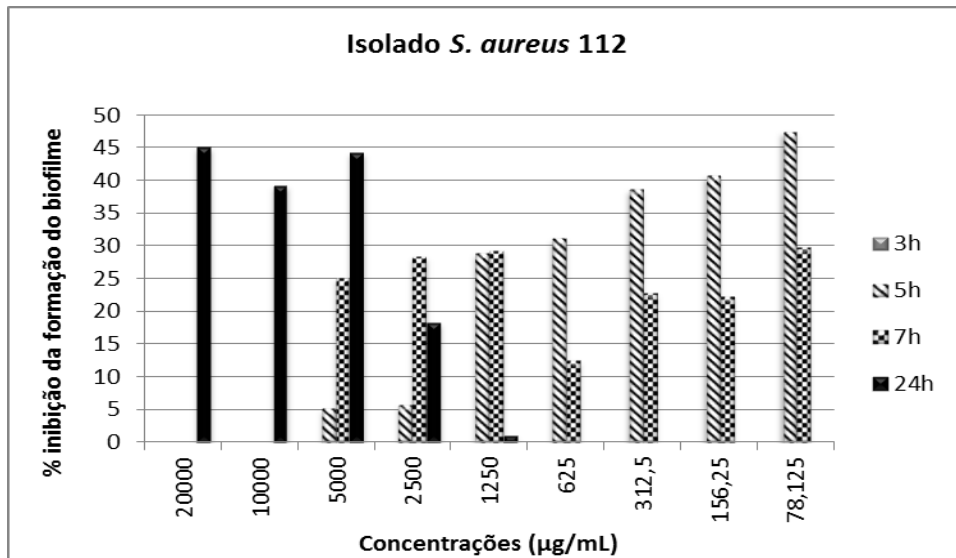


**Figura 5A** – Inibição da formação do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 92) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada ao comparar a média dos valores de absorbância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelo EFPP em relação ao veículo.

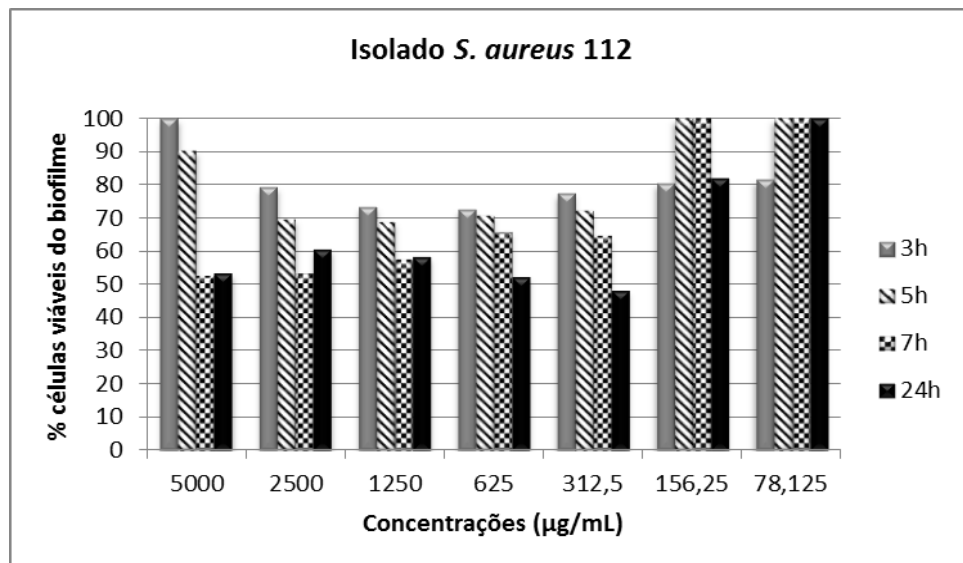


**Figura 5B** – Viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 92) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPF. O resultado de viabilidade celular do biofilme foi apresentado em porcentagem de biofilme viável formado comparando as médias de absorbância obtidas da leitura do crescimento dos biofilmes tratados com EFPF em relação ao tratado com o veículo.

E por último, para o isolado 112, não houve inibição de formação por qualquer concentração testada nos biofilmes de 3h, sendo que houve um aumento nas porcentagens de inibição para o biofilme de 5 e 7 h com as menores concentrações, como 78,125 µg/mL (46 – 30 %)(Figura 6A). Já para o tempo de 24 h, foi preciso concentrações maiores entre 5000 e 20000 µg/mL para ocorrer inibição da formação do biofilme entre 35 e 45 %. Para a viabilidade celular deste isolado (Figura 6B), observa-se que todos os tempos apresentaram diminuição da viabilidade das células do biofilme, sendo que as concentrações entre 312,5 e 5000 µg/mL apresentaram os menores valores de células viáveis ficando entre 40 e 60 %. Já para os biofilmes de 3, 5 e 24 h. Já para os biofilmes de 7 h, apresentaram menores valores de células viáveis entre as concentrações de 2500 e 5000 µg/mL.



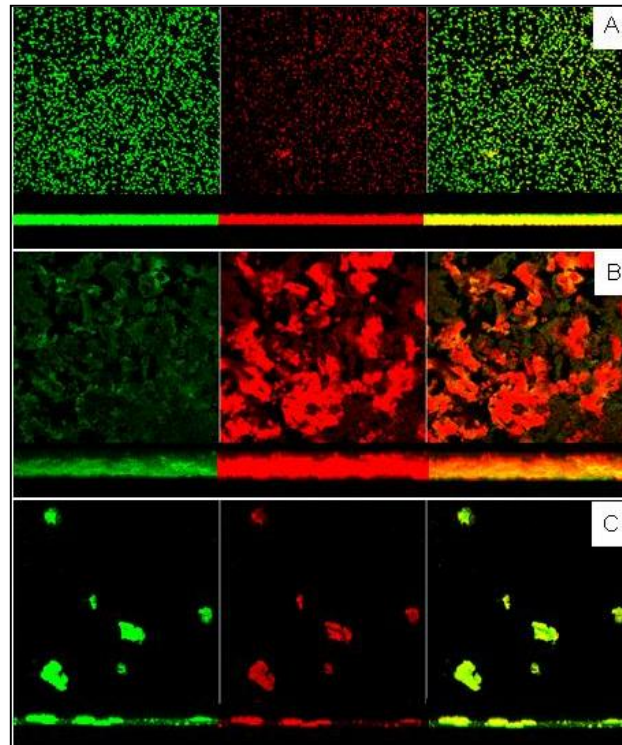
**Figura 6A** – Inibição da formação do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 112) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada ao comparar a média dos valores de absorbância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelo EFPP em relação ao veículo.



**Figura 6B** – Viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* resistente a antibióticos – MRSA (isolado 112) pelo extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz – EFPP. O resultado de viabilidade celular do biofilme foi apresentado em porcentagem de biofilme viável formado comparando as médias de absorbância obtidas da leitura do crescimento dos biofilmes tratados com EFPP em relação ao tratado com o veículo.

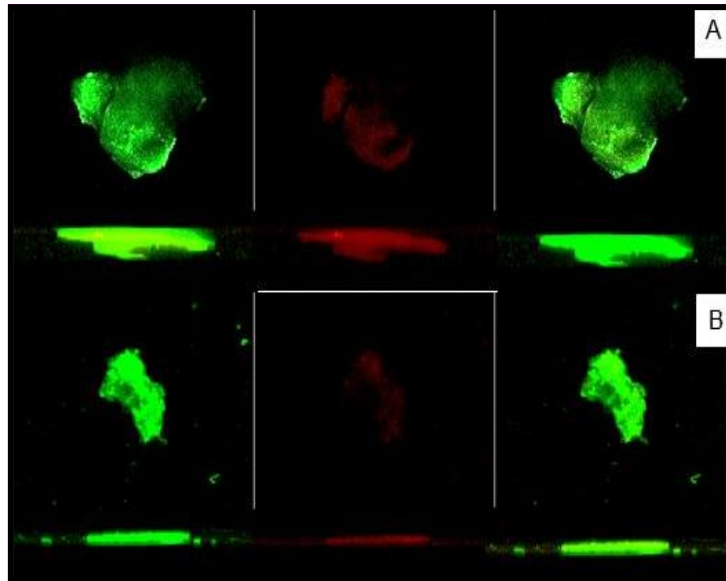
### 5.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DO BIOFILME TRATADO COM EFPP

As Figuras 7 e 8 apresentam as microscopias dos biofilmes dos isolados de *S. aureus* MRSA 16A e 92. A cor verde fluorescente são as células coradas por SYTO 9 e corado de vermelho fluorescente são células coradas por iodeto de propídio (PI), ambos fluorocromos se ligam ao DNA. Quando usado sozinho, em geral o SYTO 9 cora todas as bactérias em uma população, tanto aquelas com membranas intacta quanto lesadas. Em contraste, PI penetra apenas em bactérias com membranas danificadas, provocando uma redução na fluorescência do SYTO 9 (mancha verde) quando ambos os corantes estão presentes. Já a cor amarela é um composto de verde e vermelho, e é expressa quando microrganismos vivos (SYTO 9 positivo: verde) e mortos (PI-positivo: vermelho) foram detectados no mesmo plano de secção. A Figura 7 é a microscopia dos biofilmes de 24 h do isolado de *S. aureus* 16A, utilizando o método de microscopia confocal a laser, sendo que (A) foi tratado com o veículo (etanol 10%, v/v), (B) tratado com EFPP (5000 µg/mL) e (C) tratado com EFPP (1250 µg/mL). O biofilme do isolado 16A tratado com o veículo possui tanto células viáveis (verde) quanto não viáveis (vermelho), apresentando maior quantidade de células viáveis e estando bem distribuídas, tanto na superfície quanto na parte mais profunda do biofilme. Já no biofilme tratado por EFPP na concentração de 5000 µg/mL, observa-se uma maior quantidade de células não viáveis do que viáveis, destacando que na superfície do biofilme há um maior número de células não viáveis (vermelho), e na parte mais profunda um maior número de células viáveis (verde). Na projeção lateral, a coloração do grupo veículo é amarelada devido à sobreposição da cor vermelha (células mortas) e verde (células viáveis), com a borda superior esverdeada, enquanto no grupo tratado com EFPP observa-se a predominância da cor vermelha na superfície, e uma menor coloração amarela e verde na base, indicando uma maior quantidade de células mortas. Também há uma maior matriz polissacarídica formada entre as células tratadas com EFPP em relação ao biofilme tratado com o veículo, formando um biofilme mais denso. Já para o biofilme tratado com EFPP a 1250 µg/mL, observa-se uma redução da massa total do biofilme, com falhas na sua formação, com áreas de maior densidade do que outras. Há uma quantidade e distribuição semelhante de células viáveis e não viáveis, com predomínio de coloração amarela na projeção lateral.



**Figura 7.** Micrografia dos biofilmes do isolado *S. aureus* 16A tratados com veículo ou o extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (EFPP) pela microscopia confocal a laser. (A) Biofilmes formados em 24 h tratados com o veículo (etanol 10%, v/v). (B) Biofilmes formados em 24 h tratados com EFPP (5000 µg/mL). (C) Biofilmes formados em 24 h tratados com EFPP (1250 µg/mL). Biofilmes foram corados com SYTO 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho).

A Figura 8 é a microscopia dos biofilmes de 24 h do isolado de *S. aureus* MRSA 92, utilizando o método de microscopia confocal a laser, sendo que (A) foi tratado com o veículo (etanol 10%, v/v) e (B) tratado com EFPP (625 µg/mL). Observa-se que o biofilme tratado com veículo possui uma maior quantidade de células viáveis (verde) do que células mortas (vermelho), destacando na projeção lateral a cor verde. Para o biofilme tratado com EFPP (625 µg/mL), há o predomínio da coloração verde, ou seja, há um maior número de células viáveis do que as células mortas (vermelho), mas não na mesma proporção que o veículo, pois na projeção lateral do biofilme tratado pode-se ver a presença da cor vermelha e verde separadamente, enquanto no veículo se vê a coloração amarela, a sobreposição de células viáveis e não viáveis. Também é claro a redução da quantidade de massa total do biofilme formado.



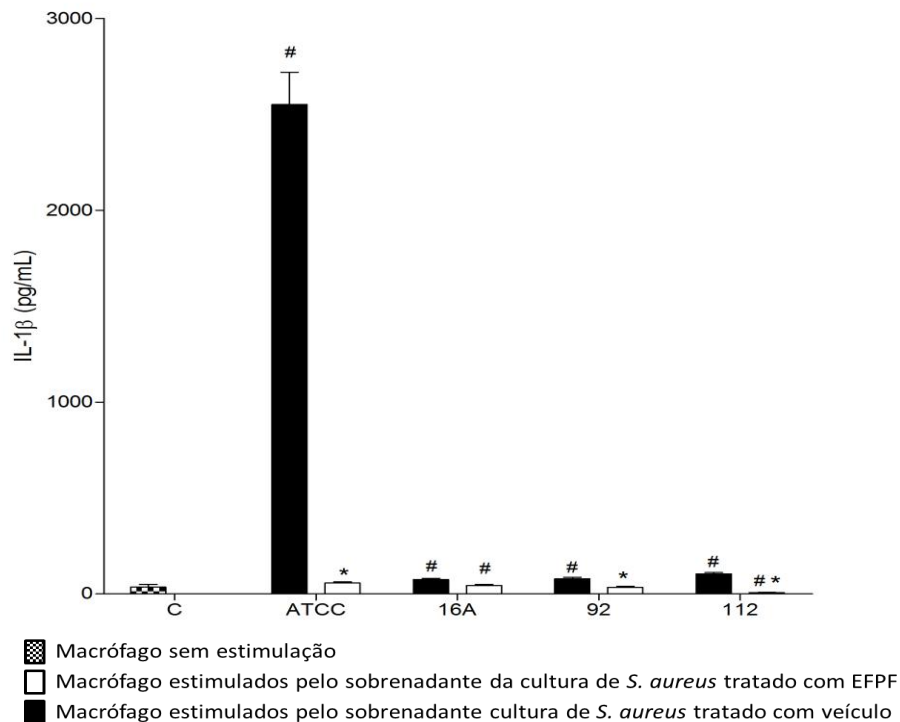
**Figura 8.** Micrografia dos biofilmes do isolado *S. aureus* 92 tratados com veículo ou o extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (EFPF) pela microscopia confocal a laser. (A) Biofilmes formados em 24 h tratados com o veículo (etanol 10%, v/v). (B) Biofilmes formados em 24 h tratados com EFPF (625 µg/mL). Biofilmes foram corados com SYTO 9 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho).

#### **5.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ) E INTERLEUCINAS (IL-1 $\beta$ , IL-6 E IL-10) POR MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM EXOTOXINAS DE *S. aureus* TRATADOS COM EFPF**

A cultura de células J774 (macrófagos) foi estimulada pelo sobrenadante produzido por *S. aureus* tratado com EFPF ou com o veículo. A quantidade de citocinas liberadas pelas células J774 foi determinada. No grupo controle, a célula J774 não foi tratada com o sobrenadante das cepas, sendo medida a produção natural das citocinas pela própria célula. *S. aureus* ATCC 43300 foi tratado com o EFPF na concentração de 1250 µg/mL (10 x CIM), o isolado 16A na concentração de 5000 µg/mL, isolado 92 na concentração de 625 µg/mL, e o isolado 112 foi submetido à concentração de 625 µg/mL de EFPF. No grupo veículo foi utilizado etanol 10%, v/v.

