



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE
CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA – VITÓRIA DA CONQUISTA

Programa de Pós-Graduação em Biociências

**Atividade antimicrobiana de *Cenostigma cf. macrophyllum*
(Leguminosae) contra isolado clínico de *Staphylococcus aureus*
resistente a antibiótico**

Discente: Geysa Silva Santos

Orientadora: Regiane Yatsuda

Coorientadora: Mariluze Cruz

Área de Conhecimento/CNPq: Ciências Biológicas

Vitória da Conquista, BA

15 de Outubro de 2013

RESUMO

O mau uso de antimicrobianos tem exigido a descoberta de novos compostos capazes de eliminar esses patógenos e/ou seus fatores de virulência. Esse trabalho avaliará *in vitro* se o extrato etanólico e frações das folhas da *Cenostigma cf. macrophyllum* (CMF) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a antimicrobianos isolado de hospital público de Vitória da Conquista, Bahia, apresenta propriedade antimicrobiana. Será preparado o extrato etanólico bruto das folhas da CMF e partição com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) para obtenção das frações a serem testadas. As frações ativas serão analisadas quanto ao perfil cromatográfico. A CMF será avaliada em testes de CIM e CBM, no ensaio de inibição da formação do biofilme de 24h por marcação com cristal violeta e análise da viabilidade celular por MTT. Serão utilizados Vancomicina e Oxacilina como antibióticos padrão. Como controle negativo, será utilizado BHI caldo (CIM e CBM) ou TSB + Glicose 1% (Biofilme), inóculo e etanol a 10%. Os microrganismos utilizados nos testes serão uma cepa padrão resistente a oxacilina e um isolado clínico 16A resistente a oxacilina, confirmado pelo teste de antibiograma e que possui o gene *mecA*. Todos os testes serão realizados em três experimentos em triplicata. A análise estatística será realizada por teste ANOVA de uma via, abordagem paramétrica, seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett, com $p < 0,05$.

Palavras-chave: Resistência; *Staphylococcus aureus*; Plantas medicinais; *Cenostigma cf. macrophyllum*; atividade antimicrobiana; atividade antibiofilme.

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

As doenças infecciosas constituem a maior causa de morte em todo o mundo, sendo as infecções bacterianas contribuintes significativos para esta alta taxa de mortalidade (Rasko & Sperandio, 2010). Além disso, o mau uso dos fármacos para tratamento dessas morbidades concomitante à alta habilidade de mutação desses microrganismos têm restringido as alternativas de cura das mesmas.

A resistência a antimicrobianos é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a maior ameaça à saúde humana, nos últimos anos. Com o intuito de controlar a ocorrência e disseminação desse problema, a Organização elaborou um complexo plano de ação baseado no tema “Sem ação hoje, sem cura amanhã”. O plano foi formulado com diversos objetivos, entre eles, o de reforçar a atuação dos sistemas de vigilância para monitorar o uso dos antimicrobianos e o encorajamento da descoberta de novos agentes ativos (Abreu *et al.*, 2012).

No Brasil, os primeiros esforços têm surgido na tentativa de prevenir a resistência a antimicrobianos e evitar o aumento desta. Com a finalidade de normalizar a utilização dessas substâncias, o Ministério da Saúde sancionou a Resolução da Diretoria Colegiada de número 44, de 26 de Outubro de 2010, atualizada pela de número 20, de 5 Maio de 2011, que regulamentam o controle desses medicamentos, uso dos mesmos sob prescrição médica, seja de forma isolada ou em associação.

Apesar do aumento da resistência e da falta de antimicrobianos efetivos, estudos apontam que as indústrias farmacêuticas têm diminuído seus programas de pesquisa de agentes anti-infecciosos. Nos últimos 20 anos a US FDA (United States Food and Drug Administration - Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos) registrou um decréscimo de 56% na aprovação de novos agentes antibacterianos em todo o mundo. Em 2004, de 506 fármacos em desenvolvimento entre as maiores companhias farmacêuticas e biotecnológicas em todo o mundo, somente 6 possuíam essa ação terapêutica (Spellberg *et al.*, 2004). A atenuação de investimentos na descoberta de novos antimicrobianos é, em parte, explicada pelo fato que, um medicamento leva cerca de 10-15 anos para ser lançado no mercado (Simões *et al.*, 2007), em contraste com a rápida habilidade desses patógenos se tornarem inertes ao tratamento que faz com que aquele fármaco se torne obsoleto em pouco tempo de uso, não permitindo assim que a indústrias reponham os extensos gastos que foram necessários para realização da pesquisa (Spellberg *et al.*, 2004).

