

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos das folhas de  
*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger frente à *Staphylococcus aureus*  
resistente à metilina**

**FERNANDA DE OLIVEIRA GALVÃO SANTOS**

**Dourados - MS**

**2018**

FERNANDA DE OLIVEIRA GALVÃO SANTOS

Atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos das folhas de  
*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger frente *Staphylococcus aureus*  
resistente à meticilina

Área do CNPq: Microbiologia Aplicada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde  
da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-  
Parasitárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Mari Pires de Oliveira

Dourados - MS

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

G182a Galvao, Fernanda De Oliveira

Atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos das folhas de  
Cochlospermum regium (Schrank) Pilger frente à Staphylococcus aureus  
resistente à metilicina / Fernanda De Oliveira Galvao -- Dourados: UFGD, 2018.  
56f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da  
Grande Dourados

Inclui bibliografia

1. MRSA, infecções hospitalares, infecções comunitárias, resistência  
microbiana, plantas medicinais.. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** APRESENTADA POR FERNANDA DE OLIVEIRA GALVÃO SANTOS, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “**DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS**”, REALIZADA NO DIA 05 DE SETEMBRO DE 2018.

Ao quinto dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezoito (05/09/2018), às 14h, em sessão pública, realizou-se, no auditório da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada “Atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger frente *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.” apresentada pela mestranda FERNANDA DE OLIVEIRA GALVÃO SANTOS, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira** (Presidente/orientador), **Dra. Marilene Rodrigues Chang** (membro externo) e **Dra. Adriana Araujo de Almeida Apolônio** (membro externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 05 de setembro de 2018.

Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira \_\_\_\_\_ *Kelly Oliveira*

Dra. Marilene Rodrigues Chang \_\_\_\_\_ *Marilene Rodrigues Chang*

Dra. Adriana Araujo de Almeida Apolônio \_\_\_\_\_ *Adriana Araujo*

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza  
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

Dedico este trabalho aos meus pais, Cláudia e Júnior, e meu esposo, Manah, por todo incentivo, amor e apoio necessário para que eu chegasse aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo milagre da vida, por seu amor incondicional e por me sustentar até aqui.

Aos meus pais, Junior e Cláudia, por serem o meu “porto seguro”. Obrigada por investirem em mim e por sempre me convencerem que tudo daria certo. Obrigada por cada palavra, cada oração e cada gesto. Eu sou quem sou graças a vocês.

As minhas irmãs, Renata e Raquel, pelo apoio, companheirismo, amizade, amor e por serem tão especiais.

A minha avó Almiros, por tanto amor, cuidado e por fazer de tudo pra me ver bem. A minha avó Deusa, que mesmo de longe sempre demonstrou seu amor e torceu por mim.

Ao meu esposo Manah, pelo carinho, cuidado, amor, companheirismo e atenção. Obrigada por acreditar em mim e por ser tão paciente. Obrigada pelas palavras de incentivo e por estar presente em todos os momentos.

A professora Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira, pela orientação, contribuições, disponibilidade, paciência e por todo investimento em mim e na realização desse trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, que muitas vezes me auxiliaram nos experimentos e foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelo apoio e principalmente pela amizade. Em especial, quero agradecer a Adriana e Fabiana, por todo o conhecimento passado, e com tanto carinho. Não tenho palavras pra agradecer vocês.

A professora Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso pelas análises químicas dos extratos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições.

A CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada!

A coragem nem sempre estrondeia.  
Às vezes, ela é a voz suave no fim do dia que diz:  
Tentarei novamente amanhã.

(Mary Anne Radmacher)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre um cateter.	18
Figura 2. Mecanismo de Resistência à metilina codificada pelo gene <i>mecA</i> .	19
Figura 3. Folhas e flor de <i>Cochlospermum regium</i> .	24

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA.	21
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Analysis of variance
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associado à comunidade – “Community-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico – “Deoxyribonucleic acid”
DNase	Desoxirribonuclease
EAF	Extrato aquoso das folhas
EEF	Extrato etanólico das folhas
FCBA	Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina associado ao hospital – “Hospital-Associated Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”
HCL	Ácido clorídrico – “hydrochloric acid”
LMA	Laboratório de Microbiologia Aplicada
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina - “Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a meticilina – “Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> ”
PBS	Tampão fosfato-salino – “Phosphate buffered saline”
PIA	Adesina intracelular polimérica – “Polysaccharide intercellular adhesin”
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina – “Penicillin-binding protein”
Rpm	Rotações por minuto
SPE	Substância polimérica extracelular
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico mec – “staphylococcal cassette chromosome”
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
HIV	Vírus da imunodeficiência humana – “Human immunodeficiency vírus”
TSB	Tripticaseína

TR	Tempo de retenção
TSST	Toxina da síndrome do choque tóxico – “Toxic shock syndrome toxin”
TTC	Triphenyl Tetrazolium Chloride

Cm	centímetro
g	grama
h	horas
M	molar
nm	nanômetro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
p/v	peso/volume
v/v	volume/volume
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
°C	Graus Celsius
%	porcentagem
<	Menor
>	Maior

## **Atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger frente à *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina**

### **RESUMO**

*Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista causador de uma variedade de infecções. O desenvolvimento de bactérias resistentes, como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) está associado com altas taxas de mortalidade, e tem sido um grande problema de saúde pública. No passado, MRSA era considerado um patógeno exclusivo do ambiente hospitalar, e estes foram descritos como MRSA associado à assistência hospitalar (HA-MRSA), porém nas últimas décadas esse quadro tem mudado com o surgimento de MRSA em pacientes sem história de hospitalização, conhecidas como MRSA associado à comunidade (CA-MRSA). Aliado a isto, *S. aureus* é capaz de se aderir a diversas superfícies e formar biofilme, tornando as células mais protegidas. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a isolados clínicos HA-MRSA e CA-MRSA, e a cepa de referência *S. aureus* suscetível a meticilina (MSSA) ATCC 25923. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo e as concentrações inibitória e bactericida mínimas foram determinadas após o tratamento, as células viáveis foram quantificadas. A inibição enzimática foi determinada utilizando os testes da DNase e coagulase. A atividade na formação de biofilme e em biofilme pré-formado foi determinada em microplacas de poliestireno e as células viáveis foram quantificadas após o tratamento. A quantificação de carboidratos e proteínas na matriz do biofilme foi medida por meio de um espectrofotômetro NanoDrop. Os dois extratos apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações de 125 a 500 µg/mL frente todas as cepas avaliadas, sendo o aquoso mais eficaz. Também apresentaram atividade bactericida frente todas as cepas testadas. CA-MRSA mostrou-se mais sensível aos extratos que HA-MRSA. A atividade inibitória dos extratos de *C. regium* na formação de biofilme e em biofilme maduro também foi observada, e na concentração de 2.000 µg/mL, o extrato aquoso inibiu 100% a formação do biofilme de todas as bactérias testadas. A coagulase foi reduzida nas concentrações sub-cim dos extratos. Os resultados obtidos indicam que os extratos das folhas de *C. regium* podem ser considerados fontes promissoras de novos fármacos para prevenir e combater infecções causadas por *S. aureus*.

**Palavras-chave:** MRSA, infecções hospitalares, infecções comunitárias, resistência microbiana, plantas medicinais.

## **Antimicrobial and antibiofilm activity of leaves extracts of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***

### ***ABSTRACT***

*Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen that causes a variety of infections. The development of resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with high mortality rates, and has been a major public health concern. In the past, MRSA was considered a pathogen unique to the hospital environment, and they were described as MRSA associated with hospital care (HA-MRSA), but in the last decades this has changed with the appearance of MRSA in patients with no history of hospitalization, known as community-associated MRSA (CA-MRSA). Allied to this, *S. aureus* is able to adhere to several surfaces and form biofilm, making the cells more protected. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity and antibiofilm activity of the aqueous and ethanolic extracts of *Cochlospermum regium* leaves against clinical isolates HA-MRSA and CA-MRSA and the reference strain Methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923. The antibacterial activity was evaluated by broth microdilution technique and minimal inhibitory and bactericidal concentrations were determined after treatment, viable cells were quantified. Enzyme inhibition was determined using the DNase and coagulase tests. The activity in biofilm formation and pre-formed biofilm was determined on polystyrene microplates and viable cells were quantified after treatment. The quantification of carbohydrates and proteins in the biofilm matrix was measured by means of a NanoDrop spectrophotometer. Both extracts showed antibacterial activity in the concentrations of 125 to 500 µg/mL against all strains evaluated, with the aqueous one being more effective. They also presented bactericidal activity against all strains tested. CA-MRSA was more sensitive to extracts than HA-MRSA. The inhibitory activity of *C. regium* extracts on biofilm formation and mature biofilm was also observed, and at concentration of 2,000 µg/mL, the aqueous extract inhibited 100% the biofilm formation of all the bacteria tested. Coagulase was reduced at the sub-mic concentrations of the extracts. The results indicate that extracts of *C. regium* can be considered as promising sources of new drugs to prevent and fight infections caused by *S. aureus*.

**Keywords:** MRSA, hospital infections, community infections, microbial resistance, medicinal plants.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.2 Fatores de virulência de <i>S. aureus</i>	16
2.2.1 Toxinas	16
2.2.2 Enzimas extracelulares	17
2.2.3 Formação de Biofilme	17
2.2.4 Resistência a antibióticos	19
2.2.5 MRSA associado ao hospital (HA-MRSA) e à comunidade (CA-MRSA)	21
2.3 Novas perspectivas para o tratamento de <i>S. aureus</i>	23
2.3.1 <i>Cochlospermum regium</i>	23
3 OBJETIVOS	26
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
5 APÊNDICE	35
5.1 Artigo: Atividade anti-MRSA das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger	36
6 CONCLUSÕES	56

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, conhecida por seu crescimento na forma de “cachos de uva”, e é a espécie de maior destaque do gênero *Staphylococcus* (TAYLOR & UNAKAL, 2017). Possui ampla distribuição na natureza, e também pertence à microbiota humana, sendo assim, está associada a diversas infecções oportunistas, caso haja ruptura das barreiras naturais, ou pela diminuição da resposta imunológica do indivíduo, associada com procedimentos médicos invasivos, principalmente em pacientes queimados, diabéticos, HIV-positivos, os que fazem diálise e pacientes internados em hospitais por longos períodos (FRANK et al., 2010; KARANIKA et al., 2015; MAJCHRZAK et al., 2016; PIO et al., 2016).

As infecções causadas por *S. aureus* variam de simples infecções cutâneas (impetigo, foliculite, furúnculos) a infecções invasivas, como endocardites, pneumonia, osteomielites, meningite, síndrome do choque tóxico, bacteremias, septicemia, entre outras (MOUSAVI et al., 2017; TAYLOR & UNAKAL, 2017).

O surgimento e a disseminação de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, como as resistentes a meticilina, conhecidas como MRSA (Meticilin Resistant *Staphylococcus aureus*), são motivo de grande preocupação, e frequentemente responsáveis por casos de infecções nosocomiais, apresentando elevados índices de mortalidade (AL-MEBAIRIKA, et al., 2016). No entanto, apesar de MRSA ser considerado um problema principalmente no ambiente hospitalar (HA-MRSA), os casos de infecções associadas ou adquiridas na comunidade (CA-MRSA) em pacientes sem história de hospitalização, tem crescido no mundo todo (SIDDIQUI, 2018).

Um fator importante que está relacionado com a patogenicidade de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilme (ARCHER et al., 2011). Biofilmes são comunidades de bactérias que se caracterizam pela adesão a uma variedade de superfícies, com produção de uma matriz polimérica extracelular. Essa matriz age como uma barreira protetora e de sobrevivência dos microrganismos contra agentes antimicrobianos (KAVANAUGH & RIBBECK 2012). MRSA são reconhecidos como causadores frequentes de infecções associadas ao biofilme, como por exemplo, infecções relacionadas com a formação de biofilme em cateter (CHAI et al., 2016).