Os resultados da determinação da quantidade da citocina IL-1 $\beta$  produzida no sobrenadante da cultura de células J774, após estimulação pelas exotoxinas produzidas por *S. aureus* ATCC 43300, 16A, 92 e 112 estão descritos na Figura 9. Observa-se que para a cepa ATCC e o isolado 92, a produção de IL-1 $\beta$  foi estimulada pelo veículo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e o EFPF diminui a produção da interleucina em níveis semelhantes ao

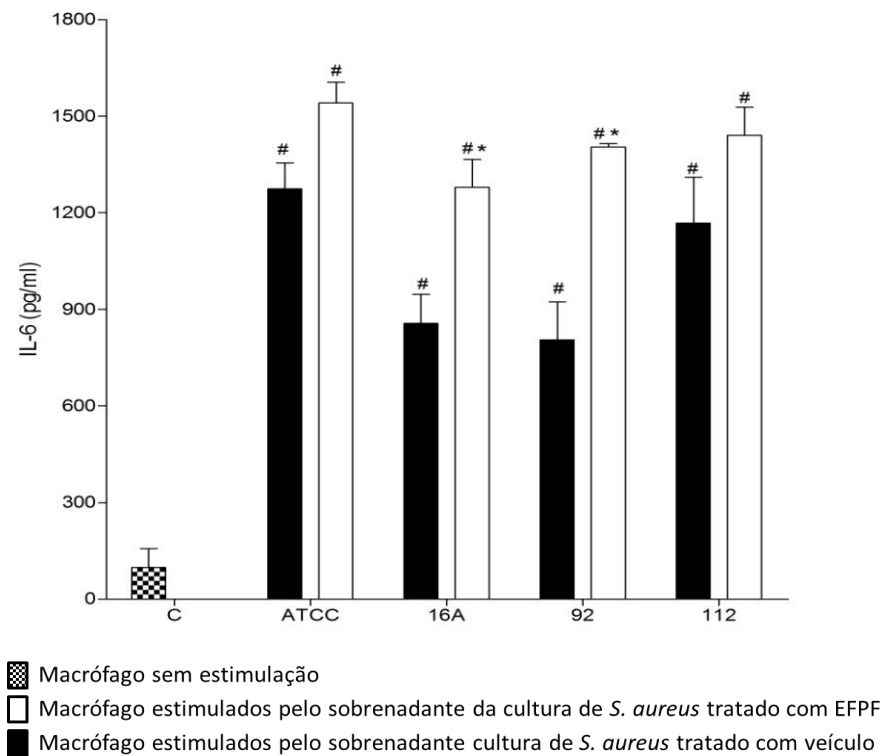
grupo controle ( $p > 0,05$ ). Para o isolado 16A, houve semelhante aumento da produção da interleucina tanto no grupo EFPP quanto no veículo ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Para o isolado 112, houve aumento da produção de IL-1 $\beta$  no grupo veículo ( $p < 0,05$ ) e diminuição da interleucina no grupo EFPP em relação ao grupo controle e veículo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9** – Determinação da liberação da interleucina IL-1 $\beta$  por macrófagos J774 estimulados com endotoxinas de *S. aureus* tratados com EFPP ou veículo (Etanol 10%, v/v). Grupo C (controle negativo) - Macrófagos sem tratamento. Grupo ATCC – Macrófagos estimulados com sobrenadante de *S. aureus* ATCC 43300 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPP) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 16A – Macrófagos estimulados com sobrenadante do isolado clínico *S. aureus* 16A tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPP) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 92 – Macrófagos estimulados com sobrenadante do isolado clínico *S. aureus* 92 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPP) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 112 – Macrófagos estimulados com sobrenadante do isolado clínico *S. aureus* 112 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPP) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  D.P da concentração produzida de IL-1 $\beta$  ( $n = 3$ ). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparando os grupos C, *S. aureus* tratado por veículo e por EFPP. # Indica diferença estatística em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ). \*Indica diferença estatística entre o grupo tratado com EFPP e tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ).

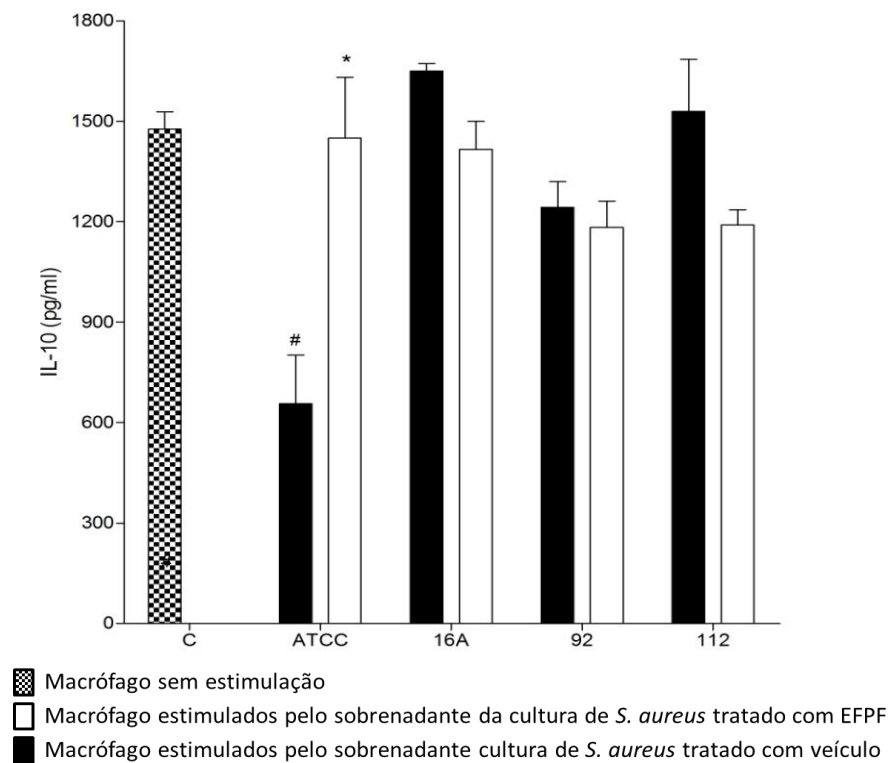
Avaliando a liberação de IL-6 (Figura 10), todos os grupos EFPP e do veículo, com todas as cepas tratadas, estimularam a maior produção desta interleucina pelos macrófagos em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), não estimulado por sobrenadante de *S. aureus*. Para as cepas ATCC e 112, houve o aumento da liberação de interleucinas pelo grupo tratado com EFPP em relação ao veículo, mas insuficiente para apresentar diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Já para os isolados 16A e 92, o grupo EFPP apresentou maior estimulação e produção de IL-6 do que o grupo veículo ( $p < 0,05$ ).





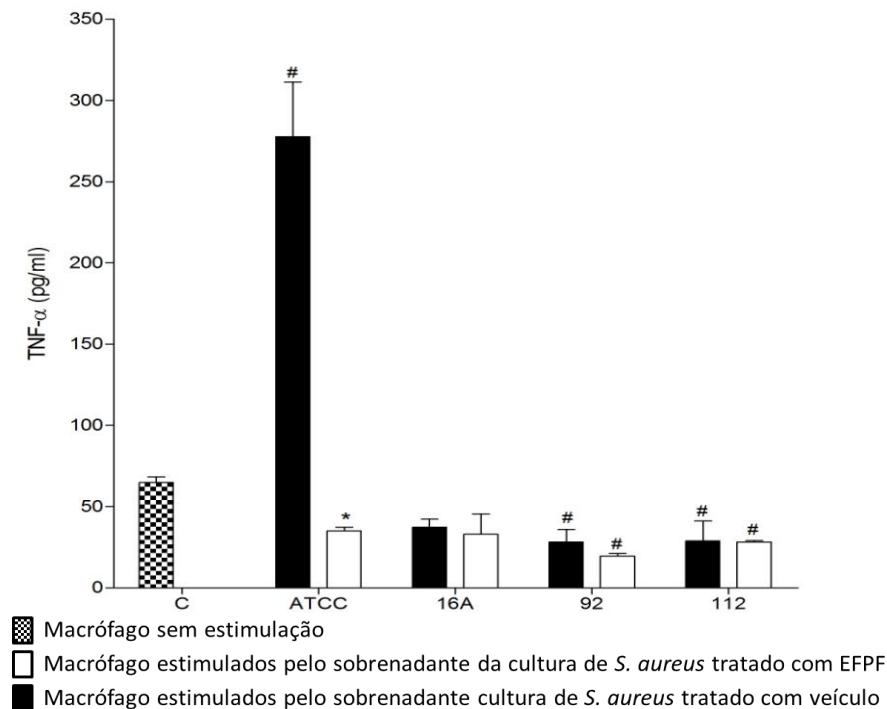
**Figura 10** – Determinação da liberação da interleucina IL-6 por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de *S. aureus* tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v). Grupo C (controle negativo) - Macrófagos sem tratamento. Grupo ATCC – Macrófagos estimulados com sorbenadante de *S. aureus* ATCC 43300 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 16A – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 16A tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 92 – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 92 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 112 – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 112 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  D.P da concentração produzida de IL-6 ( $n = 3$ ). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparando os grupos C, *S. aureus* tratado por veículo e por EFPF. # Indica diferença estatística em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ). \*Indica diferença estatística entre o grupo tratado com EFPF e tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ).

Para a IL-10 (Figura 11), somente o grupo ATCC tratado por veículo apresentou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle, sendo que os demais grupos e cepas não apresentaram diferença estatística para o controle ( $p > 0,05$ ). Houve diferença na produção de IL-10 somente no grupo tratado com EFPF em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ), restabelecendo os níveis de liberação da interleucina do grupo controle ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11** – Determinação da liberação da interleucina IL-10 por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de *S. aureus* tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v). Grupo C (controle negativo) - Macrófagos sem tratamento. Grupo ATCC – Macrófagos estimulados com sorbenadante de *S. aureus* ATCC 43300 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 16A – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 16A tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 92 – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 92 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 112 – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 112 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  D.P da concentração produzida de IL-10 (n = 3). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparando os grupos C, *S. aureus* tratado por veículo e por EFPF. # Indica diferença estatística em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ). \*Indica diferença estatística entre o grupo tratado com EFPF e tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ).

Para o TNF- $\alpha$ , em relação ao grupo controle, houve aumento da liberação desta no grupo veículo da ATCC ( $p < 0,05$ ), sendo que para a cepa 92 e 112, houve diminuição da liberação de TNF- $\alpha$  nos grupos tratados com EFPF e veículo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Para a cepa 16A não houve diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), e também entre grupo EFPF e veículo. Observa-se que para a cepa ATCC, o grupo tratado diminui a liberação de TNF- $\alpha$  em relação ao veículo ( $p < 0,05$ ), em nível semelhante ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Para os isolados 92 e 112, não houve diferença entre grupo tratado com EFPF e veículo ( $p > 0,05$ ), sendo que ambos mantiveram níveis de produção de TNF- $\alpha$  inferiores ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



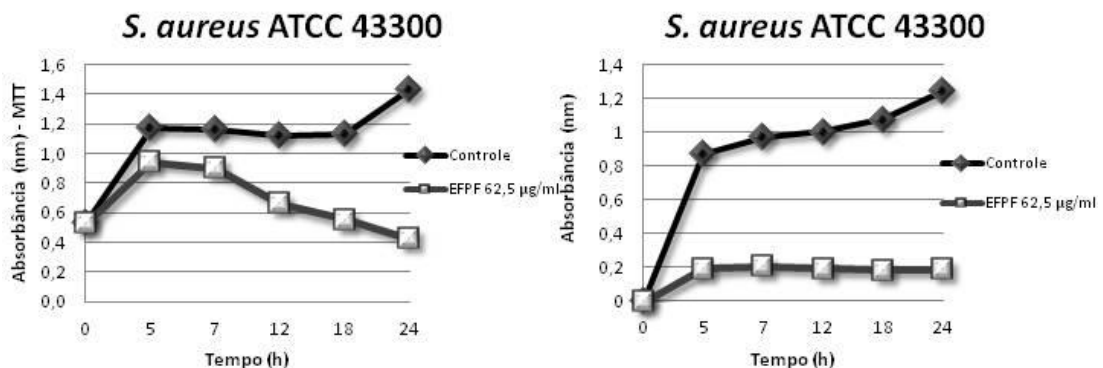
**Figura 12** – Determinação da liberação da interleucina TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 estimulados com exotoxinas de *S. aureus* tratados com EFPF ou veículo (Etanol 10%, v/v). Grupo C (controle negativo) - Macrófagos sem tratamento. Grupo ATCC – Macrófagos estimulados com sorbenadante de *S. aureus* ATCC 43300 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 16A – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 16A tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 92 – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 92 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Grupo 112 – Macrófagos estimulados com sorbenadante do isolado clínico *S. aureus* 112 tratados com o extrato da folha de *Phanera Flexuosa* (EFPF) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  D.P da concentração produzida de TNF- $\alpha$  (n = 3). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparando os grupos C, *S. aureus* tratado por veículo e por EFPF. # Indica diferença estatística em relação ao grupo C (p < 0,05). \*Indica diferença estatística entre o grupo tratado com EFPF e tratado com o veículo (p < 0,05).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPF) no crescimento planctônico de *S. aureus* MRSA foi avaliado por meio da medida da absorbância de uma alíquota da suspensão em crescimento a 600 nm e avaliada a viabilidade celular por meio do indicador MTT. As concentrações testadas do EFPF para este ensaio foram subinibitórias, ou seja, 50 % do valor da CIM de cada cepa. Para a cepa ATCC 43300, o EFPF foi testado na concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , para o isolado 16A foi testado a 2000  $\mu\text{g/mL}$ , e para o isolado 112 a 125  $\mu\text{g/mL}$ . As concentrações subinibitórias foram escolhidas

para que a partir deste teste também fosse possível avaliar a expressão gênica de fatores de virulência por meio da metodologia de PCR.

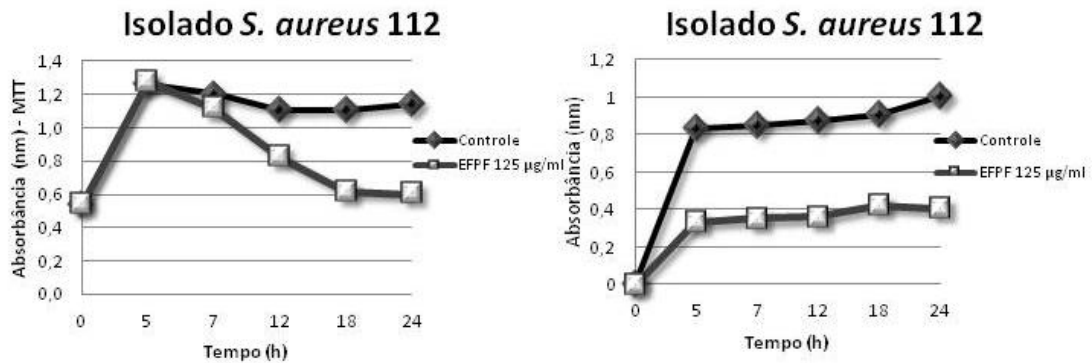
Para a cepa ATCC 43300 (Figura 13), observa-se já no tempo de 5 h que o EFPP consegue diminuir a biomassa total formada na fase exponencial em aproximadamente 75% em relação ao grupo veículo, ou seja, diminuiu a divisão celular já que esta fase possui a característica de haver uma grande multiplicação de células, tendo aproximadamente o número de células dobrado a cada geração. A partir de 5 h, o EFPP manteve a mesma absorvância da suspensão bacteriana até o período de 24 h, entrando em uma fase estacionária, onde a taxa de divisão celular é próxima à taxa de morte celular, enquanto o grupo veículo manteve na fase estacionária, mas ainda com uma taxa de divisão maior que a de morte celular. Quanto à viabilidade celular bacteriana, já no período de 5 h houve redução em aproximadamente 15 % do número de células viáveis na fase exponencial em relação ao veículo, mantendo-se durante o período de 5 a 7 h (fase estacionária). Após 7 h, observa-se uma diminuição progressiva da viabilidade celular, chegando a um metabolismo mínimo das células viáveis no período entre 18 e 24h, enquanto o grupo veículo continua a ter aumento de células viáveis e crescimento bacteriano.



**Figura 13.** Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPP) sobre o crescimento planctônico de *S. aureus* ATCC 43300. A avaliação do crescimento planctônico de *S. aureus* MRSA com o tratamento de EFPP (62,5 µg/mL) ou veículo (Controle - Etanol 10%, v/v) foi avaliada por meio da medida da absorvância a 600 nm e absorvância a 492 nm após indicação com o MTT.

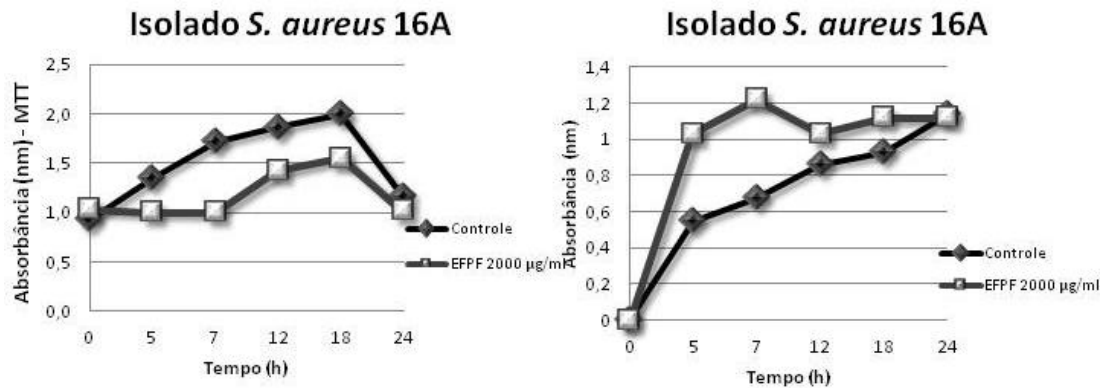
Já para o isolado 112 (Figura 14), o EFPP foi capaz de diminuir a biomassa total formada no tempo de 5 h, ou seja, apresentar uma diminuição do número de divisão celular em aproximadamente 50 % em relação que o grupo controle. A partir de 5 h, manteve-se a fase estacionária até 24 h, com a taxa de crescimento semelhante à mortalidade, mas com redução de 50% em relação ao grupo controle. No entanto, a viabilidade celular desse isolado manteve-se inalterada em relação ao grupo veículo até 5 h, começando a ser reduzida a partir

de 5 h, chegando a aproximadamente 33 % de redução de células viáveis em relação ao veículo no tempo de 12 h, começando a fase de declínio exponencial enquanto o veículo continua em fase exponencial. A redução de viabilidade celular continua até o período de 18-24 h, onde praticamente não houve detecção de metabolismo celular.



**Figura 14.** Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPP) sobre o crescimento planctônico do isolado *S. aureus* 112. A avaliação do crescimento planctônico do isolado de *S. aureus* 112 com o tratamento de EFPP (125µg/mL) ou veículo (Controle - Etanol 10%, v/v) foi avaliada por meio da medida da absorbância a 600 nm e absorbância a 492 nm após indicação com o MTT.