Recentemente, muitas alternativas têm sido investigadas baseadas na inibição de fatores de virulência ao invés da inibição do crescimento bacteriano. Dessa forma, a pressão exercida sobre o patógeno é menor, fazendo com que ele não seja tão estimulado a desenvolver mecanismos de resistência, uma vez que os fatores de virulência não são tão essenciais para a sobrevivência bacteriana como a síntese proteica, por exemplo (Rasko & Sperandio, 2010). Por isso, a busca por novas estratégias, como a inibição da formação do biofilme para combater esse patógeno, merece enfoque, uma vez que se trata de um mecanismo de virulência de grande potencial para a bactéria fornecendo-a a proteção contra a ação dos antimicrobianos.

Staphylococcus aureus

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo que possui uma habilidade excepcional de adquirir resistência a muitos grupos de antimicrobianos como as tetraciclínas, macrolídeos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Gibbons, 2008). Esta espécie pertencente à família Micrococcaceae caracteriza-se como um coco gram-positivo que se organiza de forma semelhante a cachos de uva, com colônias de aspecto dourado em meio ágar - de onde deriva sua nomenclatura, são imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, se desenvolvem em temperaturas variando entre 18 a 40°C, são catalase positivo, coagulase positivo e apresentam alta tolerância em ambientes salinos (Trabulsi, 2005). É um organismo comensal com habilidade de desenvolver-se na pele e cabelo humano, e está comumente relacionado a morbidades que vão desde simples infecções em feridas, desordens vinculadas à contaminação de alimentos, às mais preocupantes condições que ameaçam a vida como a pneumonia necrotizante, endocardite e bacteremia (Yee-Guardino *et al.*, 2008; Millar *et al.*, 2008).

O *S. aureus* resistente a meticilina, conhecido em todo o mundo como MRSA, designa espécies de *S. aureus* resistente às penicilinas em geral, uma das bactérias conhecidas como responsável por muitas infecções adquiridas em hospital, e mais tardiamente, na comunidade. Este microrganismo surgiu em 1960, somente um ano após a meticilina ter sido introduzida no tratamento de doenças infecciosas (Jevons, 1961). Uma das mais importantes particularidades dele é a aquisição da resistência a β -lactâmicos, em especial, a meticilina e oxacilina, através da expressão da proteína de ligação à penicilina 2' (PBP2 ou PBP2a) codificada pelo gene *mecA* (O'Hara *et al.*, 1987).

O *S. aureus* possui uma gama de fatores de virulência o que dificulta sua eliminação no organismo afetado. Algumas dessas estratégias são a estrutura de sua cápsula, presença de ácidos teicóicos, proteína A, leucocidina Panton-Valentine, liberação de exoproteínas como enterotoxinas, hemolisinas, toxina 1 da síndrome choque tóxico e, entre outros, a capacidade de se organizar em biofilme (Koszczol *et al.*, 2006; Trabulsi, 2005).

Cerca de 150 milhões de dispositivos intravasculares, como cateteres, cardiovasculares, como marca-passos, cimentos ósseos, e outros são implantados por ano nos Estados Unidos, e o tratamento de infecções em pacientes com uso desses dispositivos tende a ser mais difícil, pois requer tratamento a longo prazo com antimicrobianos e, frequentemente necessitam de intervenção cirúrgica. Dois terços das infecções em implantes são causadas por estafilococos (O'Grady *et al.*, 2011).

Uma das razões de frequente ocorrência de infecções em pacientes com implantes é devido ao fato de que em regiões carentes de circulação como tais, os estafilococos estão livres para crescer, se espalhar, e formar uma resistente estrutura de biofilme (Kiedrowski & Horswill, 2011).