Diante disso, são necessárias novas estratégias para a prevenção e tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, pois este representa um grande desafio nos ambientes

hospitalares, principalmente em infecções relacionadas com formação de biofilme e associadas com resistência a drogas antimicrobianas já existentes (MIQUEL et al., 2016).

Neste contexto, um interesse em substâncias naturais tem chamado a atenção para plantas, que são conhecidas por produzir variedades de compostos ricos em propriedades antimicrobianas (COMPEAN et al., 2014). Dentre as plantas destaca-se a espécie *Cochlospermum regium*, integrante da biodiversidade brasileira, que já vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa. *C. regium* é utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções ginecológicas, infecções da próstata, abscessos, afecções da pele, feridas internas e externas, e também no tratamento de gastrite, úlceras, cravos, espinhas e manchas da pele (NUNES et al., 2003; NUNES & CARVALHO, 2003). Dessa forma, objetivou-se determinar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de *C. regium*, frente isolados de MRSA.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*, caracterizadas por serem cocos gram-positivo, organizados em forma de cachos de uva. São imóveis, não esporuladas, mesófilas, capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura, além de se adaptar a diversas condições (FERRASSO et al., 2015; PETERS et al., 2017; REBROŠOVÁ et al., 2017). Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é dividido em 53 espécies e 28 subespécies, e dentre todas elas, *Staphylococcus aureus* é a espécie de maior interesse médico (LPNS, 2018; SINGH et al., 2016).

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo encontrado no ambiente em geral, e pode colonizar a pele e mucosas humanas, como nariz, garganta, boca e intestino. Dessa forma, a referida bactéria pode estar presente por um longo período de forma assintomática em indivíduos saudáveis, porém essa colonização predispõe a uma variedade de infecções oportunistas, caso as barreiras naturais estejam comprometidas por traumas ou cirurgias, ou pela queda de imunidade (MAJCHRZAK et al., 2016; YAMAZAKI et al., 2017).

As infecções causadas por essa bactéria podem ser leves, furúnculos, espinhas, foliculite, até infecções mais graves, como osteomielite, peritonite, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, pneumonia, endocardite, meningite, bacteremia, infecções hospitalares, entre outras (TONG et al., 2015; RAMSAY & TÖRÖK, 2017; VIERHAPPER & RADTKE, 2017; WESOLOWSKA et al., 2017).



Muitas das infecções provocadas por *S. aureus* estão relacionadas com a implantação de aparelhos e dispositivos médicos que passam através da pele, destacando-se em pacientes imunodeprimidos, como queimados, diabéticos, HIV-positivos, os que fazem diálise, bem como crianças e idosos (RICH & LEE, 2005; KARANIKA et al., 2015; PIO et al., 2016). O uso de cateteres endovenosos, por exemplo, representa um grande risco para infecções causadas por *S. aureus*, visto que este coloniza a pele e estando presente no local de inserção do cateter é capaz de chegar à circulação sanguínea, podendo levar a casos graves de bacteremia (GROTHER et al., 2010; AUSTIN et al., 2016).

Pacientes internados em hospitais por período prolongado também tornam-se vulneráveis a infecções por *S. aureus*, em razão de que estes normalmente estão imunodeprimidos, e essa bactéria se encontra presente nos ambientes hospitalares em razão de contaminação por hospedeiros assintomáticos, como pacientes, visitantes ou até mesmo profissionais da saúde (CAVALCANTI et al., 2006).

Essa patogenicidade do *S. aureus* está relacionada com seus fatores de virulência, que envolvem a produção de toxinas e enzimas extracelulares de caráter patogênico, aliado com sua capacidade de formar biofilme e adquirir resistência a antibióticos (AL-MEBAIRIKA et al., 2016; ÁGUILA-ARCOS et al., 2018).

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

### **2.2.1 Produção de Toxinas**

As toxinas produzidas por *S. aureus* estão relacionadas com muitas das síndromes clínicas causadas por esse patógeno, e dentre elas destacam-se: a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), a esfoliatina e as enterotoxinas (SANTOS et al., 2007).

A TSST-1 é conhecida como a principal causa da síndrome do choque tóxico. Geralmente está associada com uso de absorventes internos, mas também pode estar relacionada com cirurgias, uso de diafragma e infecções da pele. Os sintomas do choque tóxico são: febre, rachaduras cutâneas, descamação, hipotensão e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos. Se não for tratada adequadamente pode desenvolver choque letal (SADA et al., 2017; WILKINS et al., 2017).

A esfoliatina é a principal causadora da síndrome da pele escaldada. Provoca clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando uma infecção cutânea na qual a pele se solta e descasca (SANTOS et al., 2007; MISHRA et al., 2016).

As enterotoxinas (A, B, C, D e E) são potentes toxinas gastrointestinais, resistentes a tratamento térmico e baixo pH, e são responsáveis por intoxicação alimentar, tendo como sintomas: vômitos, diarreias, náuseas, cólicas abdominais e sudoreses (ARGUDÍN et al., 2010).

### **2.2.2 Enzimas extracelulares**

Entre as enzimas produzidas por *S. aureus*, a coagulase e a DNase são as mais conhecidas, e estão intimamente ligadas com a patogenicidade de *S. aureus* (GÜNDOGAN et al., 2006).

A coagulase é capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, formando coágulos no plasma de mamíferos. Além disso, o acúmulo de fibrina ao redor das bactérias dificulta a ação das células do sistema imunológico, impossibilitando a fagocitose por macrófagos. (SANTOS et al., 2007; BAPTISTA et al., 2016)

A DNase também está relacionada com mecanismos de defesa microbiana. Ela possui a capacidade de degradar ligações em estruturas de moléculas de DNA. Durante um processo infeccioso, os neutrófilos agem liberando fibras que auxiliam na fagocitose, e essas fibras possuem DNA na sua composição estrutural, que podem ser degradados pela DNase, impedindo dessa forma a fagocitose por neutrófilos (BRINKMANN et al., 2004; HAAS et al., 2014).

### **2.2.3 Formação de Biofilme**

Os microrganismos são encontrados em duas formas de vida: como células planctônicas (de vida livre), ou como células sésseis (biofilme) (DONLAN, 2002). O crescimento planctônico puro, como um organismo isolado, é raro, pois a maioria se desenvolve em comunidades complexas, na forma de biofilme (RICHARDS & MELANDER, 2009; HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2013).

Os biofilmes de *S. aureus* são complexos de microrganismos, envolvidos em uma matriz de substância polimérica extracelular (SPE) auto-sintetizada composta por polissacarídeos, proteínas, e DNA extracelular (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Eles se aderem irreversivelmente a diversas superfícies, sejam elas bióticas (tecidos e células animais ou vegetais) ou abióticas (superfície inerte) (GHARECHAHI et al., 2012; SANCY et al., 2015). Muitos dispositivos médicos, por exemplo, são frequentes focos de contaminação por biofilme, como cateteres intravenosos, desfibriladores cardíacos, válvulas cardíacas,

implantes cirúrgicos cosméticos, implantes ortopédicos (pinos, placas, parafusos), entre outros (ARCHER et al., 2011) (veja a Fig. 1).

O primeiro estágio na formação do biofilme é a adesão bacteriana, também chamada de adesão reversível, que acontece por interações iniciais fracas. É um processo complexo, controlado pela fisiologia do microrganismo, interações moleculares, e características físico-químicas: forças hidrodinâmicas, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. O segundo estágio também conhecido por adesão irreversível, envolve o crescimento celular e colonização através da disponibilidade de nutrientes no ambiente, que é consolidado com a produção da matriz de SPE, passando a funcionar como substrato para adesão de microrganismos colonizadores secundários. Por fim, no último estágio denominado desadesão, alguns microrganismos do biofilme maduro são desprendidos e podem contaminar novos ambientes, formando novos biofilmes (RICHARDS & MELANDER, 2009; KOKARE et al., 2009; KOSTAKIOTI et al., 2013).

Os processos de formação e desprendimento do biofilme, além da regulação de suas atividades e processos fisiológicos são controlados por um fenômeno chamado *Quorum sensing*, onde as bactérias se comunicam através de moléculas sinalizadoras (LI & TIAN 2012).

A formação de biofilmes de *S. aureus* é mediada pela produção de um polissacarídeo de superfície chamado poli- $\beta$ (1,6)-N-acetil-d-glucosamina, também conhecido como adesina intracelular polissacarídica (PIA), o qual está relacionado com os mecanismos de adesão à superfície, adesão entre as células e com a síntese da matriz polissacarídica (GÖTZ, 2002). O PIA é codificado pelos genes do operon *ica*: *icaADBC* (responsáveis pela síntese de polissacarídeos de adesão) e *icaR* (responsáveis pela regulação da expressão da síntese) (ARCHER et al., 2011).

Essa capacidade de adesão e seu crescimento na forma de biofilme caracteriza um importante fator de virulência bacteriano de *S. aureus*, contribuindo significativamente para a disseminação da resistência aos antibióticos através de adaptação genética, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme e a matriz SPE, que age como uma barreira protetora contra agentes antimicrobianos (LYNCH & ROBERTSON, 2008; LIMOLI et al., 2015). Bactérias que crescem como biofilmes são de 10 a 1000 vezes mais resistentes que aquelas em forma planctônica e até 80 % das infecções bacterianas em humanos envolvem biofilme, sendo elas associadas com o aumento da mortalidade (POTERA, 2010; LYNCH. & ROBERTSON, 2008; KUMAR et al., 2017).



**Figura 1.** Biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre um cateter.

**Fonte:** TORTORA, J. G. et al., 2012.

#### 2.2.4 Resistência a antibióticos

*Staphylococcus aureus* podem ser suscetíveis à ação de uma ampla faixa de antimicrobianos, principalmente os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as penicilinas e seus derivados e as cefalosporinas. Além disso, também podem ser sensíveis a outros grupos de antimicrobianos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrólidos e tetraciclina (KURLEND & GRINHOLC, 2012). No entanto, são motivos de preocupação médica e científica, pois apresentam a capacidade de desenvolver rapidamente mecanismos de resistência (HAABER et al., 2017).

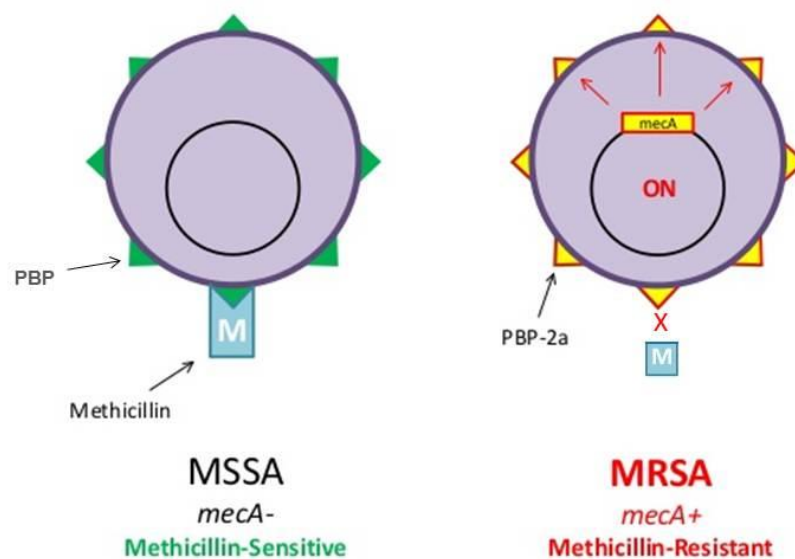
O primeiro antibiótico utilizado contra *S. aureus*, no ano de 1940, foi o  $\beta$ -lactâmico penicilina. No entanto, já em 1942, os primeiros isolados resistentes a este antibiótico apareceram, mediados pela produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que são capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, inativando-o. No final da década de 1960, aproximadamente 80% dos isolados de *S. aureus* eram resistentes a penicilina (LOWY, 2003; LAKSHMI et al., 2014).