Já para o isolado 16A (Figura 15), observa-se diferenças da atividade do EFPP na divisão bacteriana e na viabilidade celular. Ocorre um aumento dos valores de absorbância na fase exponencial, ou seja, uma maior formação de biomassa até 7 h, mantendo-se na fase estacionária até 18 h maior do que o veículo, chegando a valores próximos em 24 h. Do tempo de 7 a 12 h ocorre uma diminuição na absorbância, mantendo a biomassa em valores próximos na fase estacionária, enquanto o veículo mantém crescimento em fase exponencial. Já na viabilidade celular, o EFPP mantém um baixo metabolismo até o período de 7 h, aumentando o número de células viáveis no período de 7 a 18 h e o declínio de viabilidade de 18 a 24 h. Durante todo o período os valores de absorbância de MTT foram menores para o grupo EFPP do que o veículo, demonstrando a atividade antimicrobiana do extrato.



**Figura 15.** Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPF) sobre o crescimento planctônico do isolado *S. aureus* 16A. A avaliação do crescimento planctônico do isolado *S. aureus* 16A com o tratamento de EFPF (2000µg/mL) ou veículo (Controle - Etanol 10%, v/v) foi avaliada por meio da medida da absorbância a 600 nm e absorbância a 492 nm após indicação com o MTT.

**Tabela 3** – Avaliação da presença dos genes de virulência dos *S. aureus* (MRSA) pelo método de PCR.

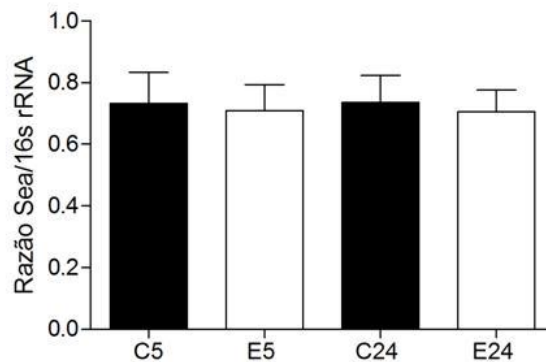
Gene	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	Isolado 16A	Isolado 112
<i>fnbA</i>	-	-	-
<i>fnbB</i>	-	-	-
<i>PVL</i>	-	+	+
<i>α-hla</i>	-	+	+
<i>sea</i>	+	-	+
<i>seb</i>	-	-	+
<i>sec</i>	-	-	-
<i>CfiA</i>	-	-	-
<i>Spa</i>	-	+	+
<i>icaA</i>	-	+	-
<i>icaB</i>	-	+	-
<i>icaC</i>	-	+	-
<i>icaD</i>	-	+	-
<i>icaR</i>	-	+	-

(+) Presença do gene de virulência. (-) Ausência do gene de virulência.

Dentre os isolados testados, para dar continuidade à análise da influência do EFPF sobre a expressão gênica de fatores de virulência na formação do biofilme de *S. aureus* MRSA, foram escolhidos os isolados 16A e 112, além da cepa ATCC43300 (Tabela 3). A cepa ATCC43300 somente apresentou o resultado positivo para a presença do gene *sea* que

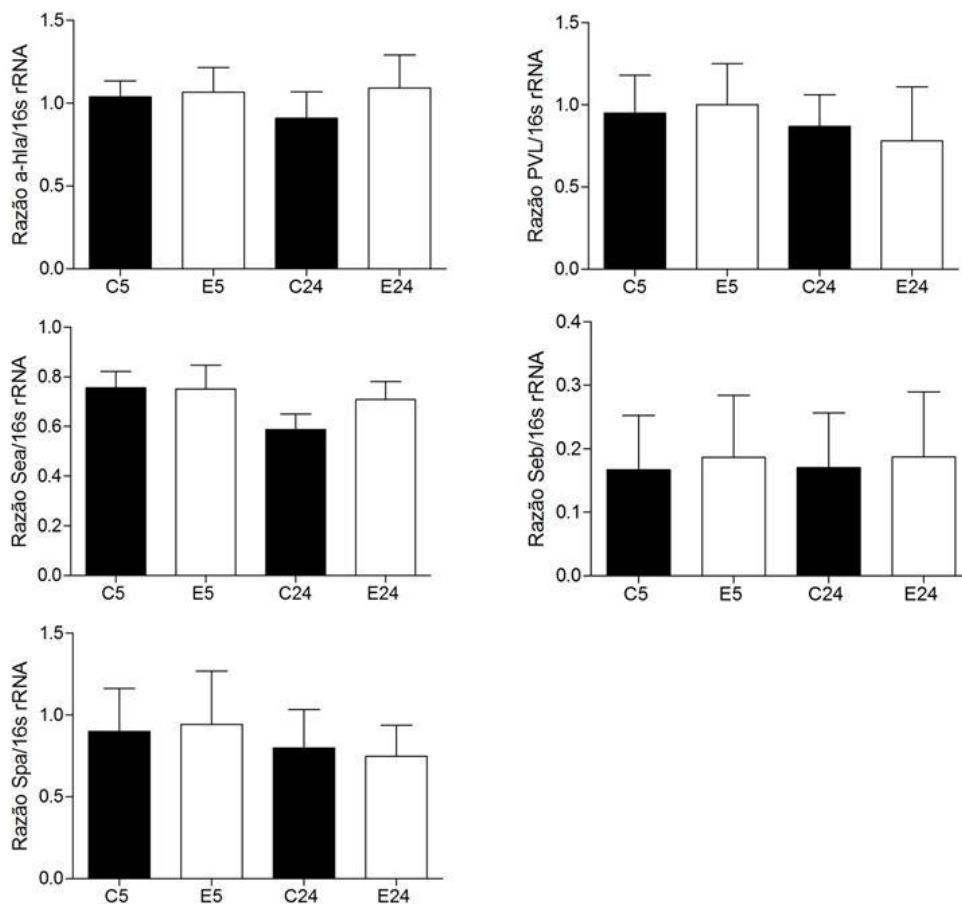
codifica a enterotoxina A, enquanto os isolados 16A e 112 apresentaram um maior número de genes de virulência, sendo escolhidos dentre os outros isolados. O isolado 16A apresenta os genes  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *spa*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR* e o isolado 112 os genes  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *sea*, *seb* e *spa*. A expressão gênica do mesmo crescimento foi avaliada no tempo de 5 h (fase exponencial inicial) e no tempo de 24 h (fase estacionária), relacionando C5/E5, C24/E24, C5/C24, E5/E24 e C5/E5/C24/E24.

No crescimento de *S. aureus* ATCC 43300 (Figura 16) não foi observado diferença na expressão do gene *sea* entre o grupo veículo e o tratado com EFPP, em dose subinibitória ( $MIC_{50} = 62,50 \mu\text{g/mL}$ ), no tempo de 5 e 24 h ( $p > 0,05$ ). A expressão do gene *sea* manteve-se em valores muito próximos comparando os resultados encontrados no tempo de 5 h com 24 h ( $p > 0,05$ ).



**Figura 16.** Influência do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPP) sobre a expressão do gene *sea* no crescimento de 24 h de *S. aureus* ATCC 43300. (C) Crescimento tratado com veículo (etanol 10%, v/v). (E) Crescimento tratado com EFPP (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ). (5) Tempo de 5 h e (24) Tempo de 24 h. Os resultados são apresentados como razão da densitometria das bandas do PCR na razão *sea* por 16s rRNA em unidades arbitrárias ( $n = 3$ ). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparação dos resultados de C5/E5/C24/E24, e para comparação entre C5/E5, C24/E24, C5/C24, E5/E24 foi utilizado teste t seguido de Mann-Whitney. Letra igual no topo de cada barra indica que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

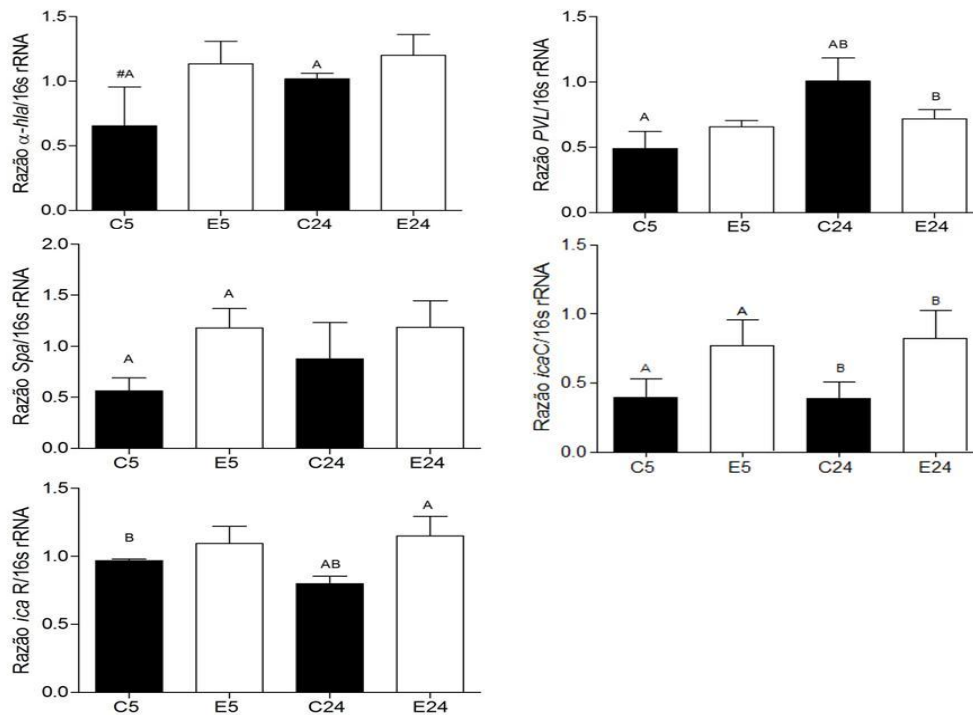
No crescimento do isolado 112 (Figura 17) não foi observado alteração na expressão dos genes  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *sea*, *seb* e *spa* entre o grupo veículo e o tratado com EFMF, em dose subinibitória ( $MIC_{50} = 125 \mu\text{g/mL}$ ), no tempo de 5 e 24 h ( $p > 0,05$ ). A expressão do gene *sea* manteve-se em valores muito próximos comparando os resultados encontrados no tempo de 5 h com 24 h ( $p > 0,05$ ).



**Figura 17.** Influência do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPF) sobre a expressão dos genes  $\alpha$ -hla, PVL, sea, seb e spa no crescimento de 24 h do isolado de *S. aureus* 112. (C) Crescimento tratado com veículo (etanol 10%, v/v). (E) Crescimento tratado com EFPF (125  $\mu$ g/mL). (5) Tempo de 5 h e (24) Tempo de 24 h. Os resultados são apresentados como razão da densitometria das bandas do PCR na razão  $\alpha$ -hla, PVL, sea, seb e spa por 16s rRNA em unidades arbitrárias (n = 3). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparação dos resultados de C5/E5/C24/E24, e para comparação entre C5/E5, C24/E24, C5/C24, E5/E24 foi utilizado teste t seguido de Mann-Whitney. Letra igual no topo de cada barra indica que houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

No biofilme do isolado 16A (Figura 18) tratado com EFPF na concentração subinibitória de ( $MIC_{50} = 2000 \mu$ g/mL), foi avaliado a expressão gênica de  $\alpha$ -hla, PVL, spa, icaC e icaR. Para o gene  $\alpha$ -hla, os valores de densitometria do grupo EFPF foram maiores que o grupo veículo, em ambos os tempos, mas não suficiente para apresentar diferença estatística ( $p > 0,05$ ). A expressão do gene  $\alpha$ -hla do grupo veículo aumentou do tempo de 5 a 24 h ( $p < 0,05$ ), sendo que a expressão gênica do grupo tratado com EFPF ainda foi maior que o veículo em ambos os tempos ( $p < 0,05$ ).





**Figura 18.** Influência do extrato etanólico das folhas de *Phanera flexuosa* (EFPF) sobre a expressão do gene  $\alpha$ -hla, PVL e spa no crescimento de 24 h do isolado de *S. aureus* 16A. (C) Crescimento tratado com veículo (etanol 10%, v/v). (E) Crescimento tratado com EFPF (2000  $\mu$ g/mL). (5) Tempo de 5 h e (24) Tempo de 24 h. Os resultados são apresentados como razão da densitometria das bandas do PCR na razão  $\alpha$ -hla, PVL, e spa por 16s rRNA em unidades arbitrárias (n = 3). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparação dos resultados de C5/E5/C24/E24, e para comparação entre C5/E5, C24/E24, C5/C24, E5/E24 foi utilizado teste t seguido de Mann-Whitney. Letra igual no topo de cada barra indica que houve diferença estatística (p < 0,05). # Símbolo no topo da barra indica que houve diferença estatística para os demais grupos (p < 0,05)

No grupo veículo, a expressão do PVL foi aumentando ao longo do tempo, tendo o valor de razão da densitometria em 24 h maior do que inicialmente em 5 h (p < 0,05). No tempo de 24 h, o EFPF conseguiu diminuir a expressão gênica de PVL de forma eficaz (p < 0,05). Para o gene spa, a densitometria da expressão dos biofilmes tratados com EFPF foram maiores que os tratados com o veículo, no tempo de 5 h (p < 0,05), mas no tempo de 24 h não foi suficiente para haver diferença estatística (p > 0,05). A expressão gênica do grupo tratado não diferiu entre o tempo de 5 e 24 h (p > 0,05).

Quanto ao gene icaC, os grupos tratados com EFPF apresentaram maior expressão gênica em relação aos grupos veículo nos tempos de 5 e 24h (p < 0,05). Não houve diferença de expressão nos grupos veículos entre os tempos 5 e 24 h (p > 0,05). Quanto ao gene icaR, houve uma redução da expressão no tempo 24 h do grupo veículo (p < 0,05) e não houve diferença entre a expressão do grupo tratado com EFPF entre os dois tempos 5 e 24h (p > 0,05). No tempo de 24h, o EFPF estimulou a expressão do gene icaR (p < 0,05).

## 6 DISCUSSÃO

De modo geral, a biota Caatinga tem sido descrita na literatura como pobre, abrigando poucas espécies endêmicas e, portanto, de baixo valor para fins de conservação (TABARELLI; VICENTE, 2003). Essa descrição de pobre diversidade deve-se ao fato ainda se conhece muito pouco sobre esse bioma conforme Tabarelli e Silva (2002). Além disso, encontramos um número grande de espécies vegetais com propriedades medicinais cujos valores farmacêuticos são conhecidos e importantes para as populações locais. As plantas também podem contribuir na descoberta de novos antibióticos, pois é possível que produtos naturais antimicrobianos possam ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de microrganismos patogênicos às plantas. As plantas medicinais podem representar uma nova alternativa para o combate aos microrganismos, em razão do grande aumento da resistência a múltiplas drogas dos microrganismos patogênicos, em razão do uso indiscriminado de antimicrobianos, acarretando assim, a busca de novas alternativas terapêuticas (SAMU; GOPALAKRISHNAKONE, 2008). Gibbons (2004) cita vários exemplos de metabólitos isolados de plantas com atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus* sp.

O *S. aureus* é um importante patógeno humano responsável por uma grande diversidade de infecções agudas ou crônicas que variam de infecções benignas cutâneas locais a uma osteomielite grave ou endocardite e sepse com risco de vida (BEAUME *et al.*, 2011). Desde o surgimento de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) em 1961 e sua disseminação em todo o mundo na década de 90, esta bactéria tem demonstrado uma capacidade especial para sobreviver e se adaptar às drásticas mudanças ambientais (BOYCE, 1992). Sua plasticidade genética tem facilitado o surgimento de muitas cepas virulentas e resistentes aos medicamentos, portanto, constituem um grande desafio e em constante evolução clínica (APPELBAUM, 2006; ARCHER, 1998; BORG *et al.*, 2005; HIRAMATSU *et al.*, 2002). Além disso, o *S. aureus* produz uma infinidade de fatores de virulência coordenados de forma temporal, principalmente em resposta às alterações ambientais (NOVICK; GEISINGER, 2008; SOMERVILLE; PROCTOR, 2009), uma regulação precisa da expressão genética que contribui para o seu bem sucedido comportamento.

Os resultados obtidos com o extrato etanólico da folha de *Phanera flexuosa* (Moric.) L. P. Queiroz (EFPF) sobre os isolados de MRSA permitem inferir algumas considerações relevantes. O EFPF demonstrou atividade antimicrobiana contra todos isolados clínicos e a cepa de coleção, variando as concentrações de inibição, exibindo diferentes perfis de resistência dessas cepas. A cepa de coleção apresentou a menor resistência, assim como outras

cepas clínicas (27A, 27B, 28, 29, 33A, 43.1, 47.1, 52, 76, 85.1, 85.2, 92, 113) que tiveram inibição de crescimento a baixa concentração de 125 µg/mL. Já o isolado 16A apresentou o maior perfil de resistência com CIM de 4000 µg/mL. De acordo com Tanaka *et al.* (2005) e Holetz *et al.* (2002) a atividade antimicrobiana pode ser classificada de acordo com a CIM em: Inativa (CIM > 1000 µg/mL); atividade fraca (500 < CIM < 1000 µg/mL); atividade moderada (100 < CIM < 500 µg/mL) e ativa boa (CIM < 100 µg/mL). Assim, o EFPPF apresentou atividade moderada contra a cepa ATCC 43300 e para os isolados 12D, 27A, 27B, 28, 29, 33A, 43.1, 47.1, 52, 66, 76, 85.1, 85.2, 92, 112 e 113. Para os isolados 17A, 39, 41, 42, 59, 61.2, 62, 67, 74, 91, 101, 105, 108, 116, o EFPPF apresentou atividade fraca, e para o isolado 16A poderia ser considerado inativo.