Ao serem implantados, esses dispositivos são revestidos com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, incluindo o fibrinogênio, a fibronectina e colágeno. O *S. aureus* possui numerosas proteínas ligadas à superfície da parede celular, referidas como componentes da superfície microbiana que reconhecem os componentes de matriz adesiva, que contêm domínios para as proteínas da matriz, dessa forma, iniciam a aderência do biofilme e o seu desenvolvimento e amadurecimento (Foster & Hook, 1998).

O biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos incorporada em uma matriz polissacarídica, aderida a uma superfície (Carpentier e Cerf, 1993). As bactérias em biofilmes são geralmente mais resistentes ao estresse ambiental, como a presença dos antimicrobianos, do que na sua forma de vida livre devido a uma série de mecanismos auxiliares disponíveis quando estão organizadas dessa maneira (Costerton *et al.*, 1987).

Plantas medicinais

As plantas representam uma fonte atraente e renovável de antimicrobianos com muitos estudos demonstrando o potencial terapêutico dos produtos fitoquímicos como alternativas ou potenciadores de antibióticos (Abreu *et al.*, 2012). A rica diversidade

química das plantas, juntamente com menor custo na pesquisa, facilidade de manuseio e preparo de extratos, além do conhecimento etnofarmacológico, muitas vezes associado ao uso das mesmas, faz-lhes uma fonte potencial de agentes antimicrobianos e agentes modificadores de resistência.

Na disputa pela sobrevivência ela busca maneiras de se defender através de processos que envolvem a produção e liberação de metabólitos secundários no ambiente que a cerca, tanto como um meio de defesa contra patógenos potenciais quanto como tentativa de se estabelecer frente às espécies competidoras. Se visto pela ecologia química, a produção de alguns desses compostos seria voltada para as substâncias antimicrobianas que limitam a capacidade de microrganismos produzirem os elementos necessários para a expressão dos seus fatores de virulência e colonização bem sucedida (Quave *et al.*, 2011).

No Brasil, o mercado de fitomedicamentos atingiu, em 2001, cerca de US\$ 270 milhões correspondendo a 5,9% do mercado brasileiro de medicamentos, sendo maior que a comercialização dos medicamentos genéricos, cerca de R\$ 226 milhões (5% do mercado global brasileiro) (Calixto, 2003).

Além disso, o nosso país encerra a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas quase 19% da flora mundial (Giulietti *et al.*, 2005) que coloca o país em uma posição estratégica para desenvolver uma exploração racional e sustentada de novos metabólitos de valor terapêutico (Basso *et al.*, 2005). Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem atualmente valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, sendo que é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos que reside sua maior potencialidade (Calixto, 2003).

A Caatinga representa a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional (Agra, 2007), o que conseqüentemente, leva à presença de muitas espécies endêmicas, se tornando assim, atraente fonte para a pesquisa de novos compostos terapêuticos. As plantas medicinais da Caatinga são uma parte integrante da cultura dos residentes e a informação sobre essas erva é passada de geração em geração (Agra, 2007), perpetuando o uso medicinal das mesmas.

Cenostigma cf. macrophyllum

A *C. cf. macrophyllum*, (Leguminosae Caesalpinioideae Caesalpinieae) pertence a um gênero endêmico do Brasil. Do grego, ceno = vazio, e stigma, aparentemente

referindo-se ao estigma em câmaras, crateriforme (não sólido). É conhecida popularmente como caneleiro, inharé (Bahia); canela-de-veado, caneleiro (Ceará); cássia-rodoviária, fava-docampo, faveira, favela, mangiribá (Goiás); caneleira, pau-prezinho, pau-preto (Maranhão); fava de viado, maraximbé (Mato Grosso); canela-de-velho, Caneleiro (Piauí). A *C. cf. macrophyllum* se apresenta na forma de arbustos de 1-4 m de altura ou árvores medindo entre 5-20 m, tronco com 30-55cm de diâmetro, densa copa chegando a 5m de largura, preenchida por folhas compostas por folíolos paripinados e flores de cor predominantemente, amarela, com algumas vermelhas ou laranjas, entre as de cor padrão, lembrando a orquídeas, dispostas em inflorescência na forma de rácemo. Ocorre em habitats como cerrado, cerrado arborizado, cerradão, florestas, caatinga, e em mata de transição encontradas na Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Paraná, Piauí, Pernambuco, Tocantins, e é cultivada no Rio de Janeiro (Warwick & Lewis, 2009).