Como alternativa, em 1959 foi criado o primeiro  $\beta$ -lactâmico sintético resistente a  $\beta$ -lactamase, a meticilina. Porém, logo após o seu lançamento no mercado, em 1961, surgiram

relatos de isolados resistentes a esse novo antibiótico. Esses foram chamados de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) (CHAMBERS & DELEO, 2009; HARKINS et al., 2017).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos agem nas células bacterianas através da inibição das proteínas ligadoras de penicilina (PBP), enzimas responsáveis pela união das cadeias peptidoglicanos para síntese da parede celular, o que impede a sua formação, com consequente lise bacteriana. Sendo assim, a resistência a metilina está relacionada com a aquisição do elemento genético denominado “cassete cromossômico estafilocócico mec” (SCCmec), compreendendo o gene *mecA*, que codifica uma PBP adicional, com baixa afinidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, conhecida como PBP2a, conferindo assim a capacidade de crescimento mesmo na presença desses antibióticos (veja a Fig. 2) (BATABYAL et al., 2012; FISHOVITZ et al., 2014).

## *mecA*-encoded Methicillin Resistance



**Figura 2. Mecanismo de Resistência à metilina codificada pelo gene *mecA*.**

Fonte: David Ha, PharmD, com modificações, 2014.

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à metilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; PBP: Proteína Ligadora de Penicilina.

As cepas resistentes à meticilina também são resistentes aos demais  $\beta$ -lactâmicos e muitas vezes a outras classes de antibióticos (NORIEGA & SEAS, 2010). Dessa forma, o uso da vancomicina é uma das principais e últimas alternativas contra infecções causadas por MRSA, porém, este antimicrobiano possui algumas limitações, como atividade bactericida lenta, baixa penetração nos tecidos, alta toxicidade, produz reações de hipersensibilidade, e, além disso, a resistência intermediária à vancomicina tem surgido entre os *staphylococcus* (KOLLLEF, 2007; DERESINSKI, 2009; TARAI et al., 2013).

MRSA é um importante patógeno de tratamento cada vez mais difícil, e as infecções causadas por este microrganismo estão relacionadas com alta morbidade e mortalidade, por este motivo a “World Health Organization” classificou MRSA como alta prioridade na lista global de bactérias resistentes aos antibióticos, que necessitam de pesquisa e desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos como antibióticos (DATTA & HUANG, 2008; SIT et al., 2017; WHO, 2017).

### **2.2.5 MRSA associado ao hospital (HA-MRSA) e a comunidade (CA-MRSA)**

Desde o seu surgimento, MRSA foram considerados um problema predominantemente hospitalar (HA-MRSA), causando infecções somente em indivíduos que apresentavam fatores de risco associados à assistência médica (CALFEE, 2017). Porém, nas últimas décadas infecções associadas ou adquiridas na comunidade em indivíduos aparentemente saudáveis (CA-MRSA), tem crescido em todo o mundo (BOSWIHI & UDO, 2018).

Existem algumas diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA em termos de principais síndromes clínicas, população em risco, tipos de *SCCmec* e susceptibilidade aos antimicrobianos (Quadro 1) (NAIMI et al., 2003; MAEDA et al., 2008; BOSWIHI & UDO, 2018). HA-MRSA está associado com bacteremia, infecções do trato respiratório, infecções ligadas a cateter ou prótese, e outras infecções invasivas em indivíduos já hospitalizados. O CA-MRSA tem sido associado com infecções de pele e tecidos moles, podendo gerar infecções mais graves como pneumonia necrosante, osteomilite e bacteremia. Os casos de infecções por CA-MRSA são identificados em grupos populacionais diversos como crianças, jovens, e pessoas que vivem aglomeradas ou que tem contato próximo umas com as outras (moradores de ruas, atletas, militares, homossexuais masculinos, encarcerados, usuários de drogas, etc.) (WATKINS, 2012).

Epidemiologicamente, isolados de MRSA são definidos como HA-MRSA se coletados depois de 48h da internação hospitalar e como CA-MRSA se coletados em pacientes ambulatoriais ou em pacientes com no máximo 48h de hospitalização, sem fatores de risco

como, procedimentos cirúrgicos, hemodiálise, hospitalização recente, uso de cateter venoso ou dispositivos intravasculares e cutâneos de longa permanência (BUCK et al., 2005). No entanto, tem se observado que clones de CA-MRSA estão sendo introduzidos nos hospitais e estão circulando como patógenos nosocomiais, e clones de HA-MRSA também estão se propagando pela comunidade (RODRÍGUEZ-NORIEGA & SEAS, 2010). Dessa forma, as designações definitivas de HA-MRSA e CA-MRSA dependem da caracterização microbiológica genética que determina os padrões de susceptibilidade bacteriana e o tipo de SCCmec que é transportado (WATKINS, 2012; MIAO, et al., 2017).

CA-MRSA transporta um SCCmec menor que confere resistência apenas aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (SCCmec tipo IV, V, VII). HA-MRSA transporta o SCCmec tipo I, II e III, que geralmente possui genes que codificam resistência a outros antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, como macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclina, mupirocina e cotrimoxazol e fluoroquinolonas (ASGHAR, 2014; ALKHARSAH et al., 2018).

**Quadro 1.** Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA

<b>Características</b>	<b>HA-MRSA</b>	<b>CA-MRSA</b>
<b>Síndromes clínicas</b>	Bacteremia, infecções do trato respiratório, infecções ligadas a cateter ou prótese, infecções invasivas em indivíduos já hospitalizados	Infecções de pele e tecidos moles, podendo gerar infecções mais graves como pneumonia necrosante, osteomielite e bacteremia
<b>População em risco</b>	Pacientes hospitalizados, pacientes cirúrgicos, hemodiálise, cateter venoso ou dispositivos intravasculares e cutâneos de longa permanência	Crianças, moradores de rua, homossexuais masculinos, usuários de drogas, militares, encarcerados e atletas.
<b>Perfil de resistência</b>	Resistência aos $\beta$ -lactâmicos e outros não $\beta$ -lactâmicos	Resistência somente aos $\beta$ -lactâmicos
<b>Tipo de SCCmec</b>	I, II e III	IV e V

Fonte: MAEDA et al., 2008.

HA-MRSA: *S. aureus* resistente à metilina associado ao hospital; CA-MRSA: *S. aureus* resistente à metilina associado à comunidade.

### 2.3 Novas perspectivas para o tratamento de *S. aureus*

O crescimento de *S. aureus* na forma de biofilme dificulta ainda mais o tratamento das infecções, principalmente quando está associado com resistência às drogas antimicrobianas já existentes (POTERA 2010). Desta forma, o interesse por novas estratégias para o controle e tratamento de *S. aureus* resistentes, principalmente na forma biofilme tem crescido nas últimas décadas (CHAMBERS & DeLeo, 2009; CERI et al., 2010).

A utilização de antimicrobianos naturais oriundos de plantas representa uma alternativa para diminuir ou inibir o surgimento e a propagação destes microrganismos. Estudos com extratos vegetais vêm sendo realizados e relatam atividade inibitória sobre microrganismos na forma planctônica e em biofilme (SÁNCHEZ et al., 2016).

O potencial antimicrobiano das plantas é o resultado da ação de um ou mais compostos presentes na sua composição química. Esses compostos são produzidos a partir do seu metabolismo secundário, e em muitos casos servem como sistema de defesa das plantas contra insetos, patógenos (fungos, bactérias e vírus) e radiação (KABERA et al., 2014). Dentre os principais grupos de compostos conhecidos por sua atividade antimicrobiana estão os compostos fenólicos, flavonóides, quinonas, taninos, cumarinas e os terpenos (COWAN, 1999; KABERA et al., 2014).

Neste contexto, os extratos vegetais são fontes ricas de uma variedade de substâncias para serem exploradas terapeuticamente, e que subsidiem a geração de produtos farmacológicos no auxílio e/ou controle de infecções.

#### 2.3.1 *Cochlospermum regium*

*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger, pertence à família Bixaceae, e ao gênero *Cochlospermum*, porém há autores que consideram Cochlospermaceae como uma família própria, apesar de não existir uma posição definitiva sobre a união ou distinção dessas duas famílias (SOUZA & LORENZI, 2005; BEHR & NASSER, 1999). É conhecido popularmente como algodãozinho-do-campo, algodão-do-campo, algodãozinho-do-cerrado e algodão-bravo, podendo ser encontrado nos campos cerrados e em cerrado típico (JOLY, 2005; SOUZA & LORENZI, 2005; BASSAN, 2004; DURIGAN et al., 2004).

Trata-se de um arbusto ou subarbusto que alcança de 0,5 até 2 m de altura e possui raiz engrossada e com caule subterrâneo (POTT, & POTT, 1994; DURIGAN, et al., 2004). Essas características conferem ao *C. regium* resistência ao fogo e ao pastejo (POTT & POTT, 1994). Suas folhas são alternadas, simples, e caracterizam-se por possuírem lobos profundos e apresentarem estípulas (SOUZA & LORENZI, 2005; JOLY, 2005). Com flores de coloração



amarelo-dourada, vistosas e grandes, o algodãozinho-do-campo possui esse nome em função de seu fruto seco, que gera sementes pilosas e com pelos brancos longos (JOLY, 2005). Seu período reprodutivo é caracterizado pela perda das folhas e o aparecimento das flores, ocorrendo nos meses de maio a setembro (veja a Fig.3) (FERRI, 1969).

Na medicina popular a raiz é utilizada no preparo de infusões, decoctos e garrafadas, para o tratamento de infecções ginecológicas, infecções da próstata, abscessos, afecções da pele, feridas internas e externas, e também no tratamento de gastrite, úlceras, cravos, espinhas e manchas da pele (NUNES & CARVALHO, 2003; NUNES et al., 2003).

Dados da literatura relatam que o extrato da raiz de *C. regium* apresenta atividade antimicrobiana frente os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e identificaram a presença de compostos fenólicos, como ácido gálico, ácido elágico, pinosinol, dihidrokaempferol-3-O- $\beta$ -glucopyranoside, dihidrokaempferol-3-O- $\beta$ -(6''-galloyl)-glucopyranoside (SOLON et al., 2012). Em relação às folhas, algumas substâncias também já foram identificadas a partir do óleo essencial, como os sesquiterpenos:  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol e viridiflorol (INÁCIO et al., 2014).

A constante utilização das suas partes subterrâneas é preocupante, pois a retirada da raiz leva a planta à morte, ocorrendo o risco da espécie ser extinta (BRATTI et al., 2013). Por esse motivo, *C. regium* está na lista de espécies medicinais prioritárias para conservação, e o número de pesquisas sobre germinação e conservação *in vitro* da espécie vem crescendo (CAMILLO et al., 2009; INÁCIO et al., 2011; INÁCIO et al., 2015).

Sendo assim, nosso grupo de pesquisa tem investigado o potencial antimicrobiano das folhas de *C. regium*, e encontraram atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato etanólico das folhas de *C. regium* contra *Escherichia coli*, *Candida tropicalis*, e *Cryptococcus gattii* (LEME et al., 2017; ALMEIDA-APOLONIO et al., 2018). Dessa forma, a utilização e avaliação das folhas de *C. regium* é uma proposta que contribui para conservação da espécie.



**Figura 3. Folhas e flores de *Cochlospermum regium*.**

Fonte: Souza, 2005.

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

#### ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente isolados de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- Avaliar a capacidade dos extratos em inibir a atividade da coagulase e DNase de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- Avaliar a atividade dos extratos na formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- Avaliar a atividade dos extratos em biofilmes pré-formados por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- Avaliar a atividade dos extratos na matriz polimérica extracelular dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGUILA-ARCOS, S.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, I.; GARAIYURREBASO, O.; GARBISU, C.; GROHMANN, E.; ALKORTA, I. Biofilm-Forming Clinical *Staphylococcus* Isolates Harbor Horizontal Transfer and Antibiotic Resistance Genes. **Frontiers in microbiology**, v. 16, p. 1-12, 2018.