O EFPPF pode ser considerado como um extrato promissor para o isolamento de compostos antimicrobianos, principalmente por que os seus valores de CIM são próximos dos encontrados com outros extratos brutos testados com isolados MRSA. Machado *et al.* (2003) avaliou o potencial da atividade antimicrobiana de quatorze extratos de plantas medicinais tradicionais brasileiras contra *S. aureus* MRSA, sendo que *Punica granatum* e *Tabebuia avellanedae* apresentaram CIM de 125 e 250 µg/mL, respectivamente. De Lima *et al.* (2006) testou 49 extratos de plantas medicinais brasileiras, sendo que quatorze extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* MRSA (RN4220), incluindo o extrato etanólico de rizoma de *Jatropha elliptica*, de cascas de *Schinus terebinthifolius* e *Erythrina mulungu*, cascas e folhas de *Caesalpinia pyramidalis* e *Serjania lethalis*, e de casca e folhas de *Lafoensia pacari*. Extratos aquosos e etanólicos de *Mentha longifolia*, *Melissa officinalis* e *Rosa damascena* foram efetivos contra MRSA, sendo que os valores de CIM dos extratos etanólicos de *M. longifolia* e *M. officinalis* de 3,125-12,50 mg/mL e 12,50-25,00 mg/mL, respectivamente. O extrato etanólico com a maior atividade antimicrobiana foi o de *R. damascena* (CIM 0,395-0,780 mg/mL e CBM 1,563-3,125 mg/mL) (ABU-SHANAB *et al.*, 2006).

Para promover a morte celular em quatro cepas, foram necessárias maiores concentrações, de 4 a 32 vezes a CIM, sendo que para a maioria dos isolados e para cepa de coleção, até a concentração máxima testada de 4000 µg/mL não foi possível promover a morte celular. Também é importante avaliar a natureza do efeito antimicrobiano que o EFPPF apresentou sobre o *S. aureus* MRSA, utilizando se da razão CBM/CIM. Quando a razão CBM/CIM de um agente patogênico é entre 1:1 a 2:1, a substância química é considerada como bactericida contra o patógeno. Por outro lado, se a proporção for maior ou igual que 2:1, o modo de ação antimicrobiano mais provável é que seja bacteriostático (CLSI, 2009). Deste

modo, o EFPP tem característica de um antimicrobiano bacteriostático, já que para as cepas 12D, 29, 47.1 e 92 a relação CBM/CIM foi maior que 2:1.

A partir dos dados obtidos dos testes antimicrobianos iniciais, foram selecionados 4 isolados para aprofundar o estudo da atividade antimicrobiana de EFPP, de acordo com o interesse no estudo dos fatores de virulência e formação de biofilme. Os isolados clínicos foram obtidos dos seguintes ambientes: 16A - balança, 29 - Painele de controle do aparelho respirador, 92 - maçaneta dos leitos e 112 - telefone (CAMPOS *et al.*, 2012). Os quatro isolados são coagulase e catalase positivos, possuem o gene *mecA* e somente o isolado 112 o *femB*.

Quanto à formação de biofilme, calculado a partir da densidade ótica (D.O.) de formação do biofilme do isolado dividida pela (D. O.) do *S. pyogenes*. As amostras foram classificadas segundo Cassat, Lee e Smeltzer (2007) em: fortemente formadora de biofilme (apresentarem absorvância maior que 1) formadora de biofilme (absorvância variando de 0,1 a 1) e não formadora de biofilme (menor que 0,1) e foram avaliadas em relação aos controles negativo (apenas meio) e positivo (meio adicionado de inóculo) no tempo de 24h . O isolado 112 é fraco produtor de biofilme, e os demais, 16A, 29 e 92 são altamente formadores de biofilmes. Quanto aos fatores de virulência, a cepa ATCC43300 somente apresentou o gene *sea* que codifica a enterotoxina A, enquanto os isolados 16A e 112 apresentaram um maior número de genes de virulência, sendo escolhidos dentre os outros isolados. O isolado 16A apresenta os genes  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *spa*, *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*, *icaR* e o isolado 112 os genes  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *sea*, *seb* e *spa*.

Após avaliar a atividade antimicrobiana do EFPP sobre as células planctônicas de *S. aureus*, foi avaliado o seu potencial antimicrobiano no modelo de inibição de formação de biofilme, com diferentes tempos de crescimento (3, 5, 7 e 24 horas). O biofilme é uma microbiota derivada de comunidade sésil, caracterizado por células que estão irreversivelmente ligados a um substrato ou à interface ou uma à outra, estão incorporados em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que eles têm produzido, e exibem um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes. Os microrganismos presentes dentro da matriz do biofilme, quando fragmentados, se desprendem e circulam nos fluidos corporais com todas as características de resistência da comunidade do biofilme (DOLAN; CORTESTON, 2002). A síntese de polissacarídeo intercelular adesina (PIA) e a sua estrutura molecular permitem a aderência das bactérias as superfícies polares e hidrofóbicas; e grupos amino formados após desacetilação parcial conferem à molécula um

caráter catiônico, agindo como uma cola intercelular no processo de formação de biofilmes (VUONG *et al.* 2004).

É de extrema importância o descobrimento de novos antimicrobianos que hajam de forma eficiente sobre células planctônicas e sobre a formação do biofilme, pois impedindo o estabelecimento dessas bactérias livres em superfícies, impede-se a formação dos biofilmes, prevenindo o surgimento de infecções associadas a eles. A aderência é o passo inicial que leva à colonização ou infecção, tanto nos tecidos do hospedeiro (ex. pele) quanto na superfície de corpos estranhos (ex. catéteres intravasculares). O *S. aureus* e *S. epidermidis* são frequentemente associados a infecções de pele e sistêmicas (respiratória, urinária, endocardite e sepse), e à doenças relacionadas a colonização de dispositivos implantados como prótese articular, válvula cardíaca, marca passo e catéter.

O extrato de EFPPF, em diferentes concentrações, foi capaz de diminuir a biomassa total formada nos biofilmes corados com cristal de violeta e a viabilidade celular avaliada pelo MTT, dependendo dos tempos de crescimento deste biofilme. Para algumas cepas e concentrações testadas, o perfil de inibição de formação da biomassa total não foi acompanhado na mesma proporção de inibição das células viáveis, isto provavelmente porque o EFPPF ao reduzir o número de células vivas influencia a formação da biomassa, mas ainda há a produção de polissacarídeos que pode estar sendo diminuída pelo EFPPF, e não foi avaliada diretamente. O PIA auxilia a adesão intercelular, facilitando a agregação, formação e estabelecimento do biofilme. A avaliação da viabilidade do biofilme pode ser feita por meio do MTT, pois, uma vez que o produto formado pelas células vivas, o formazan é solúvel em DMSO, podendo ser facilmente medido no sobrenadante, facilitando o estudo de biofilmes intactos, bem como, a análise da susceptibilidade do biofilme a antimicrobianos sem ruptura da estrutura do biofilme.

Houve maior porcentagem de inibição da formação do biofilme nos tempos de 7 e 24 h, do que em relação a 3 e 5 h, indicando a necessidade de um tempo maior para a ação deste extrato. Para inibir os menores tempos de crescimento do biofilme, muitas vezes foi necessário menores concentrações, e para os biofilmes de maior tempo de formação foram necessárias concentrações maiores, acima de 1250 µg/mL. A porcentagem de redução da biomassa total dos biofilmes ficou em média entre 40 e 50%, sendo que a concentração de 5000 µg/mL apresentou a melhor inibição de formação para a maioria das cepas e tempos de formação. Quanto à viabilidade celular, foi observada uma diminuição em torno de 40 a 60 % dependendo da concentração testada e dos tempos de crescimento do biofilme, sendo geralmente necessárias concentrações mais elevadas (1250 a 20000 µg/mL) para inibir a

viabilidade de biofilmes de 7 e 24 h. O isolado 16A novamente mostrou um perfil de menor sensibilidade à ação antimicrobiana do EFPP, demonstrado pela não inibição da formação do biofilme no tempo de 3 h em concentrações menores que 625 µg/mL, e por baixas porcentagens de inibição nos tempos de 5 e 7 h, ocorrendo redução da biomassa total somente no tempo de 24h.

Essa maior atividade antimicrobiana do EFPP nos biofilmes de 24 h pode ocorrer devido à dificuldade do EFPP em penetrar no biofilme, ao tempo para ocorrer à difusão ou devido ao próprio metabolismo e mecanismo de ação do EFPP. Moléculas antimicrobianas devem difundir-se através da matriz do biofilme, a fim de inativar as células encapsuladas. As substâncias extracelulares poliméricas que constituem esta matriz apresentam uma barreira de difusão para estas moléculas, influenciando a taxa de transporte da molécula para o interior do biofilme ou levando a reação do material antimicrobiano com o material da matriz. Suci *et al.* (1994) demonstraram uma penetração retardada de ciprofloxacina em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, o que normalmente requer 40s para uma superfície estéril, é necessário 21 min. para uma superfície contendo biofilme. Outro mecanismo proposto para a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos é de que as células associadas nos biofilmes crescem de forma mais lenta do que as células planctônicas, e como resultado, a captação de agentes antimicrobianos também ocorre lentamente por estas bactérias, lentificando a ação dos mesmos.

Para algumas cepas, como ATCC, 29 e 92, foi necessária a concentração de 5000 µg/mL, ou seja, valor 40 x maior que a CIM (125 µg/mL) para inibir a formação do biofilme de 24 h, entretanto, esta concentração para o isolado 16A está próxima da CIM (4000 µg/mL), apenas 1,25 vezes maior que a CIM. A natureza da estrutura e os atributos fisiológicos dos organismos presentes no biofilme conferem maior resistência aos agentes antimicrobianos do que na forma planctônica. Ceri *et al.*(1999) demonstrou que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das bactérias incorporadas em biofilmes eram 10 a 1.000 vezes mais elevadas do que aquelas em estado planctônico. Os mecanismos responsáveis pela resistência podem ser uma ou mais das seguintes características: (i) A penetração lentificada do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme, (ii) a taxa de crescimento alterada de organismos dos biofilmes, e (iii) outras alterações fisiológicas, devido ao modo de crescimento do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002). Além disso, o biofilme quando fragmentado, os microrganismos presentes dentro da matriz do biofilme se desprendem e circulam nos fluidos corporais, com todas as características de resistência da comunidade do biofilme (DOLAN; CORTESTON, 2002), podendo causar infecções ou gerar outros

biofilmes em outros locais. Por isto, impedir a adesão dessas bactérias e o crescimento do biofilme também são estratégias importantes na ação antimicrobiana de novos antibióticos, além da ação bactericida/bacteriostática.

Também foi avaliada a ação antimicrobiana do EFPP sobre a cepa ATCC43300 e os isolados clínicos 16A e 112 em concentrações sub-CIM, ou seja, em concentrações de 50% a CIM, em uma curva de crescimento de 24h, com meio suplementado de glicose a 1% e com agitação constante para evitar formação de biofilme. Para isto foi utilizado os dados de absorbância da suspensão e metabolismo do MTT pelas células viáveis. Pode-se inferir que o EFPP diminui as taxas de divisão celular do *S. aureus* ATCC 43300 na fase exponencial, a partir de 5h e diminui a viabilidade celular principalmente após o tempo de 7 h de tratamento, obtendo melhores resultados entre 18 e 24 h (fase final exponencial) para esta cepa. Os valores de absorbância do grupo tratado com EFPP não acompanharam a diminuição da viabilidade celular no período entre 7 e 24 h. Provavelmente essa diferença ocorreu porque na leitura da absorbância é avaliada a biomassa total, constituída de bactérias viáveis e não viáveis, fragmentos de bactérias mortas, material produzido e secretado pelas bactérias, além dos polissacarídeos produzidos. Mesmo com a diminuição das células viáveis a um valor mínimo entre 18 e 24 h, há o acúmulo das outras partículas produzidas e de células mortas, o que mantém a absorbância constante.

O mesmo ocorre para o isolado 112, que manteve valores de absorbância próximos entre 5 e 24 h, mas com declínio no número células viáveis no mesmo período. Também há uma diferença de atividade do EFPP na viabilidade celular desses dois microrganismos. A ação antimicrobiana de EFPP sobre *S. aureus* ATCC 43300 já se inicia durante a fase lag e exponencial (até 5 h) com a diminuição dos valores de absorbância da fase estacionária até 24 h, enquanto para o isolado 112, a diminuição da viabilidade celular se inicia mais tardiamente, na fase inicial da fase exponencial, ente 5 e 7 h, pois esta bactéria atinge a fase estacionária próxima a 12 h. Quanto ao isolado 16A, o EFPP diminui a viabilidade celular durante toda a curva de crescimento em relação ao veículo, com melhor ação no período até 7 h, tempo que envolve a fase lag e exponencial do isolado. Esta cepa está na fase estacionária entre 12 e 24 h. Para justificar a maior absorbância da suspensão no grupo tratado com o EFPP em relação ao veículo durante toda a curva, pode refletir uma reação de estresse da cepa, independente de energia, e podemos inferir que o extrato pode estimular fatores de virulência nessa concentração subinibitória, levando a uma maior produção de material pelas células para o meio, ou promove um aumento da taxa de divisão e de morte celular, ocorrendo um acúmulo de células mortas e fragmentos, levando ao aumento da absorbância.

Avaliando o efeito do EFPP nas três cepas testadas, observamos que o EFPP apresentou os melhores resultados de diminuição da viabilidade celular na fase final exponencial e início da fase estacionária, ou seja, entre os períodos de 7 a 24 h. Como a atividade metabólica demonstrada pelo MTT foi diminuída para as três cepas, pode-se sugerir que a atividade antimicrobiana do EFPP está relacionada à alteração do metabolismo celular, mesmo em concentrações subinibitórias. Os nossos resultados mostram que o *S. aureus* na fase estacionária é menos tolerante a EFPP em comparação com as bactérias em fase inicial exponencial. Ao entrar na fase estacionária de crescimento, a composição de proteínas da membrana da célula (CULLMANN; SCHLUNEGGER, 1992), a fluidez da membrana celular (XIONG *et al.*, 1993) e a carga superficial e hidrofobicidade (BECK *et al.*, 1988) de *S. aureus* mudam. Talvez a ação antimicrobiana do EFPP esteja relacionada à sua ação sobre um desses 3 fatores.

O processo de formação de biofilme foi dividido em duas fases distintas: aderência inicial e acúmulo de biofilme (MACK, 1999). Os mecanismos genéticos e bioquímicos de cada fase têm sido objetivo de investigação intensa nos últimos anos. Múltiplos fatores podem influenciar a fixação bacteriana, incluindo proteínas de superfície de bactérias, polissacarídeos, e interações físico-químicas (HEILMANN *et al.*, 1997; KLOSS, 1997; MCKENNEY *et al.*, 1998; NILSSON *et al.* 1998, TOJO *et al.* 1998; VEENSTRA *et al.*, 1996). A segunda fase é caracterizada pelo acúmulo bacteriano, o que requer a interação entre célula-célula.

Com o desenvolvimento do microscópio confocal de varredura a laser (CLSM) na década de 1980, forneceu aos pesquisadores a capacidade de examinar biofilmes “in situ”, permitindo avaliar a matriz do biofilme de forma inalterada e intacta. Dentro da atual concepção de biofilme, as imagens de microscopia confocal mostram biofilmes que apresentam uma estrutura com distribuição variável de células, agregados celulares na matriz polimérica extracelular, além de espaços vazios ou canais de água, que podem ou não ser contínuas com a fase líquida (COSTERTON; LEWANDOSKI, 1995). O biofilme funciona como um consórcio de células em cooperação biológica e eficiência metabólica especialmente quando maduros. Nessa fase as células situadas em regiões diferentes exibem distintos padrões de expressão gênica (KIRISITS; PARSEK, 2006).

Vivos, os biofilmes totalmente hidratados são compostos de células (15% do volume) e material da matriz (85% em volume), e as células estão localizadas na matriz formando as torres e cogumelos. Canais de água abertos estão intercalados entre as microcolônias que contêm as células sésseis (LAWRENCE *et al.*, 1991), e técnicas físicas



têm demonstrado que grande quantidade de água desse sistema entra nestes canais para produzir fluxo de convecção (DE BEER *et al.*, 1994).

Para avaliar os efeitos do tratamento de EFPP sobre a morfologia do biofilme de 24 h, foram obtidas imagens por meio de microscopia confocal. Para o biofilme do isolado 16A, quando tratado com a concentração de 5000 µg/mL (1,5 vezes a CIM), observa-se que há um aumento da massa total do biofilme, de matriz extracelular, e do número de células inviáveis em relação a viáveis do biofilme tratado com o veículo. Esta concentração foi a mesma que apresentou melhores resultados descritos anteriormente, com redução de 43% do biofilme corado com cristal de violeta e diminuição de 50% do número de células viáveis pelo teste com MTT. O EFPP apresentou maior atividade sobre a superfície do biofilme, mas conseguiu penetrar na matriz do biofilme, promovendo morte celular na base do biofilme, representada pela cor vermelha (células não viáveis) e menor cor verde (células viáveis) e amarela (células não viáveis e viáveis sobrepostas) em relação ao biofilme tratado com o veículo.