A Canela de Velho é muito utilizada como planta ornamental, em paisagismo urbano e de parques, chegando a ser relatada como árvore símbolo da cidade de Terezina, no Piauí. A madeira é usada para construção, marcenaria, como carvão e lenha (Lorenzi, 1998).

Na etnofarmacologia as cascas do caule, folhas e flores desta espécie são usadas como espasmolíticas (Aguilar *et al.*, 1997), doenças estomacais e intestinais (Silva *et al.*, 2007), enxaqueca (Nascimento & Conceição, 2011).

Estudos relatam diversas atividades biológicas da *C. cf. macrophyllum*, como propriedade antiulcerogênica (Aguilar *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2002), anti-inflamatória (antiedematogênica) (Almeida *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1999), antioxidante com relação significativa com fenóis totais (Souza *et al.*, 2007) e antimicrobiana (Sousa *et al.*, 2007).

Quanto à sua constituição química, as plantas da família Caesalpiniaceae são constituídas predominantemente por flavonóides como bergenina, ácido gálico, metilgalato, ácido elágico, quercetina, 3-O- β -D-glucopiranosídeo da quercetina, 3-O-(6"-O-galoil)- β -D-glucopiranosídeo da quercetina(telimosídeo), 3-O-(6-O-E-p-coumaroil)- β -D-glucopiranosídeo da quercetina (helicrisosídeo), agatisflavona e vitexina (Alves *et al.*, 2012). Triterpenóides, diterpenóides, esteróides, antraquinonas taninos, polissacarídeos e lipídios também já foram relatados. Existem nove isoprenóides isolados desta planta, dentre os quais, quatro triterpenóides identificados como sendo o germanicol, β -amirina, lupeol e β -hidroxiolean-18-en-3-ona (Silva *et al.* 1999).

Também já foram identificados na casca a dilactona do ácido vanoléico, ácido elágico, lupeol, ferulato de alquila, colesterol, campesterol, estigmasterol e sitosterol, 3- β -D-glucopiranosídeo do sitosterol, 3-O- β -D-glucopiranosídeo do estigmasterol, ácidos graxos saturados e insaturados (SILVA *et al.*, 2007).

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DE TRABALHO

As bactérias são capazes de adquirir diversos mecanismos de resistência lhes fornecendo uma habilidade inigualável de se adaptarem a diferentes meios e situações de injúria fazendo com que consigam evadir ao estresse a que foram submetidas, se firmar novamente nesse mesmo meio e se desenvolver normalmente ou de forma menos lesiva. Esse é um fator o qual tem feito a indústria farmacêutica reduzir consideravelmente seus investimentos na pesquisa por novos antimicrobianos, pois já se conhece também, que a aquisição de genes de resistência pelas bactérias ocorre em um período de tempo muito curto, como é o caso do MRSA.

O aumento da prevalência do MRSA tornou-se uma grande ameaça mundial para a área da saúde, devido principalmente à sua virulência, opções terapêuticas limitadas e sua distribuição em ambos os ambientes, hospitalar e comunidade (Huletsky *et al.*, 2004).

Considerando que o Brasil tem quase um terço da flora mundial, representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante, como a Caatinga, o único bioma exclusivamente brasileiro (Silva *et al.*, 2007), e conhecendo a necessidade de novos agentes terapêuticos para as doenças infecciosas, justifica-se a realização deste estudo, que avaliará a propriedade antimicrobiana da *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a antimicrobianos, e configura a seguinte hipótese de trabalho: A *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) possui atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* resistente a antimicrobianos e/ou exerce influência sobre seus fatores de virulência?