ALKHARSAH, K. R.; REHMAN, S.; ALKHAMIS, F.; ALNIMR, A.; DIAB, A.; AL-ALI, A. K. Comparative and molecular analysis of MRSA isolates from infection sites and carrier colonization sites. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 17, p. 1-11, 2018.

AL-MEBAIRIKA, N. F.; EL-KERSH, T. A.; AL-SHEIKH, Y. A.; MARIE, M. A. M. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 27, p. 50-56, 2016.

ALMEIDA-APOLONIO, A.; CUPOZAK-PINHEIRO, W. J.; BERRES, V. M.; DANTAS, F. G. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, K. M. P.; CHANG, M. R. Control of *Cryptococcus Gattii* Biofilms by an Ethanolic Extract of *Cochlospermum Regium* (Schrank) Pilger Leaves. **Scientific World Journal**, v. 2018, p. 1-6, 2018.

ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M. E. *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, p. 445-459, 2011.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

ASGAR, A. H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from tertiary care hospitals. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 30, p. 698-702, 2014.

AUSTIN, E. D.; SULIVAN, S. B.; WHITTIER, S.; LOWY, F. D.; UHLEMANN, A. C. Peripheral Intravenous Catheter Placement Is an Underrecognized Source of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, p. 1-4, 2016.

BAPTISTA, I.; ROCHA, S. M.; CUNHA, A.; SARAIVA, J. A.; ALMEIDA, A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p.128-149, 2016.

BASSAN, L. Flores do Cerrado. **Editora Campo Grande, MS**, p. 37, 2004.

BATABYAL, B.; KUNDU, G. K. R.; BISWAS, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, p.65-71, 2012.

BEHR, T. V & NASSER, L. C. B. A flora do Planalto Central do Brasil – Aquarelas. **Brasília: Paralelo 15**, p.142, 1999.

BOSWIHI, S. S. & UDO, E. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. **Current Medicine Research and Practice**, v. 8, p. 18-24, 2018.

BRATTI, C.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; OLIVEIRA, A. P. A.; MARAFIGA, B.G.; FERNANDES, S. S. L. Levantamento de plantas nativas da Fazenda Azulão em Dourados – MS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p.675-683, 2013.

BRINKMANN V.; REICHARD U.; GOOSMANN C.; FAULER B.; UHLEMANN Y.; WEISS D.S.; WEINRAUCH Y.; ZYCHLINSKY A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

BUCK, J. M.; COMO-SABETTI, K.; HARRIMAN, K. H.; DANILA, R. N.; BOXRUD, D. J.; GLENNEN, A.; LYNFIELD, R. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000–2003. **Emerging infectious diseases**, v. 11, p. 1532-1538, 2005.

CALFEE, D. P. Trends in Community Versus Health Care-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, p. 1-7, 2017.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação in vitro de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 184-189, 2009.

CAVALCANTI, S. M. M.; FRANÇA, E. R.; VILELA, M. A.; MONTENEGRO, F.; CABRAL, C.; MEDEIROS, A. C. R. M. Comparative study on the prevalence of *Staphylococcus aureus* imported to intensive care units of a university hospital, Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, p.436-446, 2006.

CHAI, D.; LIU, X.; WANG, R.; BAI, Y.; CAI, Y. Efficacy of Linezolid and Fosfomycin in Catheter-Related Biofilm Infection Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Biomed Research International**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

COMPEAN, K. L. & YNALVEZ, R. A. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 8, p. 204-213, 2014.

CERI, H.; OLSON, M. E.; TURNER, R. J. Needed, new paradigms in antibiotic development. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11, p. 1233-1237, 2010.

CHAMBERS, H. F. & DELEO, F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 629-641, 2009.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-852, 1999.

DATTA, R. & HUANG, S. S. Risk of Infection and Death due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Long-Term Carriers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 176-181, 2008.

- DERESINSKI, S. Vancomycin in Combination with Other Antibiotics for the Treatment of Serious Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1072-1079, 2009.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881-890, 2002.
- DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada. **Páginas & Letras Editora e gráfica**, p. 97, 2004.
- FERRASSO, M. M.; GONZALEZ, H. L.; TIMM, C. D. *Staphylococcus hyicus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-6, 2015.
- FERRI, M. G. Plantas do Brasil - espécies do Cerrado. **Editora Edgard Blucher Ltda/Editora Universidade de São Paulo**, 1969.
- FISHOVITZ, J.; HERMOSO, J. A.; CHANG, M.; MOBASHERY, S. Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **IUBMB Life**, v. 66, p. 572-577, 2014.
- FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- GHARECHAHI, M.; MOOSAVI, H.; FORGHANI, M. Effect of Surface Roughness and Materials Composition on Biofilm Formation. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 541-546, 2012.
- GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1367-1378, 2002.
- GROTHER, C.; BELASCO, A. G. S.; BITTENCOURT, A. R. C.; VIANNA, L. A. C.; SESSO, R. C. C.; BARBOSA, D. A. Incidence of Bloodstream Infection Among Patients on Hemodialysis by central Venous Catheter. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, p. 73-80, 2010.
- GÜNDOĞAN N.; CITAK S.; TURAN E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. **Food Control**, v.17, p.389-92, 2006.
- HAABER, J.; PENADÉS, J. R.; INGMER, H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 25, p. 893-905, 2017.
- HAAS, B.; BONIFAIT, L.; VAILLANCOURT, K.; CHARETTE, S. J.; GOTTSCHALK, M.; GRENIER, D. Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 1-8, 2014.
- HARKINS, C. P.; PICHON, B.; DOUMITH, M.; PARKHILL, J.; Westh, H.; TOMASZ, A.; LENCASTRE, H.; BENTLEY, S. D.; KEARNS, A. M.; HOLDEN, M. T. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, p. 1252-1259, 2017.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, E.; CAMPO, R. D.; TOLEDANO, V.; VALLEJO-CREMADES, M. T.; MUÑOZ, A.; LARGO, C.; ARNALICH, F.; GARCÍA-RIO, F.; CUBILLOS-ZAPATA, C.; LÓPEZ-COLLAZO, E. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, p. 947-952, 2013.

INÁCIO, M. C.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Scharank). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 4999-5007, 2011.

INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; PEREIRA, A. M. S. Histochemical investigation of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. leaves and chemical composition of its essential oil. **Natural Product Research**, v. 28, p. 727-731, 2014.

INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Germination of *Cochlospermum regium* Seeds: Influence of Seed Size, Vials, Vial Sealing *In vitro*, and Substrate *In vivo*. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 6, p. 26-33, 2015.

JOLY, A. B. Botânica Introdução à taxonomia vegetal. **Companhia Editora nacional**, 13ª edição, p.484-487, 2005.

KABERA, J. N.; SEMANA, E.; MUSSA, A. R.; HE, X.; Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377-392, 2014.

KARANIKA, S.; ZERVOU, F. N.; ZACHARIOUDAKIS, I. M.; PAUDEL, S.; MYLONAKIS, E. Risk factors for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in dialysis patients: a meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, v.91, p. 257-263, 2015.

KAVANAUGH, N. L.; RIBBECK, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4057-4061, 2012.

KOLLEF, M. H. Limitations of Vancomycin in the Management of Resistant Staphylococcal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 191-195, 2007.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, p. 1-23, 2013.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 159-168, 2009.

KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 17, p. 1-9, 2017.

KURLEND, J. & GRINHOLC, M. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, p.171-184, 2012.

LAKSHMI, R.; NUSRIN, K. S.; ANN, G. S.; SREELAKSHMI, K. S. Role of beta lactamases in antibiotic resistance: a review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 5, p. 37-40, 2014.

LEME, D. E. M.; RODRIGUES, A. B.; ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; DANTAS, F. G. S.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T I. E.; MOTA, J. S.; CARDOSO, C. A. L.; OLIVEIRA, K. M. P. In vitro control of uropathogenic microorganisms with the ethanolic extract from the leaves of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.** v. 2017, p. 1-8, 2017.

LI, Y. H.; TIAN, X. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. **Sensors**, v. 12, p. 2519-2538, 2012.

LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, p. 1-30, 2015.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Science in medicine**, v. 111, p. 1265-1273, 2003.

LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Acesso em: 01 agos. 2018.

LYNCH, A. S. & ROBERTSON, G. T. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.

MAEDA, Y.; LOUGHREY, A.; EARL, J. A.; MILLAR, B. C.; RAO, J. R.; KEARNS, A.; MCCONVILLE, O.; GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P. J.; DOOLEY, J. S.; LOWERY, C. J.; SNELLING, W. J.; MCMAHON, A.; MCDOWELL, D.; MOORE, J. E. Antibacterial activity of honey against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 14, p. 77-82, 2008.

MAJCHRZAK, K.; MIERZWINSKA-NASTALSKA, E.; CHMURA, A.; KWIATKOWSKI A.; PACZEK, L.; MLYNARCZYK, G.; SZYMANEK-MAJCHRZAK, K. Comparison of Staphylococcal Flora in Denture Plaque and the Surface of the Pharyngeal Mucous Membrane in Kidney Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 48, p. 1590-1597, 2016.

MIAO, J.; CHEN, L.; WANG, J.; WANG, W.; CHEN, D.; LI, L.; LI, B.; DENG, Y.; XU, Z. Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 17-28, 2017.

MIQUEL, S.; Lagrafeuille, R.; Souweine, B.; FORESTIER, C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14, 2016.

MISHRA, A. K.; YADAV, P.; MISHRA, A. A Systemic Review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS): A Rare and Critical Disease of Neonates. **The Open Microbiology Journal**, v. 10, p. 150-159, 2016.



MOUSAVI, M. N. S.; MEHRAMUZ, B.; SADEGHI, J.; ALIZADEH, N.; OSKOUEE, M. A.; KAFIL, H. S. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in autoimmune diseases. **Microbial Pathogenesis**, v. 11, p. 503-507, 2017.

NAIMI, T. S.; LEDELL, K. H.; COMO-SABETTI, K.; BORCHARDT, S. M.; BOXRUD, D. J.; ETIENNE, J.; JOHNSON, S. K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R. N.; LYNFIELD, R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **JAMA**, v. 290, p. 2976-2984, 2003.

NORIEGA, E. R. & SEAS, C. The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 87-96, 2010.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 83-92, 2003.

NUNES, W. B. & CARVALHO, S. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in Drosophila melanogaster male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 545-549, 2003.

PETERS, J.; PRICE, J.; LLEWELYN, M. Staphylococcal and streptococcal infections. **Medicine**, p. 1-8, 2017.

PIO, D. P. M.; REINATO, L. A. F.; LOPES, L. P.; GIR, E. *Staphylococcus aureus* and the oxacillin sensitivity profile in hospitalized people with HIV/AIDS. **Journal of School of nursing USP**, v. 50, p. 614-618, 2016.

POTERA, C. ANTIBIOTIC RESISTANCE: Biofilm Dispersing Agent Rejuvenates Older Antibiotics. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p.288, 2010.

POTT, A. & POTT, V. J. Plantas do Pantanal. **EMBRAPA**, p. 320, 1994.

RAMSAY, I. D. & TÖRÖK, M. E. Skin and soft tissue infections. **Medicine**, v. 45, p. 699-706, 2017.

REBROŠOVÁ, K.; ŠILER, M.; SAMEK, O.; RŮŽIČKA, F.; BERNATOVÁ, S.; HOLÁ, V.; JEŽEK, J.; ZEMÁNEK, P.; SOKOLOVÁ, J.; PETRÁŠ, P. Rapid identification of *staphylococci* by Raman spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-8, 2017.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. & SEAS, C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 87-96, 2010.

RICH, J. & LEE, J. C. The Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection in the Diabetic NOD Mouse. **Diabetes**, v. 54, p. 2904-2910, 2005.