Já em uma concentração quatro vezes menor de EFPP, de 1250 µg/mL, as imagens mostram um rompimento do biofilme, com falhas na sua formação, com aumento dos espaços vazios e perda dos canais, com áreas de maior densidade do que outras, o que reflete em uma redução da massa total do biofilme. Há uma quantidade e distribuição semelhante de células viáveis e não viáveis, demonstrada pelo predomínio de coloração amarela na sobreposição e na projeção lateral. No teste de formação do biofilme, há uma inibição de 19% da biomassa total e aproximadamente redução de 58 % da viabilidade celular. Assim, a menor formação de biofilme pela menor concentração (1250 µg/mL) testada pode ser entendida pela menor viabilidade celular deste biofilme, uma ação bactericida/bacteriostática, mas a ação do EFPP não se resume somente a isto, mas também em parte devido a alterações na matriz extracelular e subsequente desfragmentação ou remoção do biofilme a partir da superfície. O mesmo pode ser justificado para o biofilme do isolado 92, na concentração testada de 625 µg/mL, observa-se que o EFPP foi capaz de diminuir a formação de massa do biofilme, com perda da estrutura de torres e cogumelos, e aumento dos espaços vazios.

Além disso, o fator que pode ter influenciado na maior formação de biofilme com a concentração de 5000 µg/mL, por ser uma maior concentração, pode ter promovido um maior estresse ambiental às células do biofilme, ativando vários fatores de virulência para manter a sua sobrevivência. Também pode ocorrer que as bactérias das camadas mais profundas do biofilme são expostas gradualmente a concentrações subinibitórias dos antibióticos antes da exposição a uma concentração maior, sendo que neste período de tempo pode ocorrer uma resposta de estresse, ou seja, no nível de transcrição ou na secreção de proteínas, como visto

na curva de crescimento do isolado 16A. Estudos sugerem que a organização multicelular de bactérias em biofilmes é um mecanismo crucial para suportar as condições desfavoráveis externas (SHAPIRO, 1998), como a presença de glicose, cloreto de sódio ou o próprio antimicrobiano. Para muitas bactérias formadoras de biofilme, a diferenciação de células planctônicas em sésseis, bactérias produtoras de exopolissacarídeos estão associadas com a ativação de redes reguladoras complexas em resposta a sinais de quorum-sensing e/ou fatores de estresse ambiental (COSTERTON *et al.*, 1995; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DAVIES *et al.*, 1998; SHAPIRO, 1998).

Estudos anteriores demonstraram que a utilização de muitos antibióticos em concentrações subinibitórias, que têm pouca ou nenhuma influência no crescimento celular, poderia afetar substancialmente a expressão de exotoxinas bacterianas. Para examinar o efeito da concentração subinibitória de EFPP sobre a produção de fatores de virulência bacteriana, inicialmente foi investigada a influência das concentrações de 50% CIM sobre um ensaio de curva de crescimento nos tempos de 5 e 24 h de *S. aureus*.

Os antibióticos são conhecidos por apresentar efeitos tanto sobre a estrutura da célula quanto na expressão de genes de virulência de estafilococos (GEMMEL, 1995; OHLSEN *et al.*, 1998). A patogenicidade de *S. aureus* é regulada pela secreção de numerosos fatores de virulência extracelulares, sendo interessante o estudo de uma estratégia alternativa de combate a esses microrganismos, determinada não só por atividade bactericida ou bacteriostática, mas também agindo sobre os fatores de virulência. Esta estratégia alternativa oferece oportunidades promissoras para diminuir patogenicidade e suas consequências sem colocar uma pressão de vida ou morte imediata sobre a bactéria alvo (CEGELSKI *et al.*, 2008).

O EFPP em concentrações subinibitórias não alterou a expressão gênica do gene *sea* na cepa ATCC 43300 em ambos os tempos em relação ao grupo veículo ou entre os tempos de 5 e 24 h. Também não foi alterada a expressão gênica de  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *sea*, *seb* e *spa* na concentração subinibitória (125  $\mu$ g/mL) do isolado 112 em relação ao grupo veículo ou entre os tempos testados. Já para o isolado 16A, o EFPP na concentração subinibitória (2000  $\mu$ g/mL) manteve a mesma expressão gênica de  $\alpha$ -*hla*, *PVL*, *spa*, *icaC* e *icaR* durante o crescimento do biofilme, mas houve alteração da expressão dos genes *PVL*, *spa*, *icaC* e *icaR* em relação ao grupo veículo.

O EFPP em concentração subinibitória aumentou a expressão de alguns genes em relação ao grupo veículo, sendo o *spa* no tempo de 5 h, o *icaR* no tempo de 24 h e o *icaC* no tempo de 5 e 24 h. Somente o gene *PVL* foi inibido no tempo de 24 h em relação ao grupo

veículo. Provavelmente os genes *PVL* e *spa* não tiveram suas expressões alteradas no isolado 112 devido a concentração testada de 125 µg/mL ter sido muito inferior (16 vezes) a concentração de 2000 µg/mL testada no isolado 16A.

O EFPPF, nas concentrações subinibitórias testadas, não apresentou alteração da expressão gênica de  $\alpha$ -hemolisina, nem das enterotoxinas A e B, em nenhuma das 3 cepas MRSA. Enterotoxinas, TSST-1, e  $\alpha$ -hemolisina estão entre as principais exotoxinas secretadas por *S. aureus*. Enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são um grupo sorológico grande de enterotoxinas estáveis ao calor (SEA a SEE e SEG a SEJ) (BALABAN; RASOOLY, 2000). Estas toxinas causam gastroenterite estafilocócica, intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico, e várias doenças alérgicas e autoimunes (BALABAN; RASOOLY, 2000; LE LOIR *et al.*, 2003; SMITH-PALMER *et al.*, 2004). Além disso, SE e TSST-1 também são conhecidas por serem toxinas superantígenos pirogênicos (PTSAGs), que estimulam a proliferação de linfócitos T e a liberação de citocinas derivadas de células T (DINGES *et al.*, 2000).  $\alpha$ -hemolisina é uma proteína formadora de poros solúvel que tem atividades hemolíticas, citolíticas, e dermonecroticas. Vários tipos de células humanas são afetados por  $\alpha$ -hemolisina, incluindo eritrócitos, linfócitos, monócitos, macrófagos e células epiteliais. Semelhante à maioria das proteínas secretadas por *S. aureus*, SE, TSST-1, e  $\alpha$ -hemolisina são produzidos principalmente durante a fase de pós-exponencial de crescimento e os seus níveis de expressão são regulados pela interação de uma rede de reguladores.

Resultados experimentais demonstraram que as concentrações subinibitórias de antibióticos podem diminuir a expressão de fatores de virulência por *S. aureus* e de outras espécies de bactérias (HACKER; OTT; HOF, 1993). Qiu *et al.* (2010) demonstrou por meio de análises de transcrição, expressão, e fenotipagem que as concentrações subinibitórias de eugenol, de forma dose-dependente, diminuiriam a produção de  $\alpha$ -hemolisina, TSST-1, SEA, SEB e em ambos *S. aureus* MSSA e MRSA. Somente o gene *PVL* teve uma diminuição de expressão gênica no isolado 16A com o tratamento em concentração subinibitória. Apesar do gene *PVL* (Leucocidina de Panton-Valentine) ser raramente encontrado em isolados de MRSA hospitalar, têm-se demonstrado que cepas de HA-MRSA portadoras do *SCCmec* tipo III podem expressar PVL, ainda que em taxas de ocorrência mais baixas que aquelas encontradas em cepas comunitárias (AKOGLU *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011), como o isolado 16A. À semelhança da  $\alpha$ -hla (alfa-hemolisina), a PVL pertence à família das  $\beta$ -PFTs ( $\beta$ -barrel pore-forming toxins), proteínas de estrutura responsáveis pela formação de poros nas membranas de células eucarióticas. Enquanto a  $\alpha$ -hla forma poros normalmente hexaméricos

ou heptaméricos, principalmente em hemácias, a PVL forma poros octaméricos, principalmente em leucócitos, sendo secretada em monômeros solúveis que se unem para formar um poro de alta condutância, levando ao desequilíbrio iônico na célula e consequente lise (MILES *et al.*, 2002). O fato de EFPPF inibir a expressão dessas leucocidinas é importante por que estas causam necrose tecidual e destruição de leucócitos, e a maioria das cepas de CA-MRSA portadoras desse gene está associada a infecções de pele, principalmente furúnculos e abscessos, mas pode também causar infecção tecidual necrotizante, pneumonia fulminante e sepse grave.

O EFPPF em concentração subinibitória aumentou a expressão dos genes em relação ao grupo veículo, sendo o *spa* no tempo de 5 h, o *icaR* no tempo de 24 h e o *icaC* no tempo de 5 e 24 h. Também tem sido demonstrado que concentrações subinibitórias de antibióticos podem influenciar a expressão de importantes fatores de virulência bacteriano, tais como as adesinas ou toxinas (BISOGNANO *et al.*, 1997; HACKER; OTT; HOF, 1993; OHLSEN *et al.* 1998; WU *et al.*, 1995). *S. aureus* expressa proteínas de superfície específicas chamadas adesinas (FOSTER; MCDEVITT, 1994a; FOSTER; MCDEVITT, 1994b, HÖÖK *et al.*, 1989; PATTI *et al.*, 1994) que permitem que o organismo interaja especificamente com plasma ou proteínas da matriz extracelular presentes em tecidos normais ou adsorvido em dispositivos biomédicos. Bisognano *et al.*(1997) demonstrou que a expressão de adesinas de fibronectina por alguns mutantes de *S. aureus* altamente resistentes à quinolona pode ser aumentada através do crescimento na presença de níveis subinibitórios de ciprofloxacina. A capacidade de ligação da Spa com diversas estruturas contribui para a aderência de *S. aureus* às variadas superfícies levando a sua persistência nas infecções e a complicações dos quadros como endocardite (NGUYEN; GHEBREHIWET; PEERSCHKE, 2000), formação de biofilmes em cateteres (HENRY-STANLEY *et al.*, 2011) até mesmo em ausência de PIA (MERINO *et al.*, 2009). O aumento da expressão da proteína A no tempo de 5 h poderia ser um dos fatores que levou a um aumento da aderência inicial deste isolado 16A a superfície e como consequência, o acúmulo do biofilme e maior biomassa total formada. Pode ainda desencadear a cascata pró-inflamatória nas vias aéreas por ativação do receptor 1 de TNF- $\alpha$  (DAVID; DAUM, 2010).

O gene *icaC* também teve a sua expressão gênica aumentada pela concentração subinibitória no isolado 16A. Rachid *et al.*(2000) analisaram a influência das concentrações subinibitórias de antibióticos sobre a formação de biofilmes de *S. epidermidis*, e os resultados indicaram que foi aumentada a expressão do operon *ica* pela mistura de estreptograminas quinupristina-dalfopristina e pela tetraciclina, utilizadas separadamente no tratamento das

células em crescimento na formação de biofilme. Sob estas condições subinibitórias, a transcrição do operon *ica* foi induzida e, conseqüentemente, a formação de biofilmes. A expressão do *ica* não foi induzida quando as concentrações dos antibióticos foram aumentadas para níveis mais elevados ( $> \frac{1}{2}$  CIM), sendo o crescimento bacteriano inibido. Todos estes antibióticos são inibidores da síntese de proteína que atuam sobre o ribossomo bacteriano. Da mesma forma, o aumento da expressão do gene *icaA* levou a um aumento da massa total do biofilme formado e também da formação de matriz polissacarídica.

Também houve a inibição da expressão do 16s rRNA do isolado 16A tratado com a concentração subinibitória. A média da redução da expressão gênica em relação ao grupo veículo foi de 92,45 %. Assim como a tetraciclina, o EFPPF na dose testada pode agir como um bacteriostático, ligando-se aos componentes maiores das subunidades ribossomais bacterianas, o componente 16S (subunidade 30S) (SUTCLIFFE, 2005), ou interferindo com a síntese de proteínas ribossomais, ou RNA necessário para expressão deste ribossomo.

Paromomicina e neomicina são antibióticos aminoglicosídicos, que são eficazes contra um número de aeróbicos e anaeróbicos facultativos bacilos gram-positivos e estafilococos (KOTRA; HADDAD; MOBASHERY, 2000; MINGEOT-LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999). Ambos os antibióticos se ligam especificamente à subunidade 30S ribossomal (VÁSQUEZ, 1979). Eles interagem com o 16S rRNA do ribossomo, dentro de um circuito interno do local de decodificação (MOAZED; NOLLER, 1987; RECHT *et al.*, 1999; SCHROEDER; WALDSICH; WANK, 2000). Ligação a essa região resulta em uma alteração conformacional das bases conservadas dentro do loop do site-A, o que facilita a ligação de alta afinidade entre o rRNA do loop interno e os anéis de I e II do antibiótico aminoglicosídico (FOURMY *et al.*, 1996; FOURMY; YOSHIZAWA; PUGLISI, 1998; OGLE *et al.*, 2001). O antibiótico fortemente ligado contribui para a má leitura do códon e má tradução do mRNA. Além disso, Mehta e Champney (2002) demonstraram que ambos os antibióticos inibiram a taxa de crescimento, o número de células viáveis, e taxa de síntese de proteínas com concentrações subinibitórias de aproximadamente 50 %. Cada droga também mostrou uma inibição da formação da subunidade 30S dependente da concentração. O efeito inibitório sobre a formação da subunidade 30S de foi aproximadamente equivalente ao efeito inibitório destes antibióticos sobre a tradução. A inibição da montagem das partículas de 50S por inibidores translacionais do 50S não afeta a síntese de partícula 30S (CHAMPNEY, 2001). Já o oposto pode não ser verdade, pois em concentrações mais elevadas de ambos os antibióticos, também foi observada uma inibição da formação de partículas 50S. Este efeito pode ser devido à inibição da síntese de 50S. A

transcrição de 16S rRNA precede a transcrição de 23S e 5S rRNAs e concomitante a montagem 30S precede a formação de partículas 50S (NIERHAUS, 1982; NOMURA, 1973). Inibição da síntese de 30S poderia ter um efeito negativo não específico retardando a síntese de 50S, sem um efeito direto do antibiótico. Ambos os aminoglicosídeos se ligam com especificidade apenas para a partícula 30S e estimulam o erro de leitura sobre esta subunidade (KOTRA; HADDAD, MOBASHERY, 2000; VÁSQUEZ, 1979).

Muitos trabalhos têm utilizado transcriptoma e as análises de proteoma em tentativas de relacionar o modo de ação dos antibióticos a todas as respostas das células ou a função celular do alvo do inibidor (DAVIES *et al.*, 2006). São muito diversas as alterações em perfis de expressão induzidas por diferentes antibióticos e essas mudanças podem ser detectadas em uma ampla variedade de genes, às vezes, não ligados a função alvo. Tais resultados podem dificultar a identificação do efeito primário do antibiótico, pois os alvos macromoleculares dos antibióticos possuem interações funcionais com muitos outros processos celulares.

Atualmente tem-se demonstrado que os antibióticos exibem contrastantes propriedades quando testados em baixas e em altas concentrações, o que é chamado de fenômeno de Hormese. Hormese tem sido um conceito controverso que foi inicialmente aplicado para descrever os efeitos de doses baixas de radiação. No entanto, o termo agora é usado para descrever geralmente respostas biológicas a sinais ambientais ou estresses que são caracterizados por relações doses-respostas bifásicas, exibindo estimulação à baixa dose e inibição em alta dose (CALABRESE; BALDWIN, 2002).

As respostas a diferentes tipos de inibidores podem ocorrer através de interações específicas entre droga/alvo ou efeitos sobre as respostas genéricas ao estresse. Isso sugere que os efeitos das concentrações subinibitórias de antibióticos pode ter duas origens distintas: uma associada com as funções essenciais do genoma e outro que envolve funções acessórias, tais como a virulência, esporulação, e processos de desenvolvimento que apresentam papéis essenciais na sobrevivência ambiental. Parece que a resposta do núcleo genético é mediada através da utilização de alvos macromoleculares universais (ex.: ribossomo e a RNA polimerase) como os receptores de moléculas pequenas, ao passo que as respostas dos genes acessórios são mediadas através determinantes específicos da espécie, muitas vezes codificadas por ilhas genômicas, com ou sem o envolvimento das funções do núcleo genético. Assim, as respostas de transcrição variam de acordo com gênero bacteriano devido às diferenças nas redes reguladoras (BALÁZSI *et al.*, 2005). Baixas concentrações de produtos vegetais, como o ácido salicílico e quercetina, induzem alterações de transcrição em bactérias e retardam o crescimento em concentrações mais elevadas (YIM *et al.*, 2006).