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações da folha da *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) sobre cepa de *Staphylococcus aureus* isoladas de um hospital público de Vitória da Conquista (BA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da *C. cf. macrophyllum* sobre cepa resistente padrão e isolado clínico de *S. aureus* resistente a oxacilina isolado de hospital público de Vitória da Conquista (BA);
- Avaliar a atividade inibitória da *C. cf. macrophyllum* na inibição da formação do biofilme de 24 horas de *S. aureus* resistente a oxacilina.
- Avaliar a atividade inibitória da *C. cf. macrophyllum* na inibição da viabilidade celular do biofilme de 24 horas de *S. aureus* resistente a oxacilina.
- Avaliar o perfil cromatográfico da fração bioativa de *C. cf. macrophyllum*.

METODOLOGIA

Coleta do material vegetal e preparo do extrato

A coleta das folhas da *C. cf. macrophyllum* será feita na FLONA, Floresta Nacional Contendas do Sincorá, uma área de cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e tem por objetivos básicos o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica. A FLONA situa-se nos limites dos municípios de Contendas do Sincorá, Tanhaçu e Ituaçu, região de semiárido do Sudoeste baiano, com predominância de caatinga.

As coletas serão realizadas com auxílio de um morador da região e prestador de serviços para a FLONA, sob coordenação do Instituto Chico Mendes. As plantas coletadas

serão fotografadas, demarcadas e localizadas com o uso de um aparelho GPS.

Análise fitoquímica

Para a análise fitoquímica será preparado um extrato etanólico, no qual as folhas serão maceradas em etanol 100% por 3 dias, com agitação manual esporádica, sendo repetido o processo por mais vezes até extração completa, e o solvente será eliminado

em evaporado rotativo, conforme descrito por Cechinel Filho *et al.* (1998). Após a extração, o mesmo será levado para secagem em estufa para obtenção do extrato seco.

Para preparo das frações será realizada a partição do extrato etanólico bruto das folhas da *Cenostigma cf. macrophyllum*. Os solventes utilizados para a partição serão, ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. A(s) fração(ões) bioativa(s) será(ão) analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia gasosa (CG) para possível determinação dos compostos bioativos.

Microorganismos

Os microrganismos utilizados serão uma cepa padrão resistente *S. aureus* ATCC 43300 INCQS 00306 e um isolado clínico 16A resistente a oxacilina confirmado por teste de antibiograma, que possui o gene *mecA*, coletado da balança de um hospital público de Vitória da Conquista, Bahia.

O isolamento de *S. aureus* foi realizado segundo de Sá *et al.* (2004). A amostra (0,1 mL) foi semeada em placas contendo ágar manitol, incubando-se em condições aeróbicas a 37°C, por até 96 horas, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas. O agente isolado foi identificado de acordo com as características morfológicas das colônias e morfotintoriais, pela técnica de Gram. A partir de cada subcultivo, os isolados foram submetidos às provas de coagulase, termonuclease, fermentação da maltose e do manitol, além de hemólise em ágar sangue de carneiro e PCR do gene *mecA*.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada pelos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com Yatsuda *et al.* (2005).

As suspensões bacterianas das cepas de *S. aureus* serão inoculadas em proporção 1:1000 no meio Brain Heart Infusion (BHI) caldo de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL. Após a homogeneização das mesmas, um volume de 190µL do inóculo e 10 µL do extrato com concentrações finais variando entre 4000 a 125 µg/mL, em diluição seriada de razão 2, serão acrescentados nos poços das placas de poliestireno para realização da CIM em microtitulação. Em seguida, as placas serão incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após a incubação, será realizada

a leitura visual para avaliação do crescimento, por meio da observação de turvação do meio e/ou presença de colônias no fundo dos poços. Nos poços em que não houver crescimento visual será adicionado o corante resazurina (Sigma Aldrich®), um indicador redox que na presença de crescimento bacteriano altera sua coloração de intenso violeta para rosa.

Para a determinação da CBM, serão selecionados os poços em que não houve crescimento bacteriano visível no ensaio de CIM, incubando-se uma alíquota (20 µL) destes em BHI Ágar. A CBM será definida como a menor concentração na qual não houve crescimento visível no meio de cultura (99,9% morte). Os testes serão realizados em 3 experimentos em triplicata.