RICHARDS, J. J. & MELANDER, C. Controlling Bacterial Biofilms. **ChemBioChem**, v. 10, p. 2287-2294, 2009.

SADA, R.; FUKUDA, S.; ISHIMARU, H. Toxic shock syndrome due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: Two case reports and a literature review in Japan. **IDCases**, v. 8, p. 77-80, 2017.

SÁNCHEZ, E.; Morales, C. R.; CASTILLO, S.; LEOS-RIVAS, C.; GARCÍA-BECERRA, L.; MARTÍNEZ, D. M. O. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms, **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

SANCY, M.; ALBARZÚA, A.; AZÓCAR, M. I.; BLAMEY, J. M.; BOEHMWALD, F.; GÓMEZ, G.; VEJAR, N.; PÁEZ, M. Biofilm formation on aluminum alloy 2024: A laboratory study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 737, p. 212-217, 2015.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SIDDIQUI A. H.; WHITTEN R. A. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). **StatPearls Publishing**, 2018.

SINGH, C. L.; CARIAPPA, C. M. P.; DAS, N. K. Drug sensitivity pattern of various *Staphylococcus* species isolated at a tertiary care hospital. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, p. 62-66, 2016.

SIT, P. S.; THE, C. S. J.; IDRIS, N.; SAM, I. C.; OMAR, S. F. S.; SULAIMAN, H.; THONG, K. L.; KAMARULZAMAN, A.; PONNAMPALAVANAR, S. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1-14, 2017.

SOLON, S.; CAROLLO, C. A.; BRANDÃO, L. F. G. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Química Nova**, v. 35, p. 1169-1172, 2012.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, p. 407, 2005.

TARAI, R.; DAS, P.; KUMAR, D. Recurrent Challenges for Clinicians: Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin Resistance, and Current Treatment Options. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 5, p. 71-78, 2013.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus Aureus*. **StatPearls**, Publishing, 2017.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, JR, V. G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 603-661, 2015.  
TORTORA, J. G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição – Porto Alegre, 2012.

VIERHAPPER, M. F. & RADTKE, D. T. C. Staphylococcal toxic shock syndrome associated with disseminated intravascular coagulopathy leading to compartment syndrome of the lower extremity. **Burns Open**, v. 1, p. 84-86, 2017.

WATKINS, R. R.; DAVID, M. Z.; SALATA, R. A. "Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*". **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1179 – 1193, 2012.

WESOŁOWSKA, M. P.; CHMIELARCZYK, A.; CHLEBOWICZ, M.; ZIÓLKOWSKI, G.; SZCZYPTA, A.; NATKANIEC, J.; ROMANISZYN, D.; POBIEGA, M.; DZIKOWSKA, M.; KRAWCZYK, L.; KOZIÓŁ, J.; WÓJKOWSKA-MACHB, J. Virulence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infections and pneumonia in Southern Poland. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 100-104, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic. **World Health Organization**, 2017.

WILKINS, A. L.; STEER, A. C.; SMEESTERS, P. R.; CURTIS, N. Toxic shock syndrome – the seven Rs of management and treatment. **Journal of infection**, v. 74, p. 147-152, 2017.

YAMAZAKI, Y.; NAKAMURA, Y.; NÚÑES, G. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. **Allergology International**, v. 66, p. 539-544, 2017.

## 5 APÊNDICE

## Future microbiology (Fator de impacto: 3.190)

<https://www.futuremedicine.com/pb-ssets/Future%20Medicine%20Author%20Guidelines.pdf>

### Atividade anti-MRSA dos extratos das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger

**Objetivo:** Avaliar o efeito do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* sobre as células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. **Material e métodos:** Concentração inibitória e bactericida mínima, viabilidade celular e inibição da atividade enzimática foram determinados nas células planctônicas de MRSA. O efeito dos extratos sobre os biofilmes de MRSA foi avaliado por meio da quantificação de células viáveis e da matriz extracelular. **Resultados:** Valores de CIM, de 125 à 250 µg/mL, e de MBC, de 250 à 500 µg/mL, mostraram melhor atividade do extrato aquoso. Os extratos diminuíram a formação de coágulos. Além disso, os extratos demonstraram eficiência na prevenção da formação de biofilme. **Conclusão:** Os extratos de *C. regium* se destacam como alternativa promissora para a prevenção e combate de infecções por *S. aureus*.

Palavras-chave: CA-MRSA, HA-MRSA, biofilme, antibacteriano, planta medicinal.

*Staphylococcus aureus*, bactéria que coloniza a pele e mucosas de humanos, é um patógeno oportunista responsável por uma variedade de infecções, caso haja ruptura das barreiras naturais ou pela queda da imunidade [1]. As infecções por *S. aureus* são uma das principais causas de infecções nosocomiais em todo o mundo, e o surgimento de cepas resistentes a antibióticos, como as resistentes a meticilina, conhecidas como MRSA (Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*), são uma grande ameaça, devido à dificuldade de tratamento, que aumenta significativamente a taxa de mortalidade e morbidade [2-3]. A organização Mundial de Saúde (OMS) e o centro de controle de doenças afirmaram que estamos vivendo na era “pós-antibiótica” e que a crise de resistência antimicrobiana está piorando [4-5].

Embora MRSA seja considerado um patógeno comum em ambientes hospitalares, ele também tem sido observado como um patógeno emergente e problemático na comunidade [6].

Os clones responsáveis por infecções hospitalares tem sido classificados em HA-MRSA e os associados à comunidade em CA-MRSA [7].

Aliado a sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos, a formação de biofilme contribuí para o aumento da patogenicidade de *S. aureus* [8]. Bactérias que crescem como biofilme são envolvidas por uma matriz de substância polimérica extracelular, que atua como uma barreira protetora, dificultando a difusão e a eficácia de antibióticos dentro da matriz do biofilme [9].

Dessa forma, MRSA está classificado como alta prioridade na lista global de bactérias resistentes aos antibióticos, que necessitam de pesquisa e desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos como antibióticos [10]. Uma alternativa promissora que vem crescendo nos últimos anos é a utilização de antimicrobianos naturais oriundos de plantas [11-12]. O potencial antimicrobiano das plantas está relacionado com a presença de compostos bioativos, produzidos a partir do seu metabolismo secundário [13].

*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg., é uma planta integrante da biodiversidade Brasileira, conhecida popularmente como algodãozinho-do-campo e algodãozinho-do-cerrado, que pode ser encontrada nos campos cerrados ou em cerrado típico, sendo utilizada como forragem animal, planta ornamental e planta medicinal [14-16]. Sua raiz é utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções ginecológicas, infecções da próstata, abscessos, afecções da pele, feridas internas e externas, e também no tratamento de gastrite, úlceras, cravos, espinhas e manchas da pele [14,17]. No entanto, a retirada de suas raízes leva a planta à morte, deixando a espécie mais suscetível a extinções [18]. Dessa forma, nosso grupo tem investigado as folhas de *C. regium*, e recentemente mostraram que elas possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus gattii* [19-20]. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* sobre as células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

## Material e Métodos

### • Material vegetal e extração

As folhas de *Cochlospermum regium* foram coletadas na fazenda Santa Madalena, na cidade de Dourados, MS – Brasil, no ponto S 22°08'47.2"/ W 054°54'54.1". A espécie foi identificada por uma especialista, e a exsicata depositada no herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados

(UFGD), sob registro DDMS 5001. O material vegetal coletado foi seco em estufa de ar circulante a 30 °C e posteriormente triturado em moinho de facas.

Para preparo do extrato etanólico o material seco triturado foi imerso em álcool etílico (1:10 (p/v)) e deixado a temperatura ambiente com agitações a cada 24 h. Após 72 h, o extrato foi filtrado e o solvente volatilizado através de rotaevaporação à 35 °C.

Para preparo do extrato aquoso as folhas foram submetidas à infusão. Água fervente foi vertida sobre o material seco triturado (1:10 (p/v)), permanecendo em infusão até atingir a temperatura ambiente (~ 6 h). Após esse período o extrato foi filtrado, e posteriormente liofilizado.

- **Quantificação de flavonoides, fenóis e taninos.**

Uma solução de extratos (concentração de 50 µg/mL em água: metanol 8:2 v/v) foi avaliada em relação ao teor de flavonóides empregado no método descrito por Lin & Tang, 2007 [21]. O resultado foi expresso como mg de equivalentes de quercetina por mL de extrato.

Os fenóis foram avaliados com as mesmas amostras utilizadas na quantificação de flavonóides e foi empregado o método descrito por Djeridane et al., 2006 [22]. O resultado foi expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por mL de extrato.

Os taninos foram quantificados pelo método da vanilina, de acordo com o método proposto por Broadhurst e Jones (1978) e adaptado por Agostini-Costa et al. (1999) [23-24]. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina por mL de extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

- **Cromatografia líquida de alta eficiência**

Os extratos em concentração de 50 µg/mL foram solubilizados em água:metanol (8:2 v/v). Os extratos foram analisados em um sistema analítico LC (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos (DAD) monitorado em  $\lambda = 200 - 800$  nm. A coluna LC era um C-18 (25 cm x 4,6 mm; tamanho de partícula, 5 µm; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

Na análise, a taxa de fluxo e o volume injetado foram definidos como 1,0 mL min<sup>-1</sup> e 10 µL, respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22 °C. A eluição foi realizada usando água acidificada em fase móvel a 0,02% (p/v) com ácido tricloroacético (A) e acetonitrilo (B) (0 min 99% A, 5 min 95% A, 12 min 80% A, 15 min 75 % A, 18 min 63% A, 26 min 20% A e 30 min 99% A). Os padrões dos ácidos gálico e elágico

(Sigma, ~ 98%) foram preparados na concentração inicial de 100 µg/mL. As concentrações dos compostos foram determinadas por calibração externa após diluições apropriadas no intervalo de 0,10-30 µg / mL. A análise foi realizada em triplicata para cada nível de concentração de padrões e extraída e injetada no sistema cromatográfico.

- **Microrganismos**

Dois isolados clínicos de MRSA, com resistência mediada pelo gene *mecA*, foram utilizados para os testes de atividade biológica, incluindo um isolado de urina, com genótipo SCCmec IV (CA-MRSA), e um isolado de líquido peritoneal, com genótipo SCCmec I (HA-MRSA), obtidos da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), da Universidade Federal da Grande Dourados. A resistência a oxacilina foi confirmada por meio dos testes de susceptibilidade antimicrobiana utilizando o sistema automatizado Vitek<sup>®</sup>2 (BioMérieux), que também revelou que HA-MRSA é resistente a eritromicina. A resistência mediada pelo gene *mecA* foi confirmada por PCR. Uma cepa de referência, *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (MSSA) (ATCC 25923, Rockville, MD, USA) foi incluída em todos os ensaios.

- **Testes de susceptibilidade antibacteriana**

**Concentração inibitória mínima e Concentração Bactericida mínima**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, M07-A9)* [25] com algumas modificações para utilização de extrato de planta. Os extratos foram preparados e testados nas concentrações de 1,9 a 1.000 µg/mL por meio de diluição seriada em microplacas de 96 poços, inoculados a 1% (v/v) com inóculo na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL e incubados por 24h a 37°C. Para leitura visual dos resultados, foi utilizada solução de Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) a 0,1%. A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato que não apresentou crescimento visível de bactéria.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada através do plaqueamento da CIM e três concentrações acima e foi considerada a concentração em que não houve crescimento de unidades formadoras de colônia (UFCs) [26]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em momentos distintos.



### **Viabilidade das células bacterianas**

Para determinação da viabilidade das células bacterianas o teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado e após as 24h de incubação alíquotas de todos os poços foram retiradas, diluições seriadas foram realizadas (em solução salina) e plaqueadas pela técnica “*drop plate*” em ágar Müller Hinton [27]. As placas foram incubadas por 24h a 37°C. A contagem de células viáveis foi realizada e os resultados foram convertidos para Log<sub>10</sub> UFC [28]. As concentrações foram escolhidas de acordo com a CIM, até a concentração bactericida. O experimento foi realizado em triplicata.