As moléculas de antibióticos não parecem agir através da ligação aos receptores de proteínas específicas e afetando a atividade do promotor ao nível do DNA. No entanto, eles agem em receptores específicos (alvos dos antibióticos), que incluem macromoléculas intracelulares como os ribossomos (VANBOGELEN; NEIDHARDT, 1990). Muitos estudos têm demonstrado que as concentrações subinibitórias de antibióticos são potentes moduladores de transcrição em células bacterianas (GOH *et al.*, 2002;. NG *et al.*, 2003;. SHAW *et al.*, 2003;. TSUI *et al.*, 2004;. LIN *et al.*, 2005). Mesmo quando um composto tem como alvo uma macromolécula funcionalmente específica, como os ribossomos, a modulação por qualquer classe de composto não é única para qualquer um dos processos metabólicos.

Os mecanismos bioquímicos detalhados que fornecem a base da transcrição modulada por antibiótico ainda não são totalmente conhecidos. As respostas de transcrição são peculiares para a classe geral funcional do antibiótico. A resposta dos promotores bacterianos às concentrações subinibitórias de antibióticos é uma ferramenta potencialmente poderosa para a descoberta de novos antibióticos. Talvez o mais importante resultado destes estudos em curso é a demonstração de que todas as moléculas bioativas pequenas exibem hormese, isto é, as diferentes respostas fenotípicas são dependentes da concentração de molécula bioativas (CALABRESE, 2004). A principal atividade da maioria dos inibidores da função bacteriana é modular a transcrição em concentrações subinibitórias.

Por último, os ensaios de liberação de citocinas foram realizados para investigar a influência do EFPP sobre a produção de citocinas pelos macrófagos murinos J774, estimulados com o sobrenadante das culturas de *S. aureus* tratadas com EFPP ou veículo. Fragmentos da parede celular de bactérias Gram positivas, bem como os peptidoglicanos e o ácido lipoteicóico da parede celular induzem a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 a partir da cultura de macrófagos-monócitos (BHAKDI *et al.*, 1991; HEUMANN *et al.*, 1994; KELLER *et al.*, 1992; MATTSSON *et al.*, 1993, TIMMERMAN *et al.*, 1993). O EFPP foi capaz de modular a estimulação dos macrófagos na produção de citocinas, dependendo das cepas e os isolados e de qual citocina avaliada.

Para a IL-1 e IL-6, observa-se uma tendência de aumento da liberação dessas interleucinas, ou seja, o extrato pode estar estimulando a bactéria a produzir uma quantidade maior de exotoxinas ou rompendo as membranas das mesmas, com a liberação de componentes da parede, como o ácido lipotecóico, o que levaria a maior estimulação dos macrófagos a produzir e liberar no meio dessas interleucinas. Quanto a IL-10, uma citocina anti-inflamatória que inibe a ativação de macrófagos por meio de mecanismos autócrinos, os

grupos tratados com EFPP não alteraram os níveis liberados da citocina pelos macrófagos após estimulação, não interferindo nesta via.

O EFPP diminui os níveis de TNF- $\alpha$  na maioria das cepas tratadas em relação ao controle, provavelmente pela diminuição de fragmentos da parede celular que estimulariam a resposta dos macrófagos ou por uma ação anti-inflamatória direta de compostos do EFPP que passariam na filtração e atuariam diretamente na inibição desta via nos macrófagos. O peptídeoglicano (PEG) e o ácido lipoteicoico (LTA) são os principais componentes da parede bacteriana das bactérias gram-positivas e são descritos modulando a atividade de células imunes (SCHWANDNER *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2003). O LTA é descrito como o principal responsável pela produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos expostos a bactérias gram-positivas (SEO *et al.*, 2008), além de estimular a produção de ROS em monócitos humanos (LEVY *et al.*, 1990) e células dendríticas de roedores (CHOI *et al.*, 2008). O TNF- $\alpha$  possui grande importância durante a fase aguda da resposta inflamatória à agentes patogênicos, como o *S. aureus*, e estimula alterações fisiológicas que contribuem para eliminar agentes infecciosos, controle do dano tecidual e ativação de processos de reparo. No entanto, níveis elevados de TNF- $\alpha$  estão associados a efeitos deletérios de infecções sistêmicas graves como a sepse.

As diversas respostas obtidas com o EFPP, em concentrações inibitórias e subinibitórias, foram influenciadas por diferentes mecanismos de ação e diferentes alvos bacterianos testados, e também avaliados em uma grande variedade de ensaios “in vitro”. Assim, os resultados apresentados indicam que, o EFPP, como qualquer outro antibiótico, deve ser utilizado em quantidades adequadas, a fim de evitar baixas concentrações subinibitórias, que podem influenciar o padrão de expressão do gene de bactérias de uma maneira desfavorável (RACHID *et al.*, 2000). Atualmente, a inibição de expressão de fatores de virulência encontra aplicabilidade ampla nos mais diversos segmentos, que vão da utilização como agente de prevenção de contaminação em condições de preparo de alimentos, terapêutica adjuvante no tratamento de infecções diversas (tópicas e em tecidos moles, respiratória, urinária, sepse, síndrome do choque, enteroinfecções); e utilização sinérgica com antibióticos, resgatando antimicrobianos para os quais o uso clínico estava comprometido devido ao desenvolvimento da resistência microbiana. Além disso, mais estudos devem ser realizados para que seja elucidado o mecanismo de ação desse promissor antimicrobiano, assim como, deve-se identificar o(s) composto(s) bioativo(s).



## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de atividade antimicrobiana de *Phanera flexuosa* (Morici.) L. P. Queiroz, conhecida popularmente como escada de macaco, contra *S. aureus multirresistentes*, permitem considerar esta planta como uma fonte natural para a identificação de novos compostos bioativos, além de justificar o estudo desta planta medicinal frequentemente utilizada pela população com outros fins, reforçando a importância de *P. flexuosa* como fitoterápico no Brasil. Deste modo, novos estudos devem ser realizados para investigar a composição química da planta, além de identificar os compostos bioativos e elucidar seus mecanismos de ação, bem como a sua toxicidade.

## 8 – Anexos

### ANEXO 1

**Tabela 4.** características dos isolados selecionados para avaliação dos fatores de virulência.

Isolado clínico	Origem (sítio de isolamento)	Morfologia	Coagulase	Catalase	<i>mecA</i>	<i>femB</i>	Índice de Produção de biofilme
16 <sup>a</sup>	Balança	Cocos em cachos Gram+ - colonias amarelo-rosadas, bordas regulares, superfície lisa, brilhante e convexa	+	+	+	-	4,89
29	Painel de controle do aparelho respirador	Cocos em cachos Gram + - colônias pequenas, esbranquiçadas, bordas regulares	+	+	+	-	5,71
92	Maçaneta dos leitos 02 e 03	Cocos em cachos Gram+ - colônias pequenas amarelas com bordas regulares	+	+	+	-	9,59
112	Telefone	Cocos em cachos Gram+ - colônias pequenas amarelas com bordas regulares	+	+	+	+	0,61

Índice de formação de biofilme = D.O. isolado/D.O. *S. pyogenes*, se menor ou igual a zero (não formador), se menor que 1 (baixo formador), se até 2 (moderado formador), se até 3 (formador), se maior que 4 (altamente formador) (CASSAT; LEE; SMELTZER, 2007).

## ANEXO 2

Tabela 5 - Protocolos de ciclos das reações de PCR

<b>Genes avaliados</b>	<b>T1 (°C)/Tempo Desnaturação</b>	<b>T2 (°C)/tempo anelamento</b>	<b>T3 (°C)/tempo extensão</b>	<b>Ciclos</b>	<b>T4 (°C) Extensão final</b>
<i>fnbA</i>	94/30 s	50/30 s	72/1 min	30	72
<i>fnbB</i>	94/30 s	50/30 s	72/1 min	30	72
<i>α-hla</i>	94/1 min	57/1 min	72/1 min	35	72
<i>PVL</i>	94/1 min	57/1 min	72/1 min	35	72
<i>sea</i>	94/1 min	58/1 min	72/1 min	30	72
<i>seb</i>	94/2 min	55/2 min	72/2 min	30	72
<i>sec</i>	94/2 min	55/2 min	72/2 min	30	72
<i>CflA</i>	94/1 min	57/1 min	72/1 min	35	72
<i>Spa</i>	94/1 min	57/1 min	72/1 min	35	72
16S <i>S. aureus</i>	95/1 min	55/1 min	72/1 min	45	72
<i>icaA</i>	94/1 min	51/1 min	72/1 min	35	72
<i>icaB</i>	94/1 min	59/1 min	72/1 min	35	72
<i>icaC</i>	94/1 min	56/1 min	72/1 min	35	72
<i>icaD</i>	94/1 min	60/1 min	72/1 min	35	72
<i>icaR</i>	94/1 min	56/1 min	72/1 min	35	72

## ANEXO 3

**Tabela 6.** Protocolo das quantidades de reagentes por tipo de PCR (x1)

Reagentes ( $\mu\text{L}$ )	16s	<i>fnbA/fnbB</i>	$\alpha$ - <i>hla</i>	<i>PVL</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>CflA</i>	<i>Spa</i>	<i>Ica's</i>
Água	12,3	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	14,55
Tampão	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
$\text{MgCl}_2$	1,0	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
dNTP	6,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Primer1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Taq	0,2	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,2
cDNA/dna	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,0

Obs.: Cada reação foi padronizada com volume final de 25 $\mu\text{L}$  por amostra.

Concentração dos reagentes:

Tampão (KCl 500 mM, TRIS 200 mM pH 8,4)

$\text{MgCl}_2$  (0,75  $\mu\text{L}$  = 1,5 mM)

dNTP (50 mM de cada)

Primers fatores de virulência diluídos em escala de 20 pmol

Primers *ica's* diluídos em escala de 50 pmol

Taq (1 $\mu\text{L}$  = 5 unidades)

## REFERÊNCIAS

- ABD E.L.; NABI, O. M.; REISINGER, E. C.; REINTHALER, F. F.; STILL, F.; EIBEL, U. E.; KREJS, G. J. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (1L.) Willd. ex Del. var. *nilotica* (Mimosaceae) **J. Ethnopharmacol.** v.37, n.1, p.77-9, 1992
- ABU-SHANAB, B.; ADWAN, G.; JARRAR, N.; ABU-HIJLEH, A.; ADWAN, K. Antibacterial Activity of Four Plant Extracts Used in Palestine in Folkloric Medicine against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* **Turk J Biol.**, v. 30, p. 195-198, 2006
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark **Fitoterapia** v. 72, p. 286-287, 2001.
- AKOĞLU H, ZARAKOLU P, ALTUN B, UNAL S. Epidemiological and molecular characteristics of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Hacettepe University Adult Hospital in 2004-2005 **Mikrobiyol Bul.** , v. 44, n.3, p. 343-355, 2010
- AMRUTKAR, P. P.; REGE, M. D.; CHEN, H.; LAROCCO, M. T.; GENTRY, L. O.; GAREY, K. W. Comparison of Risk Factors for Candidemia Versus Bacteremia in Hospitalized Patients **Infection**, v. 34, n. 6, p. 322-327, 2006
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Projeto de implantação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Termo de cooperação ANVISA/OPAS. Versão 1.3. 2005.
- APPELBAUM, P. C. MRSA — the tip of the iceberg. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12 (Suppl 2), p. 3–10, 2006
- ARCHER, G. L. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1179–1181, 1998
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, p. 2151–2156, 2001
- ARRUDA, V. M. **Avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatória, analgésica e anti-ucrogênica do fitoterápico Sanativo®**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pernambuco, Pernambuco. 2008.
- ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p.105-113, 2001.
- ATSHAN, S. S.; SHAMSUDIN, M. N.; LUNG, L. T. T.; LING, K. H.; SEKAWI, Z.; PEI PEI, C.; GHAZNAVI-RAD, E. Improved method for the isolation of RNA from bacteria

- refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm **Gene**, v. 494, p. 219–224, 2012
- BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance, **Tree**, v. 12, p. 482-487, 1997.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins **Int. J. Food Microbiol.**, v. 61, p.1–10, 2000
- BALÁZSI, G., BARABÁSI, A. L., OLTAVAI, Z. N. “Topological units of environmental signal processing in the transcriptional regulatory network of *Escherichia coli*”. In: **Proceedings of National Academy of Science**, v. 102, n. 22, p. 7841-7846, 2005
- BARATA, L. E. S. **Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br>>. Acesso em: 12 nov. 2010
- BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D **Journal of Bacteriology**, v. 171, v. 9, p. 4799-4806, 1989
- BEAUME, M.; HERNANDEZ, D.; DOCQUIER, M.; DELUCINGE-VIVIER, C., DESCOMBES, P.; FRANÇOIS, P. Orientation and expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small RNAs by direct multiplexed measurements using the nCounter of NanoString technology **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 327–334, 2011
- BECK G.; PUCHELLE, E.; PLOTKOWSKI, C.; PESLIN, R. Effect of growth on surface charge and hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* **Ann Inst Pasteur Microbiol.**, v. 139, p. 655–64, 1988
- BERNARDO, K.; PAKULAT, N.; FLEER, S.; SCHNAITH, A.; UTERMÖHLEN, O.; KRUT, O.; MÜLLER. S.; KRÖNKE, M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. **Antimicrob Agents Chemoter.**, v. 48, n. 2, p. 546-55, 2004.
- BHAKDI, S.; KLONISCH, T.; NUBER, P.; FISCHER, W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4614–4620, 1991
- BHATIA, A; ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A Review **Journal Of Clinical and Diagnostic Research**, v.1, n. 2, p. 188-197, 2007.
- BHATTARAM, A. V.; GRAEF, U.; KOHLERT, C. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products **Phytomedicine**, n. 9, supl. III, p. 1-33, 2002.
- BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 93-99, 2003.
- BISOGNANO, C.; VAUDAUX, P. E.; LEW, D. P.; NG, E. Y. W.; HOOPER, D. C. Increased Expression of Fibronectin-Binding Proteins by Fluoroquinolone-Resistant *Staphylococcus aureus* Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin **Antimicrobial Agents Chemoter.**, v. 41, n. 5, p. 906–913, 1997

BIZZARRO, M. J.; GALLAGHER, P. G. Antibiotic-Resistant Organisms in the Neonatal Intensive Care Unit **Semin Perinatol**, v. 31, p. 26-32, 2007.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 449-455, 2011

BOMONO R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa* **Clin Infect Dis**, v. 43, p. 49-56, 2006

BORG, M.A.; ZERAFÁ, R.; MORRISON, D.; CUSCHIERI, P. Incidence of glycopeptide heterointermediate *Staphylococcus aureus* strains in Maltese hospitals. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, p. 405–407, 2005

BOYCE, J. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 13, p. 725–737, 1992

BOYCE, J.M.; POTTER-BYNOE, G.; CHENEVERT, C. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Possible infection control implications. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 622-627, 1997

BRASIL. Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília,DF, 13 de maio de 1998.

BRASIL\_\_\_\_**A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 de março de 2004

BRITES, C.; SILVA, N.; SAMPAIO-SÁ, M. Temporal evolution of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Bahia, Brazil: a nine-year evaluation study **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 235-38, 2006

BRYERS, J. D. Medical Biofilms **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1-18, 2008

BURKE, F. M.; MCCORMACK, N.; RINDI, S.; SPEZIALE, P.; FOSTER, T. J. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus* **BMC Microbiology**, v.10, n.160, p. 1-15, 2010

BUYNAK J.D. The discovery and development of modified penicillin and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors **Curr Med Chem**, v. 11, p. 1951–64, 2004

CALABRESE, E.; BALDWIN, L. Defining hormesis **Hum Exp Toxicol.**, v. 21, p. 91-97, 2002

CALABRESE E. J. Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 197, n. 2, p. 125-36, 2004

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 298-344, 2011

CAMPOS, G. B.; SOUZA, S. G.; LOBÃO, T. N.; DA SILVA, D. C. C.; SOUSA, D. S.; OLIVEIRA, P. S.; SANTOS, V. M.; AMORIM, A. T.; FARIAS, S. T.; CRUZ, M. P.; YATSUDA, R.; MARQUES, L. M. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units of two public hospitals in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil **Journal of Hospital Infection**, 2012 (*em publicação*)

CARDOSO, H. T.; SANTOS, M. L. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Bras Med**, São Paulo, v. 62, p. 67-70, 1948.

CARDOSO L. S.; ARAUJO, M. I.; GOES, A. M.; PACIFICO, L. G.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA, S.C. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microb Cell Fact**; v. 6, p. 1-5, 2007

CASAGRANDE PROIETTI, P.; COPPOLA, G.; BIETTA, A.; MARENZONI, M. L.; HYATT, D. R.; COLETTI, M.; PASSAMONTI, F. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy **Journal of Veterinary Medical Science** v. 72, n. 11 p. 1443-1448, 2010

CASSAT, J.E.; LEE, C.Y.; SMELTZER, M.S. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* **Methods Mol Biol.** v. 391, p. 127-44, 2007

CATHERINE, A. M. R.; STACY, L. V. A.; XIAOTIAN, T. Z.; ANNE, M. P. R., SUSANNA, A. A day in the life of Nebulizer: Surveillance for bacterial growth in nebulizer equipment of children with cystic fibrosis in the Hospital Setting. **Respiratory Care**, v. 52, n.3, 258-262, 2007.

CAVALCANTE, A. L. F. A. **Plantas medicinais e saúde bucal: estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa**. 2010. 210f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2010.