Influência sobre fatores de virulência

- Avaliação da inibição da formação de biofilme

Existem fundamentalmente, três técnicas para o estudo do biofilme. Um método popular é o do dispositivo Robbins que se baseia na passagem de uma suspensão bacteriana por meio de uma célula de fluxo com 24 cupons onde as células se aderem e desenvolvam um biofilme e, depois, esses cupons podem ser retirados para análise (Lewis, 2001). Uma vez que o biofilme é formado, o líquido que alimenta o dispositivo pode ser transferido para um meio de cultura que contém compostos-teste. Após um período de incubação, o dispositivo é desmontado e as células são desalojadas por banho de ultrassom. Este método permite a formação de um biofilme reprodutível e a observação de sua dinâmica, pois os cupons podem ser utilizados para análise microscópica. No entanto, este método não é apropriado para estudos de suscetibilidade, que requerem, muitas vezes, centenas de amostras a serem examinadas.

Outro aparelho é o dispositivo de Calgary (Ceri *et al.*, 1999). Este aparelho descartável engenhosamente combina a força de cisalhamento que faz um biofilme robusto e uma placa de microtitulação. O dispositivo se parece com um replicador com pinos de plástico. Ele é inserido em uma bandeja que é preenchida com o meio de crescimento inoculado com as células. O aparelho é então, colocado num agitador de plataforma inclinada e a suspensão de células em crescimento lava os pinos, em que o biofilme cresce. É importante ressaltar que qualquer célula ou massa de células que não está bem aderida ao pino é lavada. Como resultado, pode-se formar um sólido biofilme que pode ser lavado sem perder sua integridade. Depois que o biofilme é formado, a tampa com os pinos podem ser colocados numa microplaca para teste de

susceptibilidade. Após um período de incubação com antibióticos, as células podem ser desalojadas dos pinos por sonicação suave e plaqueado para a contagem das colônias.

Um método baseado em placa de microtitulação foi introduzido e utilizado com sucesso para pesquisar os genes que participam no desenvolvimento de biofilme de várias espécies de bactérias gram-negativas (Genevaux *et al.*, 1996). Os poços da placa de microtitulação são inoculados com uma suspensão bacteriana e o biofilme é formado biofilmes na superfície dos poços. Depois de 24 a 48 horas de incubação, as células planctônicas são removidas por lavagem dos poços. A solução de marcação é então, adicionada aos poços. Posteriormente, os poços são lavados, e o corante é extraído e quantificado por espectrofotometria. Isto fornece uma medida quantitativa da massa de células do biofilme ou da quantidade de células viáveis, dependendo do corante utilizado. Nos últimos anos, essa metodologia foi incrementada com a possibilidade de ser utilizada para teste de susceptibilidade, com a vantagem da placa de microtitulação pode ter até 96 poços, o que permite a avaliação de várias substâncias ao mesmo tempo.

O método da placa de microtitulação é o mais adequado e de melhor custo para alcançar o objetivo deste trabalho, uma vez que será avaliada susceptibilidade do biofilme frente ao extrato da planta e aos antibióticos.

Neste ensaio, as cepas de *S. aureus* serão cultivadas em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) suplementada com 1% de glicose, durante 18 horas a 37°C, em agitação a 250 rpm. Após esta etapa, as amostras serão diluídas em TSB com 1% de glicose com o objetivo de se obter a densidade óptica (DO) de 0,135 a absorbância a 660 nm (escala de 0,5 McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), mensurados por meio de espectrofotometria. O inóculo será diluído em TSB suplementado com 1% de glicose (1:1000). Serão distribuídos 150 µL em cada poço de uma placa de microtitulação de poliestireno contendo 96 poços. Serão adicionados aos respectivos poços uma alíquota de 50 µL (concentração final de 10% v/v) de etanol (controle negativo), Vancomicina, Oxacilina ou do extrato de folhas de *C. cf. macrophyllum* em concentrações variando de 0,625 a 10,0 mg mL⁻¹ para a inibição do crescimento do biofilme. As placas serão incubadas a 37°C por 24 horas num agitador rotativo a 250 rpm. Para o biofilme formado, apenas o inóculo diluído em TSB suplementado com 1% de glicose (1:1000), sem extrato, e será incubado num agitador rotativo a 250 rpm, 37°C durante 24 horas. Depois disso, o etanol (controle negativo), o antimicrobiano padrão (controle positivo) e o extrato serão adicionados, e as placas serão novamente incubadas a 37°C, sob agitação a 250 rpm durante 24 horas. Para quantificação da biomassa do biofilme, as placas serão