- **Inibição da atividade enzimática**

A inibição da atividade enzimática foi determinada seguindo metodologia descrita por Silva et al., 2015 [29]. Os extratos foram dissolvidos em Caldo Soja Trypticaseína (TSB) em concentrações sub-CIM (metade, um quarto e um oitavo), simples (para o teste a coagulase) ou suplementados com 0,1% de DNA de timo de bezerro (para o teste de DNase). As soluções foram inoculadas a 1% (v/v) com inóculo na concentração de 1x10<sup>8</sup> UFC/mL, e incubadas durante 24h a 37°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas durante 30 min e o sobrenadante foi utilizado para avaliação das atividades enzimáticas.

### **Inibição da DNase**

Para avaliação da atividade da DNase foi utilizado o ágar de teste DNase (DTA). Foram perfurados poços nas placas DTA e preenchidos com 40 µl do sobrenadante. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. Para leitura do resultado, foi adicionado 1M HCL e então, o halo de degradação foi avaliado.

### **Inibição da coagulase**

Para avaliação da atividade da coagulase, foi utilizado plasma de coelho. O sobrenadante foi adicionado no plasma de coelho (1:1) e incubado a 37° C durante 24h para observação da formação do coágulo. O resultado foi avaliado em coágulo fraco, forte e moderado.

- **Avaliação da atividade antibiofilme**

### **Preparo do inóculo**

As bactérias foram cultivadas em caldo TSB sob agitação em shaker a 80 rpm durante 24h a 37° C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino

(PBS) por centrifugação a 3500 rpm. Após a lavagem, os inóculos foram ressuspensos em TSB e ajustados na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

Para determinar a atividade do extrato na formação do biofilme e em biofilme pré-formado, os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, conforme descrito por Costa et al., 2014 [30], com algumas modificações.

#### **Atividade na formação do biofilme**

O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços, com 250, 500, 1.000 e 2.000  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos de *C. regium* diluídos em TSB suplementado com 1% de glicose, adicionados simultaneamente aos poços com o inóculo a 2% (v/v). As microplacas foram incubadas sob agitação em shaker a 70 rpm durante 48 h a 37° C. Posteriormente, o meio foi aspirado e os biofilmes de *S. aureus* lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderidas. Para caracterização do biofilme foi determinado o número de UFC pelo ensaio de viabilidade celular, e o experimento foi realizado em triplicata.

#### **Atividade em biofilme pré-formado**

O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno 96 poços, com o inóculo sendo adicionado a 2% (v/v) em caldo TSB suplementado com 1% glicose. As placas foram incubadas sob agitação em shaker a 70 rpm por 48 h a 37 ° C para formação de biofilme. Após esse período o meio foi aspirado e os extratos adicionados nas concentrações de 250, 500, 1.000 e 2.000  $\mu\text{g/mL}$ . A microplaca foi incubada novamente sob agitação em shaker a 70 rpm durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, o meio foi aspirado e os biofilmes de *S. aureus* foram lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderidas. Para caracterização do biofilme foi determinado o número de UFC pelo ensaio de viabilidade celular, e o experimento foi realizado em triplicata.

#### **Ensaio de viabilidade celular**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar a atividade dos extratos na formação de biofilme e para atividade em biofilme pré-formado.

Após a formação e tratamento dos biofilmes pré-formados, como descritos nas seções anteriores, com auxílio de uma ponteira o biofilme foi removido, e as suspensões de células resultantes foram homogeneizadas em vortex durante 5 minutos para desagregar as células. Diluições seriadas de cada suspensão de células foram preparadas e plaqueadas pela técnica

“*drop plate*” em ágar Müller Hinton [27]. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. As colônias formadas foram contadas e os resultados convertidos para Log<sub>10</sub> UFC [31].

- **Quantificação de proteína e carboidrato na matriz do Biofilme**

Para análise da matriz extracelular, os biofilmes foram formados em microplacas de poliestireno de 24 poços. Um milímetro do inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) com e sem o extrato foi adicionada em cada poço como descrito anteriormente. Após 48 h as amostras de biofilme foram raspadas, ressuspensas em água ultra pura, sonicadas por 50s, e a suspensão foi submetida ao vortex durante 2 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante filtrado em filtro de nitrocelulose de 0,2 mm e armazenado a -20°C até a análise. Proteínas e carboidratos foram medidos utilizando o espectrofotômetro NanoDrop [32].

- **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da ANOVA seguidos pelos testes de Tukey e Bonferroni. Diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . As análises estatísticas e gráficos foram realizadas por meio do software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

## Resultados

- **Quantificação de compostos fenólicos, flavonoides e taninos**

Os extratos aquoso (EAF) e etanólico (EEF) das folhas de *C. regium* indicaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos (Tabela 1).

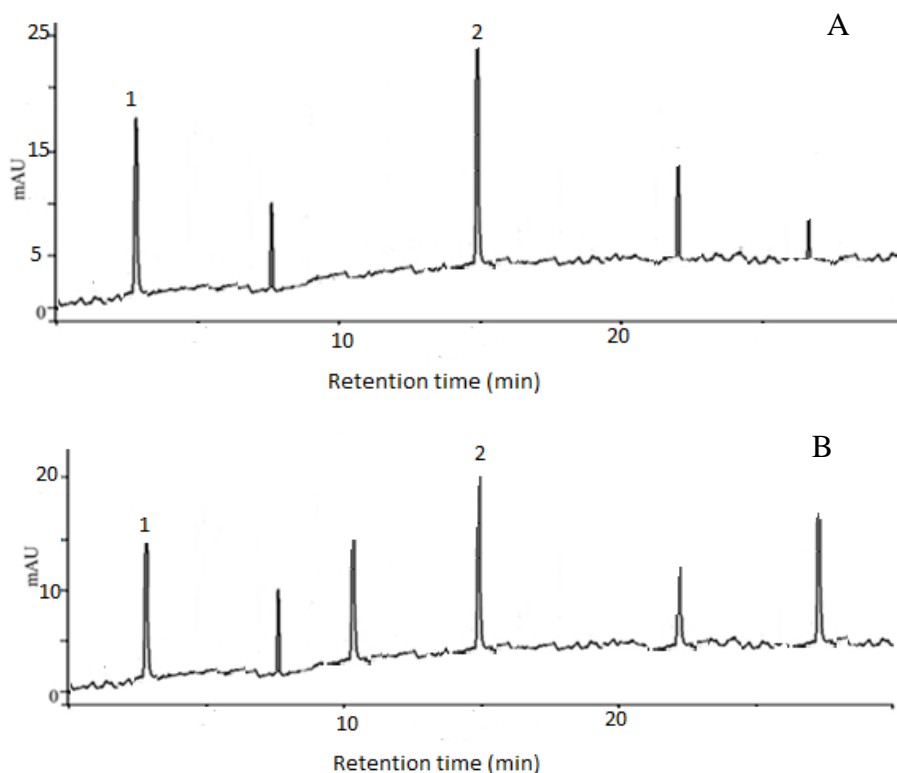
**Tabela 1-** Quantificação de flavonoides, fenóis e taninos (mg/mL).

Extratos	Compostos		Taninos (mg/g) M±SD
	Fenólicos (mg/g) M±SD	Flavonóides (mg/g) M±SD	
	EAF	196.7±0.5	
EEF	142.5±0.6	79.6±0.2	82.3±0.2

EAF: Extrato Aquoso das folhas. EEF: Extrato Etanólico das folhas. M=Média SD=Desvio padrão

- **Caracterização fitoquímica**

Foi possível identificar dois dos principais picos de substâncias, o ácido gálico (TR 3.45) e ácido elágico (TR 15.56) (Figura 1). O teor de ácido gálico e ácido elágico encontrado no EAF foi de 125.8 mg/g e 203.4 mg/g, e no EEF foi de 94.4 mg/g e 151.5 mg/g, respectivamente (Tabela 2).



**Figura 1.** Cromatograma do extrato aquoso (A) e etanólico (B) das folhas de *C. regium*.

**Tabela 2 –** Composição química (mg/mL) dos extratos de *C. regium*

Tempo de retenção (min)	Compostos	Concentração (mg/g) EAF	Concentração (mg/g) EEF
3.45	Ácido gálico	125.8	94.4
15.56	Ácido elágico	203.4	151.2

EAF: Extrato Aquoso das folhas. EEF: Extrato Etanólico das folhas.

- **Susceptibilidade antibacteriana**

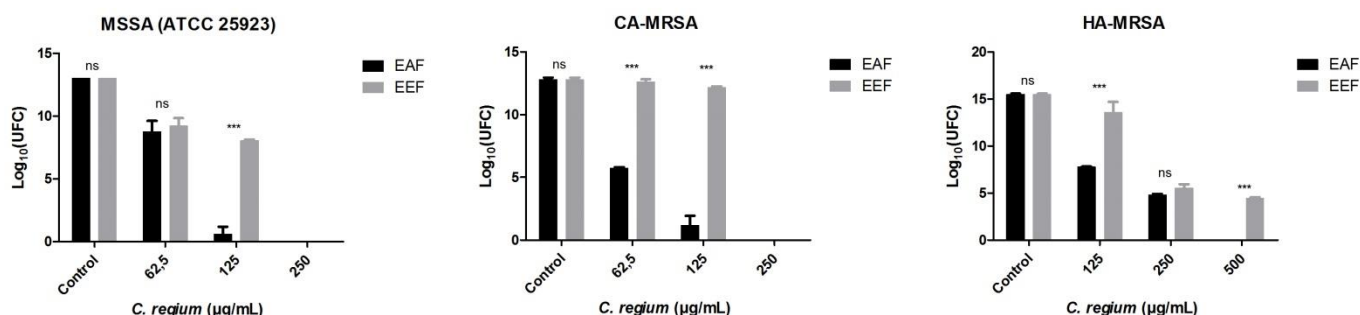
Os valores de CIM dos extratos de *C. regium* frente à cepa MSSA e os isolados MRSA são apresentados na Tabela 3. O EAF inibiu o crescimento das bactérias testadas em concentrações menores (125-250 µg/mL) que o EEF (250-500 µg/mL) frente as bactérias testadas. Os extratos apresentaram atividade bactericida na CIM ou em uma concentração acima.

A redução em logaritmos do número de células viáveis corrobora com os resultados de CIM E CBM, como mostra a Figura 2. Na concentração de 125 µg/mL o EAF mostrou redução de 12.4 log<sub>10</sub> UFC para MSSA, 11.6 log<sub>10</sub> para CA-MRSA e 7.2 log<sub>10</sub> para HA-MRSA, enquanto que o EEF reduziu 4.9 log<sub>10</sub>, 0.5 log<sub>10</sub> e 1.91 log<sub>10</sub>, respectivamente. Na concentração de 250 µg/mL, os extratos apresentaram atividade bactericida frente a cepa MSSA e o isolado CA-MRSA. A concentração de 500 µg/mL do EAF apresentou atividade bactericida contra o HA-MRSA.

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente à cepa MSSA (ATCC 25923) e os isolados clínicos MRSA.

BACTÉRIAS	EAF		EEF	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<b>MSSA (ATCC 25923)</b>	125	250	250	250
<b>CA-MRSA</b>	125	250	250	250
<b>HA-MRSA</b>	250	500	500	1000

EAF: Extrato Aquoso das folhas; EEF: Extrato Etanólico das folhas; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima;



**Fig. 2.** Quantificação de células viáveis em log<sub>10</sub> UFC da cepa MSSA (ATCC 25923) e isolados MRSA tratadas com diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *C. regium*. As barras de erro representam desvios padrão (SD). ns (P > 0.05): não houve diferença estatística; \*\*\* (P < 0.001): houve diferença estatística. (2-way ANOVA, Bonferroni test, P < 0.05). EAF: Extrato Aquoso das folhas. EEF: Extrato Etanólico das folhas.