CECHINEL FILHO, V. Chemical Composition and Biological Potential of Plants from the Genus *Bauhinia* **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1347–1354, 2009

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng (“guaco”) leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 706-709, 2001

CEGELSKI, L., G. R. MARSHALL, G. R. ELDRIDGE, and S. J. HULTGREN. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nat. Rev. Microbiol.** 6:17–27, 2008



CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. **Morb Mortal Wkly Rep MMWR**, v. 51, p. 565–567, 2002

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* **Emerging Infect Dis**; v. 7, p. 178-182, 2001

CHAMBERS, H. F.; DeLEO, F. R. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era **The journal of clinical investigation**, v. 119, p. 2464-2474, 2009

CHAMPNEY, W. S. Bacterial ribosomal subunit synthesis: a novel antibiotic target. **Curr. Drug Targets-Infect. Disorders**, v. 1, p. 19–36, 2001

CHOI, E.J.; KO, H.H.; LEE, M.W.; BANG, H.; LEE, C.S. Inhibition of activated responses in dendritic cells exposed to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid by diarylheptanoid oregonin **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, n. 5, p. 748-755, 2008.

CHOPRA I.; HESSE L.; O'NEIL, L. A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs **Symp Ser Soc Appl Microbiol**, v. 31, p. 4-15, 2002

CLEVELAND J., MONTVILLE T.J., NES I.F., CHIKINDAS M.L Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation **Int J Food Microbiol**, v. 71, p. 1-20, 2001

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**, seventh edition. Approved standard M7-A8 CLSI, Wayne, PA, 2009; 65 p.

COELHO, L. R.; SOUZA, R. R.; FERREIRA, F. A.; GUIMARÃES, M. A.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; FIGUEIREDO, A. M. agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**. v. 154, n. 11, p. 3480-90, 2008.

COLQUE-NAVARRO, P., PALMA, M., SÖDERQUIST, B., FLOCK, J., MÖLLBY R. Antibody Responses in Patients with Staphylococcal Septicemia against Two *Staphylococcus aureus* Fibrinogen Binding Proteins: Clumping Factor and an Extracellular Fibrinogen Binding Protein **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 1, p. 14–20, 2000

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ>>. Acesso em: 19 set. 2011.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5427–5433, 1999.

CRAMTON, S. E.; ULRICH, M.; GÖTZ, F.; DÖRING, G.. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4079–4085, 2001

CUE, D.; LEI, M. G.; LUONG, T. T.; KUECHENMEISTER, L.; DUNMAN, P.M.; O'DONNELL, S.; ROWE, S.; O'GARA, J. P.; LEE, C. Y. Rbf Promotes Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* via Repression of *icaR*, a Negative Regulator of *icaADBC* **Journal Of Bacteriology**, v. 191, n. 20, p. 6363–6373, 2009

CULLMANN, W.; SCHLUNEGGER, H. Influence of exogenous factors and antibiotics on the cytoplasmic membrane proteins of *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 38, p. 211–7, 1992

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616–687, 2010

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295–298, 1998

DAVIES J.; SPIEGELMAN, G.B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations **Curr Opin Microbiol.** v. 9, n. 5, p. 445-53, 2006

DAVIS, J. S. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus* **Internal medicine journal**, v. 35, n. 2, p. S79-96, 2005

DE BEER, D.; STOODLEY, P.; LEWANDOWSKI, Z. Liquid flow in heterogeneous biofilms **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 636–641, 1994

DE LIMA, M. R.; DE SOUZA LUNA, J.; DOS SANTOS, A. F.; DE ANDRADE, M.C.; SANT'ANA, A.E.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants **J Ethnopharmacol.**, v. 21, n. 105(1-2), p. 137-47, 2006

DE MARCO, C. E.; CUSHING, L. A.; FREMPONG-MANSO, E. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus* **Antimicrob Agents Chemoter.**, v. 51, p. 3235–3239, 2007.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; SCHMITZ, F. J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R. N.; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial

Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Diseases** 32(Suppl. 2):S114–S132, 2001

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.1, p. 16-34, 2000

DONLAN, R. M. J.; COSTERTON, W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167–193, 2002

DREES, M.; SNYDMAN, D.R.; SCHMID, C.H.; BAREFOOT, L.; HANSJOSTE, N. K.; VUE, P.M.; Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. **Clin Infect Dis.**, v. 46, n. 5, p. 678-85, 2008

DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; S. FILHO, A. O.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semiárido da Bahia. In: XX Internacional Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2008, São Paulo. **XX Internacional Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2008. p. 03.032.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, 2006.

DUARTE, C.O.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 2155-61, 2002

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a Novel Type os Propolis and Its Chemical Fraction on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003

ENGEL, I. C.; FERREIRA, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; SILVA, C. M. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.2, p. 258-264, 2008

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 7687-92, 2002

ERSON K.L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? **CRSQ**; 41: 318-26, 2005

ESTEVAM, C. S. **Estudo fitoquímica biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 198f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2006.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. 2005. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 19 fev. 2012.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 21, n. 1, 2002.

FAUCI, A.S. Infectious diseases: considerations for the 21 century **Clin. Infect. Dis.** V. 32, p. 675-85, 2001

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products and Molecules from Combinatorial Chemistry. **Journal of Chemical Informatics and Computer Science**, n. 1, v. 43, 2003.

FEY, P. D.; SAÏD-SALIM, B.; RUPP, M. E.; HINRICHS, S. H.; BOXRUD, D. J.; DAVIS, C. C.; KREISWIRTH, B. N.; SCHLIEVERT, P. M. Comparative Molecular Analysis of Community or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 196-203, 2003

FLUCKIGER, U.; ULRICH, M.; STEINHUBER, A.; DÖRING, G.; MACK, D.; LANDMANN, R.; GOERKE, C.; WOLZ, C. Biofilm Formation, *icaADBC* Transcription, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis by Staphylococci in a Device-Related Infection Model **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1811–1819, 2005

FOSTER, T. J.; MCDEVITT, D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 118, p. 199–206, 1994a

FOSTER, T. J.; MCDEVITT, D.. Molecular basis of adherence of staphylococci to biomaterials, p. 31–44. In: A. L. Bisno and F. A. Waldvogel (ed.), **Infections associated with indwelling medical devices**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994b

FOURMY, D.; RECHT, M. I.; BLANCHARD, S. C.; PUGLISI, J. D. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, p. 1367–1371, 1996

FOURMY, D., YOSHIZAWA, S.; PUGLISI, J. D. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. **J. Mol. Biol.**, v. 277, p. 333–345, 1998

FOWLER, V. G.; JR., P. D.; FEY, L. B.; RELLER, A. L.; CHAMIS, G. R.; COREY, RUPP, M. E. The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 189, p. 127–131, 2001

GAD, G. F. M.; EL-FEKY, M. A.; EL-REHEWY, M. S.; HASSAN, M. A.; ABOLELLA, H.; EL-BAKY, R. M. A. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients **Journal Infectious Development Countries**, v. 3, n.5, p. 342-351, 2009

GEMMELL, C. G. Antibiotics and the expression of staphylococcal virulence. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 36, p. 283–291, 1995

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the

*Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 18586–18593, 1998

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products **Natural Products Report** v. 21, p. 263–277, 2004.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 51, p. 13–17, 2003

GILLET, Y. et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients **Lancet**, v. 359, n. 9308, p.753-759, 2002.

GOH, E. B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M. G.; DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 17025–17030, 2002

GOLD H. S.; MOELLERING R. C. Antimicrobial-drug resistance. **N Engl J Med**; v. 335, p. 1445-53, 1996

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection **Clin Infect Dis**, v. 46, S350-9, 2008

GOTTLIEB, O. R; KAPLAN, M. A; BORIN, M. R. **Biodiversidade**: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes **Quimica Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010

HACKER, J.; OTT, M.; HOF, H. Effects of low, subinhibitory concentrations of antibiotics on expression of virulence gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* by using a wild-type gene fusion. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 2, p. 263–270, 1993

HAO, G.; ZHANG, D.; ZHANG, M.; GUO, L.; LI, S. Phylogenetics of *Bauhinia* subgenus *Phanera* (Leguminosae: Caesalpinioideae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 44, p. 223-228, 2003

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996

HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GÖTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 1013–1024, 1997

HENRY-STANLEY, M. J.; SHEPHERD, M. M.; WELLS, C. L.; HESS, D. J. Role of *Staphylococcus aureus* Protein A in Adherence to Silastic Catheters **Journal Surgical Research** v. 167, n. 1, p. 9–13, 2011

HEUMANN, D.; BARRAS, C.; SEVERIN, A.; GLAUSER, M. P.; TOMASZ, A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2715–2721, 1994

HIGUCHI W.; TAKANO T.; TENG L. J.; YAMAMOTO T. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. **Biochemical Biophysics Research Communications** v. 377, n.3 p. 752–6, 2008

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility **J Antimicrob Chemother**, v. 40, p. 135–136, 1997.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** 9:486–493, 2001

HIRAMATSU, K.; OKUMA, K.; MA, X. X.; YAMAMOTO, M.; HORI, S.; KAPI, M. New trends in *Staphylococcus aureus* infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 15, p. 407–413, 2002

HÖÖK, M.; SWITALSKI, L. M.; WADSTRÖM, T.; LINDBERG, M. Interactions of pathogenic microorganisms with fibronectin, p. 295–308. In: D. F. Mosher (ed.), **Fibronectin**. Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1989

HOOPER, D.C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology **Clin Infect Dis**, v. 40, p. 1811–17, 2005

HUANG S.S.; PLATT, R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 281–285, 2003

HULETSKY, A.; GIROUX, R.; ROSSBACH, V.; GAGNON, M.; VAILLANCOURT, M.; BERNIER, M.; GAGNON, F.; TRUCHON, K.; BASTIEN, M.; PICARD, F. J.; VAN BELKUM, A.; OUELLETE, M. M.; ROY, P. H.; BERGERON, M.G. New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of Staphylococci **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1875–1884, 2004

ITO T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 2637–51, 2004

JACOBY G. A. Mechanisms of resistance to quinolones **Clin Infect Dis**, v. 41, p. 120–26, 2005

JACOBSSON, G. **Invasive *Staphylococcus aureus* infections** – tese - Department of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine Sahlgrenska Academy University of Gothenburg, Sweden, 2009

JORGE, L. I. F.; SILVA, G. A.; FERRO, V. O. Diagnose laboratorial dos frutos de *Anacardium occidentale* L. (caju). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 5, p. 55–69, 1996

JOSEFSSON, E.; HARTFORD, O.; O'BRIEN, L.; PATTI, J. M.; FOSTER, T. Protection against Experimental *Staphylococcus aureus* Arthritis by Vaccination with Clumping Factor A, a Novel Virulence Determinant **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1572–80, 2001

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 44, p. 1549-1555, 2000

KAYABAS, U.; BAYRAKTAR, M.; OTLU, B.; UGRAS, M.; ERSOY, Y.; BAYINDIR, Y. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unite: A pulsedfield gel electrophoresis – based epidemiologic study. **Am J Infect Control**. v. 36, n.1, p. 33-8, 2008

KELLER, R.; FISCHER, W.; KEIST, R.; BASSETTI, S. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 3664–3672, 1992

KIKUCHI, T.; NAGASHIMA, G.; TAGUCHI, K.; KURAIISHI, H.; NEMOTO, H.; YAMANAKA, M.; KAWANO, R.; UGAJIN, K. Contaminated oral intubation equipment associated with an outbreak of carbapenem resistant pseudomonas in a intensive care unit. **J. Hospital Infect.**, v. 65, p. 54-57, 2007

KIRISITS, M. J.; PARSEK, M. R. “Does *Pseudomonas aeruginosa* Use Intercellular Signalling to Build Biofilm Communities?” **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1841, 2006

KLOOS, W. E. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans, p. 113–137. In: K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), **The staphylococci in human disease**. Churchill Livingstone, New York, N.Y., 1997

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology** American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap.16, p. 264-282.

KNOBLOCH, J. K. M.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; MACK, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 191, p. 101–106, 2002

KOBAYASHI, S. D.; DeLEO, F. R. An Update on community-associated MRSA virulence **Current Opinion in Pharmacology** v. 9, p. 545-551, 2009

KOCSIS, E.; LAGLER, H.; PESTI, N.; STICH, K.; KRISTO, K.; NAGY, K.; HERMANN, P.; KOMKA, K.; CEKOVSKA, Z.; GRANINGER, W.; ROZGONYI, F. Comparison of Austrian, Hungarian and Macedonian methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains in relation to prevalence of cytotoxin genes **Microbial Pathogenesis** v. 46, p. 328–336, 2009

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J., MOBASHERY, S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 3249–3256, 2000

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 130-136, 2006

KUMAR, V. P.; CHAUHAN, N. S.; PADH, H.; RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants **Journal Ethnopharmacology**, v.107, n.2, p.182-188, 2006

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; S. KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHYNO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, M.; HAYASHI, H. and HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, p.1225–1240, 2001

LASTRES, H. M. M.; ALBAGLI, S.; LEMOS, C.; LEGEY, L. Desafios para Políticas na Era do Conhecimento: uma visão fluminense. Rio de Janeiro, **4ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, Ministério da Ciência e Tecnologia**, 2001

LAUDERDALE, K. J.; BOLES, B. R.; CHEUNG, A. L.; HORSWILL, A. R. Interconnections between Sigma B, *agr*, and Proteolytic Activity in *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1623–1635, 2009

LAWRENCE, J. R.; KORBER, D. R.; HOYLE, B. D.; COSTERTON, J. W. Optical sectioning of microbial biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 6558–6567, 1991

LEE, J.; JI, Y.; LEE, S.; LEE, I. Effect of *Saliva miltiorrhiza* Bunge on Antimicrobial Activity and Resistant Gene Regulation against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) **The Journal of Microbiology**, v. 45, n.4, p. 350-357, 2007

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning **Genet. Mol. Res.**, v. 31, p. 63–76, 2003

LEUNG, E.; WEIL, D. E.; RAVIGLIONE, M.; NAKATANIA, H. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance **Bulletin World Health Organization**, v. 89, p. 390–392, 2011

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2005. 632p.

LEVY, R.; KOTB, M.; NAGAUKE, O.; MAJUMDAR, G.; ALKAN, M.; OFEK, I.; BEACHEY, E.H. Stimulation of oxidative burst in human monocytes by lipoteichoic acids. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 2, p. 566-568, 1990.



LI, D.Z.; CHEN, Y.S.; YANG, J.P.; ZHANG, W.; HU, C.P.; LI, J.S.; MU, L.; HU, Y.H.; GENG, R.; HU, K.; CAI, S.X.; WAN, H.Y.; WANG, Q.Y.; WEI, L.P.; DU, J.; YU, Q.; ZHONG, X.N.; WANG, R.Q.; MA, J.J.; TIAN, G.Z.; WANG, S.Q.; GAO, Z.C. Preliminary molecular epidemiology of the *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract infections: a multicenter study in China. **Chin Med J (Engl)**, v. 124, n. 5, p. 687-92, 2011

LIN, J.T.; CONNELLY, M.B.; AMOLO, C.; OTANI, S.; YAVER D.S. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, n. 5, p. 1915-26, 2005

LINDSAY, J. A. For CA-MRSA, how much PVL is too much? **Microbiology Comment**, v. 155, p. 3473-3474, 2009

LOPES, H. V.. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Revista panamericana de infectologia**, v. 7, n. 3, p. 34-36, 2005

MACHADO, T. B.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOSSANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 279-284, 2003

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002

MACK, D.; SIEMSEN, N.; LAUFS, R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2048-2057, 1992

MACK, D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation **J. Hosp. Infect.**, v. 43(Suppl.), p. S113-S125, 1999

MACK, D.; BECKER, P.; CHATTERJEE, I.; DOBINSKY, S.; KNOBLOCH, J. K. M.; PETERS, G.; ROHDE, H.; HERRMANN, M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 203-212, 2004

MAINARDI, J. L.; SHLAES, D. M.; GOERING, R. V.; SHLAES, J.H.; ACAR, J. F.; GOLDSTEIN, F. W. Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* **J. Infect. Dis.**, v. 171, p. 1646-1650, 1995

MALOUIN, F.; BRYAN, L. E. Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of  $\beta$ -Lactam Resistance **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n.1, p. 1-5, 1986

MAMIZUKA, E. M.; OLIVEIRA, G. A. Isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina em hospital brasileiro **Pharm Brás**, v. 6, p. 7-8, 2000

MARINO, A.; BELLINGHERI, V.; NOSTRO, A.; MICELI, N.; TAVIANO, M. F.; GUVENC, A.; BISIGNANO, G. In vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from

Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, p. 470–476, 2010

MARTÍN-LÓPEZ, J. V.; PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; DÍEZ GIL, O.; BATISTA, N.; MORALES, M.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1569–1570, 2002

MASHOUR, N. H.; LIN, G. I.; FRISHMAN, W. H. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease - clinical considerations **Archives Internal Medicine**, v. 158, p. 2225–2234, 1998

MATTSSON, E.; VERHAGE, L.; ROLLOF, J.; FLEER, A.; VERHOEF, J.; VAN DIJK, H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin- $\alpha$  and interleukin-6. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 7, p. 281–287, 1993

MCDERMOTT P.F.; WALKER R.D.; WHITE D.G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance **Int J Toxicol**, v. 22, p. 135-43, 2003

McKENNEY, D.; HÜBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4711–4720, 1998

McKINNEY, T.K.; SHARMA, V.K.; CRAID, W.A.; ARCHER, G.L. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is co-repressed but not co-induced by cognate *mecA* and  $\beta$ -lactamase regulators. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6862-6868, 2001

MEHTA, R.; W. CHAMPNEY, S. 30S Ribosomal Subunit Assembly Is a Target for Inhibition by Aminoglycosides in *Escherichia coli* Antimicrob Agents Chemother., v. 46, n. 5, p. 1546–1549, 2002

MELO, J. G.; NASCIMENTO, V. T.; AMORIM, E. L. C.; ANDRADE LIMA, C. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.) **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 2, 2004

MENDONÇA-FILHO, R. R.; Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. Alemanha: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 08-13, 2007

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J. A.; FOSTER, T. J.; PENADES, J. R.; LASA, I.

Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus* **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 832–843, 2009

MILES, G.; MOVILEANU, L.; BAYLEY, H. Subunit composition of a bicomponent toxin: Staphylococcal leukocidin forms in a octameric transmembrane pore **Protein Science**, v. 11, p. 894–902, 2002

MILISAVLJEVIC, V.; TRAN, L. P.; BATMALLE, C.; BOOTSMA, H. J. Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. **American Journal of Infection Control**, v. 36, n. 8, p. 552-8, 2008.

MIN L. I.; YUPING, L. A. I.; AMER, E. V.; DAVID, J. C.; DANIEL, E. S.; MICHAEL, O. Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptide sensing System. **PNAS**, v. 104, p. 9469-74, 2007

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 727– 737, 1999

MOAZED, D.; NOLLER, H. F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA **Nature**, v. 327, p. 389–394, 1987

MOHTAR, M.; JOHARI, S A.; LI, A.R.; ISA, M. M.; MUSTAFA, S.; ALI, A. M.; BASRI, D. F. Inhibitory and Resistance-Modifying Potential of Plant-Based Alkaloids Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) **Current Microbiology**, v. 59, p. 181–186, 2009.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. CEPLAC, Ilhéus, 1989.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NEELY, A.N.; MALEY, M.P: Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabric and plastic **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 724-726, 2000

NEU H. C. The crisis in antibiotic resistance **Med Sci (Paris)**, v. 257, p. 1064-77, 1992

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NG, W.L.; KAZMIERCZAK, K.M.; ROBERTSON, G.T.; GILMOUR, R.; WINKLER, M.E. Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sub-lethal concentrations of translation inhibitors **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 359–370, 2003

NGUYEN, T.; GHEBREHIWET, B.; PEERSCHKE, E. I. B. *Staphylococcus aureus* Protein A Recognizes Platelet gC1qR/p33: a Novel Mechanism for Staphylococcal Interactions with Platelets **Infection and Immunity** v. 68, n. 4, p. 2061–2068, 2000

NIERHAUS, K. Structure, assembly and function of ribosomes. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 97, p. 81–155, 1982

NILSSON, M.; FRYKBERG, L.; FLOCK, J. I.; PEI, L.; LINDBERG, M.; GUSS, B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2666–2673, 1998

NOGUEIRA, M. S. **Ação de Produtos Naturais sobre Populações Bacterianas** 2000. 131p. (Dissertação de Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

NOMURA, M. Assembly of bacterial ribosomes **Science**, v. 179, p. 863–873, 1973

NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annu. Rev. Genet.**, v. 42, p. 541–564, 2008

O’GARA, James P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 179–188, 2007

OGLE, J. M.; BRODERSEN, D. E.; CLEMONS, W. M.; TARRY, M. J.; CARTER, A. P.; RAMAKRISHNAN, V. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. **Science** 292:897–902, 2001

OHLSEN, K.; ZIEBUHR, W.; KOLLER, K. P.; HELL, W.; WICHELHAUS, T. A.; HACKER, J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2817–2823, 1998

OKUMA K., IWAKAWA, K., TURNIDGE, J.D., GRUBB, W.B., BELL, J.M., O'BRIEN, F.G., COOMBS, G.W., PEARMAN, J.W., TENOVER, F.C., KAPI, M., TIENSASITORN, C., ITO, T., HIRAMATSU, K. Dissemination of New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community **J Clin Microbiol** v. 40, p. 4289-94, 2002

OLIVEIRA, G. A.; FARIA, J. B.; LEVY, C. E.; MAMIZUKA, E. M. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 5, p. 163-70, 2001

OLIVEIRA, D. C.; MILHEIRIÇO, C.; DE LENCASTRE, H. Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassete Chromosome *mec*, *SCCmec* Type VI. **Antimicrobial. Agents. Chemoter.**, p. 3457-3459, 2006

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G.W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemicals**, v. 65, p. 3249–3254, 2004.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas para lãs metodologias de investigación de La medicina tradicional**. Ginebra, 2000. Disponível em: <<http://www.who.it/em>>. Acesso em: 24 de fevereiro de. 2012.

OTILIA S. H. L. R. Perfil de sensibilidade do *S. aureus* e *S. epidermidis* no Hospital Municipal Souza Aguiar, 1o semestre de 1998. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32 (sup 1), p. 423, 1999.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **J Ethnopharmacol**. v.48, n.1, p.21-24, 1995.

PAGES J.M. Bacterial porin and antibiotic susceptibility **Med Sci (Paris)**, v. 20, p. 346–51, 2004

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HOOK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues **Annu. Rev. Microbiol.** 48:585–617, 1994

PEACOCK, S. J.; MOORE, C. E.; JUSTICE, A.; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL, G.; DAY, N. P. J. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus* **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4987–4996, 2002

PEDERSON, C. S.; FISHER, P. Bactericidal activity of vegetable juice. **Journal of Bacteriology**, v. 47, p. 421-422, 1984

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clin Microbiol Rev**, 19: 382-402, 2006

PRADE, S. S. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários **Rev Controle Infecção Hosp**; v. 2, n. 2, 1995

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future **Clinical Microbiology Infection**, v. 10 (Suppl. 4) p. 23–31, 2004

QIU, J.; FENG, H.; LU, J.; XIANG, H.; WANG, D.; DONG, J.; WANG, J.; WANG, X.; LIU, J.; DENG, X. Eugenol Reduces the Expression of Virulence-Related Exoproteins in *Staphylococcus aureus* **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n. 17, p. 5846–5851, 2010.

QUAVE, C. L.; PLANO, L. R.W.; PANTUSO, T.; BENNETT, B. C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 418–428, 2008

QUEIROZ, L.P. New species and new combinations in *Phanera* Lour. (Caesalpinioideae: Cercideae) from de caatinga biome **Neodiversity**, v. 1, p. 6-10, 2006

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WALLNER, U.; HACKER, J.; HECKER, M., ZIEBUHR, W. Alternative transcription factor B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6824– 6826, 2000

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis* **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 12, p. 3357–3363, 2000

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang and Dale's Pharmacology 6<sup>a</sup>**. Edition, Churchill Livingstone-Elsevier: USA, 2007, 795 p.

RECHT, M. I.; DOUTHWAITE, S.; DAHLQUIST, K. D.; PUGLISI, J. D. Effect of mutations in the A site of 16S RNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 286, p. 33–43, 1999

RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial Infections in medical intensive care units in the United States. **Crit Care Med.**, v. 27, p. 887-892, 1999

RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial Infections in combined Medical-Surgical intensive care units in the United States. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 21, p. 510-515, 2000

RILEY M. A.; WERTZ J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, v. 84, p. 357–64, 2002

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; PASCUAL, Á. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 26, n.2, p. 107-14, 2008

ROHDE, H., KNOBLOCH, J. K.; HORSTKOTTE, M. A.; MACK, D.; ARCIOLA, C. R., MONTANARO, L.; BALDASSARRI, L. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 4595–4596, 2001

ROLAIN J.M.; RAULT D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus **Ann N Y Acad Sci**, v. 1063, p. 222-30, 2005

ROSSI, F.; ANDREZZI, D. **Resistência Bacteriana – Interpretando o Antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

ROUVEIX, B. Clinical Implications of Multiple Drug Resistance Efflux Pumps of Pathogenic Bacteria **J Anti Chem**, v. 59, p. 1208-09, 2007

RUSSEL, A. D. Antibiotic, biocide resistance in bacteria: Introduction. **J Appl Microbiol**, v. 92: 1S-3S, 2002

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin – resistant Enterococci **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 2, p.140-144, 2002

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **eCAM**, v. 7, n. 3, p. 283–294, 2010. Disponível em: <<http://ecam.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 21 dez. 2011.

SANDERS, D. W.; WEATHERWAX, P.; MCCLUNG, L. S. Antibacterial Substances from Plants Collected in Indiana **J Bacteriol.**, v. 49, n. 6, p. 611-5, 1945

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2007.

SCHILLACI D.; ARIZZA, V.; DAYTON, T.; CAMARDA, L.; DI STEFANO, V. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils **Lett Appl Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 433-8, 2008

SCHROEDER, R.; WALDSICH, C.; WANK, H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. **EMBO J.**, v. 19, p. 1–9, 2000

SCHWANDNER, R.; DZIARSKI, R.; WESCHE, H.; ROTHE, M.; KIRSCHNING, C.J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 25, p. 17406-17409, 1999.

SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S.F. The survival and transfer of microbial contamination via cloths; hands and utensils **J Appl Bacteriol.**, v. 68, p. 271-278, 1990

SEO, H.S.; MICHALEK, S.M.; NAHM, M.H. Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to gram-positive bacteria **Infect. Immun.**, v. 76, n. 1, p. 206- 213, 2008.

SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 81–104, 1998.

SHAW, K.J.; MILLER, N.; LIU, X.; LERNER, D.; WAN, J.; BITNER, A.; MORROW, B.J. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents **J. Molec. Microbiol. Biotechnol.**, v. 5, p. 105–122, 2003

SHINJI, H.; YOSIZAWA, Y.; TAJIMA, A.; IWASE, T.; SUGIMOTO, S.; SEKI, K.; MIZUNOE, Y. Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B in *In Vitro* Cellular Infections and *In Vivo* Septic Infections by *Staphylococcus aureus* **Infection And Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2215–2223, 2011

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição Química e Potencial Farmacológico **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação/organizadores**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

SILVA, G. J.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* **Rev. bras. farmacogn.**, v.17, 2007.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* **J Med Microbiol.**, v. 53(Pt 10), p. 1023-7, 2004

SOMERVILLE, G. A., PROCTOR, R. A. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, p. 233–248, 2009

SOUZA, L. B. G.; FIGUEIREDO, B. B. Prevalência de infecções nosocomiais provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (M.R.S.A.), no Hospital Universitário Regional de Maringá. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS JR, J. E. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1279–86, 2004

STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P. W.. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. **Science progress**, v. 85, n. Pt 1, p. 57-72, 2002

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 1247–1260, 2007

STUTZ, K.; STEPHAN, R.; TASARA, T. SpA, ClfA, and FnbA Genetic Variations Lead to StaphaurexTest-Negative Phenotypes in Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 638–646, 2011

SUCI, P. A.; MITTELMAN, M. W.; YU, F. P.; GESEY, G. G. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 2125–2133, 1994

SUTCLIFFE, J. A Improving on nature: antibiotics that target the ribosome **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 534–542, 2005

TABARELLI, M; SILVA, J.M.C. Áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. In: Araújo et al.(ed.) **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife Pp. 47-52. 2002.

TABARELLI, M.; VICENTE, A. Lacunas de conhecimento sobre as plantas lenhosas da Caatinga. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; GIULIETTI, A.M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRAROJAS,C.F.L. (eds). **Vegetação e flora da Caatinga**. Recife: Associação de Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informação sobre Plantas, p.25-35, 2003.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes Químicos de *Luehea divaricata* MART. (TILIACEAE) **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, 834-837, 2005



TAXONOMY BROWSER – sítio pertencente ao NCBI, contendo informações sobre taxonomia dos diversos seres vivos lá indexados. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>> Acessado em 29 de dez. de 2011.

TIMMERMAN, C. P.; MATTSSON, E.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; DE GRAAF, L. J.; VAN STRIJP, A. G.; VERBRUGH, H. A.; VERHOEF, J.; FLEER, A. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4167–4172, 1993

TIPPER, D. J. Mode of Action of b-Lactam Antibiotics **Pharmacology Therapeutics**, v. 27, p. 1-35, 1985

TOJO, M.; YAMASHITA, N.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 713–722. [Erratum, 158:268, 1988.], 1988

TRABULSI, L. R.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N.. **Microbiologia**, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 175-182.

TRINDADE, P. D. A.; PACHECO, R. L.; COSTA, S. F.; ROSSI, F.; BARONE, A. A.; MAMIZUKA, E. M.; LEVIN, A. S. Prevalence of *SCCmec* Type IV in Nosocomial Bloodstream Isolate of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3435-7, 2005

TSUI, W. H. W.; YIM, G.; WANG, H. H.; MCCLURE, J. E.; SURETTE, M. G., DAVIES, J. Dual Effects of MLS Antibiotics: Transcriptional Modulation and Interactions on the Ribosome **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 1307–1316, 2004

VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F.C. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli* **Proc. Natl Acad Sci U S A**, v. 87, p. 5589-93, 1990.

VANNUFFEL, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMEE, M.; WAUTERS, G.; GALA, J. L. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2864-2867, 1995

VARNAN, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London, Mosby Year Book, p. 235-265, 1991

VAZQUEZ, D. **Inhibitors of protein biosynthesis** Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1979

VAZ, A. M. S. F. New combinations in *Phanera* (Leguminosae; Cercideae) from Brazil **Rodriguésia**, v. 61(Sup): S33-S40, 2010

VEENSTRA, G. J.; CREMERS, F. F.; VAN DIJK, H.; FLEER, A. Ultra structural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 537–541, 1996

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de Mexico**, v. 47, n. 5, p. 381-387, 2005

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BAVAI, C.; RICHARD, Y. Improvement of a concentration protocol based on trichloroacetic acid for extracting staphylococcal enterotoxins in dairy products **Reveu Médecine Vétérinaire**, v. 155, n. 11, p. 533-537, 2004.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANCAS, F. M. Extraction of low polarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (Guaco) leaves. **Phytoch. Anal.** v. 8, p. 266–270, 1997.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER, E. R.; DeLEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence **J Biol Chem.**, v. 279, n. 52, p. 54881-54886, 2004

WAGENVOORT, J. H. T.; PENDERS, R. J. R. Long-term in-vitro survival of an epidemic MRSA phage-group III-29 strain. **J. Hosp. Infec.**, v. 35, p. 322-325, 1997

WANG, J. E.; DAHLE, M. K.; MCDONALD, M.; FOSTER, S. J.; AASEN, A. O.; THIEMERMANN, C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. **Shock**, v. 20, n. 5, p. 402-414, 2003.

WERTHEIM, H. F.; VERVEER, J.; BOELEN, H. A.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; VOS, M. C. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 1465-7, 2005

WHITE J. Bites and stings from venomous animals: a global overview. **Ther Drug Monit**, v. 22, p. 65–8, 2002

WILSON, B.A.; SALYERS, A. A.; WHITT, D. D.; WINKLER, M. E. **Bacterial Pathogenesis : A Molecular Approach**. 3rd edition. Washington, DC: ASM Press, 2011. 526 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Legal status of traditional medicine and complementary alternative medicine**. Geneva: World Health Organization; 2001. Disponível em: <<http://www.who.it.em>>. Acesso em: 24 fevereiro de. 2012.

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

WUNDERLIN, R. P.; EILERS, R. M. Revision of *Bauhinia* Subgenus *Phanera* Section *Schnella* (Cercideae: Caesalpinioideae: Fabaceae) **J. Bot. Res. Inst. Texas**, v. 3, n. 2, p. 619 – 628, 2009

YARWOOD, J. M.; BARTELS, D.J.; VOLPER, E.M.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms **J Bacteriol.** v. 186, n. 6, p. 1838-50, 2004

YARWOOD, J. M.; PAQUETTE, K. M.; TIKH, I. B.; VOLPER, E. M.; GREENBERG, E. P. Generation of Virulence Factor Variants in *Staphylococcus aureus* Biofilms **Journal Of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7961–7967, 2007

YATSUDA, R. Efeito antimicrobiano “in vitro” da *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* sobre estreptococos do grupo mutans. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba. 2004.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDERB, V. L. G.; MELOB, L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 83-189, 2005.

YIM G.; WANG H.H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **Int J Med Microbiol.**, v. 296, n. 2-3, p. 163-70, 2006

YUNES, R. A; CALIXTO, J. B.; **Plantas Medicinais sob a ótica da Moderna Química Medicinal**. Chapecó: Argos, 2001, 500p.

XIONG, Z.; GE, S.; CHAMBERLAIN, N.R.; KAPRAL, F. A. Growth cycle-induced changes in sensitivity of *Staphylococcus aureus* to bactericidal lipids from abscesses **J Med Microbiol**, v. 39, p. 58–63, 1993

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A. E CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. p. 435-479.

ZANETTI, G. D. *Tropaeolum majus* L. morfo-histologia, fitoquímica, atividade antimicrobiana e toxicidade. 2002. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ciêncas e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, Santa Maria, 2002.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 2, p. 227 -233, 1998

ZHANG, J.; LIU, X. Study on tetrazolium salt colorimetric assay for growth and survival of bacteria **Wei Sheng Yan Jiu**. v. 31, n. 5, p. 361-3, 2002