lavadas três vezes com 200 µL de solução salina (NaCl a 0,9%) e colocadas em estufa a 60 °C até a total evaporação do líquido, após a incubação. Nas placas secas serão distribuídos 200 µL de cristal violeta 0,1% e, posteriormente, serão incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Então, serão lavadas, mais uma vez, com 200 µL de solução salina e, finalmente, o biofilme será ressuspensão em 200 µL de solução salina e levado para leitura da densidade óptica do marcado em 492 nm em um leitor de microplacas (Thermo Plate®) (Antunes *et al.*, 2011; Mahmoud *et al.*, 2013; Marino *et al.*, 2010; Quave *et al.*, 2008). O resultado será apresentado em valores de absorvância da formação de biofilme tratado com extrato de folhas de *C. cf. macrophyllum* ou controle positivo comparação com biofilme tratado com o veículo.

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

Os dados obtidos serão avaliados pelos testes estatísticos de análise de variância (ANOVA, 1 fator, abordagem paramétrica), seguido do teste de Dunnet. O nível de significância adotado será de 5%.

VIABILIDADE

O desenvolvimento do projeto contará com de auxílio financeiro dos órgãos de apoio e financiamento FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia)

e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e será utilizada a infraestrutura dos seguintes laboratórios da UFBA Campus Anísio Teixeira: Análise Instrumental, Biologia Celular e Molecular, Biotérios, Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Fisiologia e Farmacologia, Histopatologia, Parasitologia, Patologia e Embriologia, Microbiologia e Imunologia, Química Analítica e Orgânica.

A principal dificuldade enfrentada na realização do projeto, destaca-se a restrita quantidade de material vegetal que pode ser coletada na reserva florestal, devido ao compromisso com a conservação da flora e o grande período de seca da região, o que limita a coleta de uma quantidade da planta mais satisfatória. Além disso, com o particionamento do extrato bruto, o rendimento das frações é muito baixo em contraste com a quantidade empregada nos testes biológicos.

RESULTADOS ESPERADOS

Ao fim da realização dos ensaios, espera-se que com desenvolvimento dessa pesquisa que:

- O extrato etanólico da folha e frações da *C. cf. macrophyllum* (Leguminosae) apresentem atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* resistente a meticilina;
- Seja(m) identificado(s) o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pela atividade antimicrobiana presentes na folha da casca da *C. cf. macrophyllum* (Leguminosae).

Com esse trabalho também se almeja valorizar, incentivar e subsidiar cientificamente as pesquisas sobre a atividade biológica de plantas medicinais encontradas nos biomas brasileiros, por meio da exposição em congressos, produção de dissertação e publicação artigo científico de resultados confiáveis, e que o mesmo seja capaz de gerar novos antibióticos contra o MRSA e inovar no que diz respeito a melhores alternativas de tratamento de eficaz contra esse patógeno.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	Ano 1											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise Fitoquímica												
Coleta do material vegetal		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Preparo do extrato etanólico		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Preparo das frações												
Análise do perfil cromatográfico												
Atividade antimicrobiana												
CIM e CBM extrato bruto e frações			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biofilme extrato bruto e frações							X	X	X	X	X	X
Apresentação em congressos							X	X	X	X	X	X
Elaboração da dissertação												

Atividades	Ano 2											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise Fitoquímica												
Coleta do material vegetal	X	X	X	X	X	X	X	X				
Preparo do extrato etanólico	X	X	X	X	X	X						
Preparo das frações	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise do perfil cromatográfico					X	X	X	X	X	X	X	
Atividade antimicrobiana												
CIM e CBM extrato bruto e frações	X	X	X	X	X	X						
Biofilme extrato bruto e frações	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Apresentação em congressos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração da dissertação				X	X	X	X	X	X	X	X	X