- **Inibição da atividade enzimática**

O resultado do impacto dos extratos na atividade enzimática das bactérias está expresso na Tabela 4. Todas as bactérias foram capazes de produzir DNase e coagulase. Resumidamente, a atividade de DNase sofreu pouca ou nenhuma inibição, isso quando não houve o aumento da sua atividade conforme a diminuição da concentração do extrato. Quanto a expressão da enzima coagulase, os extratos não foram capazes de inibir a formação de coágulos nas concentrações sub-CIM, embora foi possível observar a diminuição no tamanho dos coágulos.

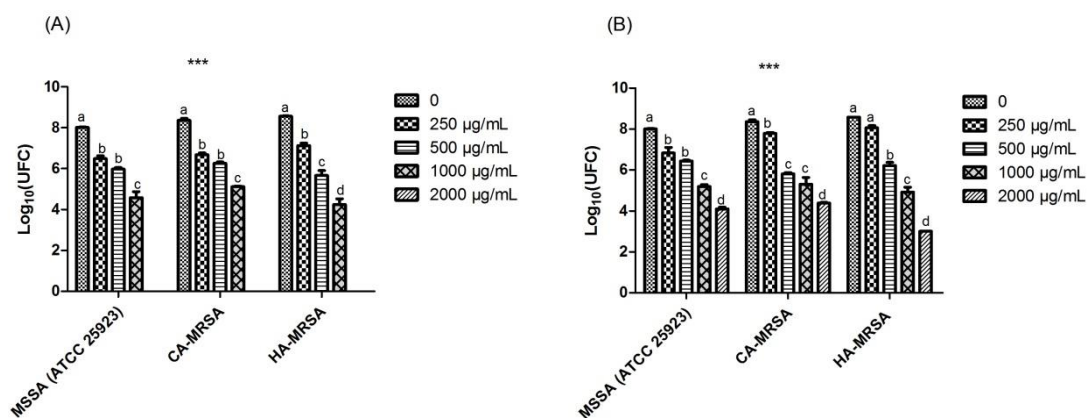
**Tabela 4.** Atividade de inibição da DNase e coagulase pelos extratos.

		DNase (halos em mm)			Coagulase		
		MSSA ATCC (25923)	CA-MRSA	HA-MRSA	MSSA ATCC (25923)	CA-MRSA	HA-MRSA
<b>Controle Positivo</b>		17 ± 0.85	16 ± 1.0	17 ± 1.0	+++	+++	+++
<b>EAF</b>	125	Na	Na	18.5 ± 1.0	Na	Na	++
<b>(µg/mL)</b>	62.5	16.6 ± 1.0	18 ± 0.1	18,5 ± 0.9	++	++	+++
	31.2	17 ± 1.0	18 ± 1.0	20 ± 0.2	++	+++	+++
	15.6	21 ± 0.9	23 ± 0.2	Na	+++	+++	Na
<b>EEF</b>	250	Na	Na	16 ± 1.0	Na	Na	++
<b>(µg/mL)</b>	125	17 ± 1.0	17 ± 1.0	16,5 ± 1.0	+	+++	+++
	62.5	18 ± 0.7	17 ± 0.8	17 ± 1.0	++	+++	+++
	31.2	18 ± 0.1	18 ± 1.0	Na	+++	+++	Na

EAF: Extrato Aquoso das folhas; EEF: Extrato Etanólico das folhas; Na: não avaliado; +++ coágulo forte; ++ coágulo moderado; + coágulo fraco.

- **Efeito de *C. regium* na inibição da formação de biofilme**

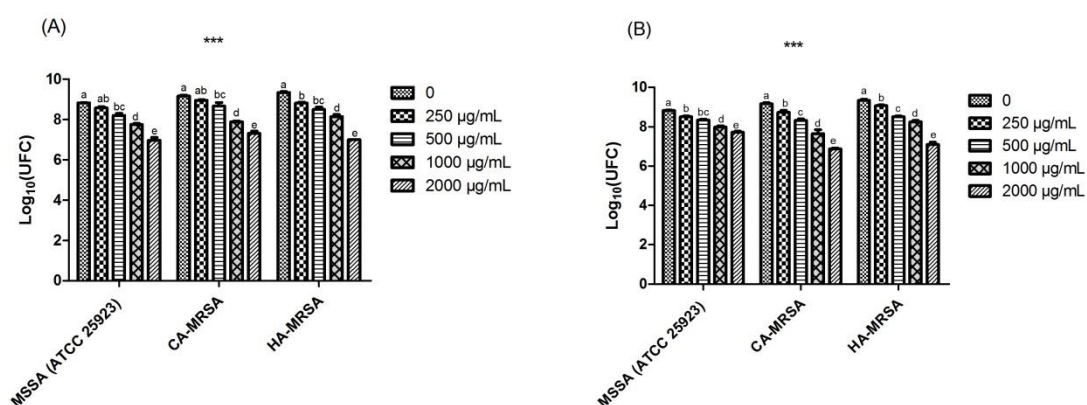
O EAF inibiu 100% a formação dos biofilmes de CA-MRSA, HA-MRSA e MSSA na concentração de 2.000 µg/mL, e na concentração de 250 µg/mL inibiu de 16,7 à 29,3% (redução de 1,4 a 2,6 log<sub>10</sub>). O EEF, na concentração de 2.000 µg/mL inibiu a formação dos biofilmes de 44 a 65% (redução de 3,8 a 5,5 log<sub>10</sub>), e na concentração de 250 µg/mL inibiu de 5,8 a 14.8 % (redução de 0,5 a 1,1 log<sub>10</sub>) (Figura 3).



**Figura 3.** Atividade do extrato aquoso (A) e etanólico (B) das folhas de *C. regium* na formação de biofilme de MSSA (ATCC 25923) e isolados MRSA. As barras de erro representam desvios padrão (SD). Letras diferentes em cada concentração representam diferença significativa entre eles pelo teste de media ( $P < 0.05$ ). \*\*\* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa. (ANOVA, e pós teste de tukey).

#### • Efeito de *C. regium* em biofilme pré-formado

A ação dos extratos de *C. regium* em biofilmes pré-formados também foi quantificada por meio do número de células viáveis (em log<sub>10</sub> UFC) (Figura 4). Os EAF e EEF exibiram atividade semelhante, na concentração de 2.000 µg/mL os extratos inibiram 25% dos isolados CA-MRSA e HA-MRSA, e para a cepa MSSA a inibição variou de 12,5 a 21% (redução de 1,1 a 1,8 log<sub>10</sub>).



**Figura 4.** Atividade do extrato aquoso (A) e etanólico (B) das folhas de *C. regium* em biofilme pré-formado de MSSA (ATCC 25923) e isolados MRSA. As barras de erro representam desvios padrão (SD). Letras diferentes em cada concentração representam diferença significativa entre eles pelo teste de media ( $P < 0.05$ ). \*\*\* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa. (ANOVA, e pós teste de tukey).

- **Quantificação de proteína e carboidrato na matriz do biofilme**

A ação dos extratos na composição da matriz dos biofilmes formados por *S. aureus* está apresentada na tabela 5. O teor de carboidrato e proteína foi avaliado na ausência e presença dos extratos.

**Tabela 5.** Efeito dos extratos na matriz dos biofilmes.

Controle Positivo		Proteína (ng/mL)			Carboidrato (ng/mL)		
		MSSA ATCC (25923)	CA-MRSA	HA- MRSA	MSSA ATCC (25923)	CA-MRSA	HA-MRSA
		0,036	0,027	0,018	0,055	0,050	0,041
<b>EAF</b>	1000	0,023	0,019	0,017	0,047	0,040	0,034
<b>µg/mL</b>	500	0,026	0,025	0,018	0,052	0,080	0,028
	250	0,024	0,029	0,016	0,054	0,070	0,040
<b>EEF</b>	2000	0,014	0,035	0,014	0,047	0,065	0,028
<b>µg/mL</b>	1000	0,010	0,025	0,018	0,031	0,038	0,036
	500	0,014	0,027	0,019	0,035	0,032	0,026
	250 µ	0,04	0,025	0,007	0,013	0,039	0,013

EAF: Extrato Aquoso das folhas. EEF: Extrato Etanólico das folhas.

## Discussão

MRSA é um grande problema de saúde pública no mundo inteiro [33]. A incidência e prevalência de infecções por MRSA têm crescido dramaticamente nas últimas décadas, e não se limita mais a ambientes hospitalares (HA-MRSA), pois os casos de infecções por CA-MRSA entre indivíduos saudáveis também vem aumentando [7].

As opções de tratamento disponíveis para as infecções causadas por MRSA são limitadas, é recomendado o uso de vancomicina e outros antibióticos glicopeptídicos, porém estes possuem algumas desvantagens, como baixa penetração nos tecidos, atividade bactericida lenta, alta toxicidade, e o surgimento de cepas com sensibilidade reduzida e até mesmo resistência a estes antibióticos [34-35]. Além disso, fatores de virulência como a formação de biofilme e a capacidade de produzir enzimas extracelulares também dificultam o tratamento [36,8]. Essa limitação de drogas antibacterianas para o tratamento de infecções causadas por MRSA tem incentivado a busca de novas estratégias de prevenção e tratamento, e os antimicrobianos naturais se destacam como uma solução interessante [10-12]

Plantas medicinais tem demonstrado potente atividade antimicrobiana, e essa atividade advém da sua capacidade de produzir uma variedade de compostos que são a fonte de substâncias antimicrobianas [13]. Nossos estudos anteriores relataram que o extrato etanólico



das folhas de *C. regium* apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana [19-20]. Nesse sentido, decidimos avaliar pela primeira vez a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato aquoso e etanólico das folhas de *C. regium* contra isolados clínicos de MRSA.

Dentre os compostos produzidos pelas plantas com propriedades antimicrobianas reconhecidas, estão os compostos fenólicos, flavonoides e taninos [37]. O EAF apresentou uma maior concentração de compostos fenólicos e flavonóides que o EEF, e também se mostrou mais eficaz, e é possível que essa diferença no teor dos compostos, seja, pelo menos, parcialmente responsável pelas diferenças observadas. Além disso, foram identificados em ambos os extratos os compostos ácido gálico e ácido elágico, que podem ser a principal razão da capacidade antibacteriana desses extratos contra *S. aureus*. Trabalhos recentes com compostos puros mostraram que o ácido gálico e ácido elágico são muito eficazes contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, incluindo *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina [38-41].

Primeiramente avaliamos a susceptibilidade planctônica de CA-MRSA e HA-MRSA aos extratos (tabela 2). Nossos resultados mostraram que os extratos inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas, com uma CIM variando de 125 a 500 µg/mL, e foram bactericida na concentração da CIM ou em uma concentração acima. Estudos anteriores também mostraram a ação de extratos frente MRSA, com MIC de 12.500 a 25.000 µg/mL, e comparando com os nossos resultados observamos que nossos extratos chegam a ser de 50 a 200 vezes mais eficazes [29,42]. É importante destacar, que o EAF mostrou maior eficiência sobre as bactérias que o EEF, e os extratos aquosos têm a vantagem de serem facilmente manipulados e utilizados pela população geral. Para determinar a viabilidade das células bacterianas foi determinado o número de unidades formadoras de colônias. Os resultados revelaram que na CIM, embora nem todos foram bactericida, os extratos reduziram 95-100% das células viáveis de MSSA (ATCC 25923), 91-100% das células viáveis de CA-MRSA e 68-71,4 % das células viáveis de HA-MRSA. Como esperado, CA-MRSA se mostrou mais sensível aos extratos que HA-MRSA, visto que este é susceptível a outras classes de antibióticos não β-lactâmicos, enquanto o HA-MRSA é frequentemente resistente a estas [43].

Além de mostrar o efeito dos extratos contra células planctônicas de isolados de MRSA, este trabalho também avaliou o efeito dos extratos sobre as características de virulência de isolados de MRSA. A patogenicidade de *S. aureus* está intimamente relacionada com a produção da coagulase, que é capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, formando coágulos no plasma de mamíferos, e além disso, o acúmulo de fibrina ao redor das bactérias

dificulta a ação das células do sistema imunológico, impossibilitando a fagocitose por macrófagos [44]. O resultado do impacto dos extratos na atividade enzimática das bactérias (tabela 3) mostra que na presença dos extratos houve uma diminuição na formação de coágulos, indicando uma redução na atividade da enzima. Portanto, os EAF e EEF, apresentam um efeito protetor contra este fator de virulência de *S. aureus*.

A capacidade que *S. aureus* tem de se aderir a diversas superfícies e crescer na forma de biofilme caracteriza outro importante fator de virulência, contribuindo significativamente para a permanência da bactéria no ambiente e o aumento da resistência aos antimicrobianos [8,45]. Observou-se que os extratos de *C. regium* foram capazes de inibir a formação de biofilme (Figura 3) e reduzir os biofilmes pré-formados (Figura 4) de MSSA (ATCC 25923) e isolados clínicos de MRSA. É importante destacar que o EAF na concentração de 2.000 µg/mL, inibiu 100% a formação de biofilme de todas as bactérias. Na redução de biofilmes pré-formados, os resultados mostraram um potencial de atividade inibitória menor (12,5-25%) do que quando o extrato foi exposto juntamente com as bactérias no processo de formação dos biofilmes. Bazargani & Rohloff (2016) [46] também encontraram essa maior resistência do biofilme pré-formado, quando relataram a inibição de 72.3% na formação de biofilme de *S. aureus* tratado com extrato de coentro, enquanto o extrato não mostrou atividade contra o biofilme pré-formado. Alguns fatores são responsáveis por essa dificuldade que antimicrobianos tem de atuar e destruir biofilmes já estabelecidos, como a densidade, o estado fisiológico das células e a matriz extracelular, que age como uma barreira protetora e reduz a penetração do extrato no biofilme [47]. Observamos que o teor de carboidrato e proteína, componentes da matriz do biofilme, foi reduzido no processo de formação de biofilmes quando incubados na presença dos extratos de *C. regium*. A presença do composto ácido gálico nos extratos (203.4 mg/mL no EAF e 151.2 mg/mL no EEF), pode ter interferido na regulação genética do processo de formação de biofilme, reduzindo a expressão de genes responsáveis pela produção de polissacarídeos da matriz do biofilme de *S. aureus* [48].

### **Conclusão e futuras perspectivas**

Este estudo mostrou que os extratos das folhas de *C. regium* são potentes agentes antibacterianos com efeito em células planctônicas e biofilmes de *S. aureus* resistente à meticilina associado ao hospital e a comunidade. Este é um dado muito promissor, visto que MRSA é um microrganismo de alta prioridade na lista global de bactérias resistentes aos antibióticos, que necessitam de pesquisa e desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos. Dessa forma, nossos resultados sugerem os extratos das folhas de *C. regium* como uma

alternativa promissora para a prevenção e auxílio no tratamento de infecções associadas ao biofilme causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

### **Divulgação de interesses financeiros e concorrentes**

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul).

### **Pontos do resumo**

- O extrato aquoso (EAF) e etanólico (EEF) das folhas de *C. regium* exibem potente atividade antibacteriana contra *S. aureus* resistente à metilina (MRSA).
- O EAF mostrou-se mais eficaz que o EEF.
- CA-MRSA mostrou-se mais sensível aos extratos que HA-MRSA.
- Os extratos reduziram a formação de coágulos.
- Os extratos foram mais ativos na inibição da formação do biofilme do que em biofilmes pré-formados.
- Os extratos reduziram o teor de carboidrato e proteína da matriz extracelular do biofilme.
- O EAF e EEF são alternativas promissoras para a prevenção e auxílio no tratamento de infecções associadas ao biofilme causadas por MRSA.

### **Referências**

Trabalhos de nota especial foram destacados como:

- de interesse; •• de considerável interesse

- 1 Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus*. StatPearls Publishing (2018)
- 2 Al-mebairika NF, El-kersh TA, Al-sheikh YA, Marie MAM. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Rev. Med. Microbiol.* 27(2), 50-56 (2016).
- 3 Calfee DP. Trends in Community Versus Health Care-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 19(12), 1-7 (2017).

- 4 Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States (2013). [www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf](http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf)
- 5 World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance (2014). [www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/](http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/)
- Excelente relatório para entender a resistência antimicrobiana global
- 6 Boswihi SS. & Udo EE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Curr. Med. Res. and Prac.* 8 (1), 18-24 (2018).
- Excelente artigo para entender as infecções por MRSA
- 7 Siddiqui AH, Whitten RA. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). StatPearls Publishing, (2018).
- 8 Águila-Arcos S, Álvarez-Rodríguez I, Garaiurrebaso O, Garbisu C, Grohmann E, Alkorta I. Biofilm-Forming Clinical *Staphylococcus* Isolates Harbor Horizontal Transfer and Antibiotic Resistance Genes. *Front. Microbiol.* 8 (2018), 1-12, 2017.
- 9 Kavanaugh NL, Ribbeck K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (11), 4057-4061, 2012.
- 10 World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic. *World Health Organization*, 2017.
- 11 Compean KL & Ynalvez RA. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *J. Med. Plants Res.* 8 (5), 204-213 (2014).
- Excelente artigo para entender o potencial do extrato de plantas
- 12 Gutierrez-del-río I, Fernández J, Lombó F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1-26 (2018).
- 13 Barbier R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez, E, Nabavi SF, Nabavi, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol. Research.* 196, 44-68 (2017).
- 14 Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bra. Farmac.* 13 (2), 83-92 (2003).

- 15 Solon S, Brandão LFG, Siqueira JM. O gênero *Cochlospermum* Kunth com ênfase nos aspectos etnobotânicos, farmacológicos, toxicológicos e químicos de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger,. *Rev. Elet. Farmácia*. 6 (3), 1-22 (2009).
- 16 Batista PF, Costa AC, Megguer CA, Lima JS, Sales JF. Overcoming dormancy and characterization of germination in Cerrado 'algodãozinho' seeds treated with dimethyl sulphoxide. *S. Afr. J. Bot.* 92, 89–93 (2014).
- 17 Nunes WB, Carvalho S. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. *Genet. Mol. Biol.* 26 (4), 545-549 (2003).
- 18 Bratti C, Vieira MC, Zárate NAH, Oliveira APA, Marafiga BG, Fernandes SSL. Levantamento de plantas nativas da Fazenda Azulão em Dourados – MS. *Rev. Bras. Pl. Med.* 15 (4), 675-683 (2013).
- 19 Leme DEM, Rodrigues AB, Almeida-Apolonio AA, Dantas FGS, Negri M, Svidzinski TIE, Mota JS.; Cardoso CAL.; Oliveira KMP. *In vitro* control of uropathogenic microorganisms with the ethanolic extract from the leaves of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* v. 2017, 1-8 (2017).
- 20 Almeida-Apolonio A, Cupozak-pinheiro WJ, Berres VM, Dantas FGS, Svidzinski TIE, Oliveira KMP, Chang MR. Control of *Cryptococcus Gattii* Biofilms by an Ethanolic Extract of *Cochlospermum Regium* (Schrank) Pilger Leaves. *ScientificWorldJournal*. 2018, 1-6, (2018).
- 21 Lin JY, Tang CY, Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 101 (1), 140-147, (2007).
- 22 Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97 (4), 654-660, (2006).
- 23 Broadhurst RB, Jones WT. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food. Agric.* 29, 788-794 (1978).
- 24 Agostini-Costa TS, Garruti DS, Lima L, Freire S, Abreu FAP, Feitosa T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. *Boletim CEPPA*. 17 (2), 167-176, (1999).
- 25 Clinical and Laboratory Standards Institute. M7-A9 “*Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*”; Approved Standard (9rd Edition), 32 (2012).

- Excelente guia para entender a técnica do MIC.

26 Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M. Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2), 1426-1436 (2012).

27 Donegan K, Matyac C, Seidler R, Porteous A. Evaluation of methods for sampling, recovery, and enumeration of bacteria applied to the phylloplane. *App. Environ. Microbiol.* 57, 51-56 (1991).

28 Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Carvalho AM, Henriques M, Silva S. Plants used in folk medicine: The potential of their hydromethanolic extracts against *Candida* species. *Ind. Crops. Prod.* 66, 62-67 (2015).

29 Silva S, Costa EM, Costa MR, Pereira MF, Pereira JO, Soares JC, Pintado MM. Aqueous extracts of *Vaccinium corymbosum* as inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Food Control.* 51, 314-320 (2015).

30 Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydr. Polym.* 101 (30), 1081-1086 (2014).

31 Monteiro DR, Silva S, Negri M, Goroup LF, Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses.* 56 (6), 672-680 (2013).

32 Capoci IRG, Bomfim-Mendonça PS, Arita GS, Pereira RRA, Consolaro MEL, Bruschi ML, Negri M, Svidzinski TIE. Propolis Is an Efficient Fungicide and Inhibitor of Biofilm Production by Vaginal *Candida albicans*. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2015, 1-9 (2015).

33 Oh E, Bae J, Kumar A, Choi H, Jeon B. Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 52 (1), 96-99, 2018.

34 Kollef MH. Limitations of Vancomycin in the Management of Resistant Staphylococcal Infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (45), 191-195 (2007).

35 Bamgbola O. Review of vancomycin-induced renal toxicity: an update. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 7 (3), 136-147 (2016).

- 36 Al-Mebairika NF, El-Kersh TA, Al-Sheikh YA, Marie MAM. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Rev. Med. Microbiol.* 27 (2), 50-56 (2016).
- 37 Compean KL, Ynalvez RA. Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Res. J. Med. Plan.* 8 (5), 204-213 (2014).
- 38 Loo, WT, Jin LJ, Cheung MNB, Chow LWC. Evaluation of Ellagic acid on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (25), 3938-3943 (2010).
- 39 Bindu I, Jayachandran VP, Elcey CD. Evaluation of Antistaphylococcal Activity of Ellagic Acid Extracted from *Punica granatum* Fruit Peel on MRSA. *Int. J. Curr. Microb. App. Scie.* 5 (2), 245-253 (2016).
- 40 Fu L, Lu W, Zhou X. Phenolic Compounds and In Vitro Antibacterial and Antioxidant Activities of Three Tropic Fruits: Persimmon, Guava, and Sweetsop. *Biomed. Res. Int.* 2016, 1-9 (2016).
- 41 Chew YL, Mahadi AM, Wong KM, Goh JK. Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth. And their mechanism of antibacterial activity. *BMC Complement. Altern. Med.* 18 (1), 1-9 (2018).
- 42 Goudarzi M, Azimi H. Antimicrobial Activity of *Peganum harmala* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains and Assessment of Its Cytotoxicity Effect on HEK-293 Cells. *Int. J. Infect. Dis.* 4, 1-5 (2017).
- 43 Kong EF, Johnson JK, Jabra-Rizk MA. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *Plos. Pathog.* 12 (10), 1-7 (2016).
- 44 Baptista I, Rocha SM, Cunha A, Saraiva JA, Almeida, A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.* 36, 128-149 (2016).
- 45 Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 307 (8), 481-489 (2017).
- 46 Bazargani MM & Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control.* 61, 156-164 (2016).
- 47 Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol.* 7 (592), 1-14 (2016).

48 Liu M, Wu X, Li J, Liu L, Zhang R, Shao D, Du X. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food control*. 73, 613-618 (2017).



## 6 CONCLUSÕES

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou atividade antimicrobiana das folhas de *C. regium* contra *E. coli*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus gattii*, e agora contra MRSA, demonstrando que as folhas de *C. regium* possuem resultados promissores em relação ao potencial antimicrobiano e antibiofilme contra microrganismos patogênicos.