ORÇAMENTO GERAL

Item	Valor aproximado em R\$
------	----------------------------

Custeio	6400,00
Material de consumo, componentes e/ou peças de reposição de equipamentos, software, instalação, recuperação e manutenção de equipamentos	4200,00
Aquisição de software por importação direta	-
Serviços de terceiros	-
Material bibliográfico	-
Passagens e diárias	2200,00
Capital	1100,00
Equipamentos em geral para o uso no projeto de dissertação	1100,00
TOTAL	7500,00

REFERÊNCIAS

ABREU, A.C.; McBRAIN, A.J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, v. 29, p.1007–1021, 2012;

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; FILHO, J.M.B. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007;

AGUIAR, R. M. de; NUNES, P. H. M.; OLIVEIRA, R. de C. M.; FREITAS, T. V. S. Efeito do Extrato Aquoso de *Cenostigma macrophyllum* Tul. Variedade Acuminata Teles Freire (Caneleiro) em Úlcera Gástrica Experimental. XXI Reunião Nordestina de Botânica, Caxias-MA, 1997;

ALMEIDA, F. R. C., COSTA, A. S. A., FREITAS, T. V. S., RODRIGUES, S. A., GIRÃO, R. J. S., SILVA, L. M. I. CHAVES, M. H. Estudo do Efeito Anti-edematogênico e Analgésico de *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. Acuminata Teles Freire XV. Simpósio de Plantas medicinais do Brasil, Águas de Lindóia-SP, 1998;

ALMEIDA, F. R.C.; FONTÃO, D.F.S.; OLIVEIRA, R. C. M.; CRUZ, F. J. S. M.; NUNES, P. H. M.; Antiulcerogenic activity of aqueous and ethanolic extract of bark

of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire. FeSBE, Salvador-BA, 2002;

ALVES, C.Q., DAVID, J.M., DAVID, J.P., VILLAREAL, C.F., SOARES, M.B.P., QUEIROZ, L.P. & AGUIAR, R.M. Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). *Química Nova*, v. 35, n.6, p.1137-1140, 2012;

ANTUNES, A. L. *et al.* High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, v. 1, p. 51-55, 2011;

ANTUNES, A.L.; [TRENTIN, D.S.](#); [BONFANTI, J.W.](#); [PINTO, C.C.](#); [PEREZ, L.R.](#); [MACEDO, A.J.](#); [BARTH, A.L.](#) Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 118, n.11, p.873-7, 2010;

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P. da; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.dos; SOARES, M.B.P. SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. *Institute Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005;

BRASIL. Lei nº 20 de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. *Diário Oficial da União*, Brasília, 27 de abril de 2011.

BRASIL. Lei nº 44 de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 de outubro de 2010,

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e cultura*, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, n. 6, p. 499–511, 1993;

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p.1771–1776, 1999.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p. 435–464, 1987

FILHO, V. C.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, v. 21, n. 1, 1998;

FOSTER, T.J. & M. HOOK. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiolo*, v. 6, p. 484–488, 1998.

GENEVAUX, P.; MULLER, S; BAUDA, P. A rapid screening procedure to identify mini-Tn 10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiology Letter*, v.142, p.27–30, 1996.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities. *Planta Medica*, v. 74, p. 594–602, 2008;

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P. de; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, 2005;

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

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

ITO, T.; OKUMA, K. MA, X.X.; YAZUWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on
antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic
island SCC. *Drug Resistance Updates*, v. 6, p. 41–52, 2003;

JEVONS, M.P. Celbenin-resistant Staphylococci. *British Medical Journal*, v. 1, p.
124–125, 1961.

KIEDROWSKI, M.R. & HORSWILL, A.R. New approaches for treating
staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.
1241, p. 104–121, 2011;

KOSZCZOL, C.; BERNARDO, K.; KROŃNKE, M.; KRUT, O. Subinhibitory
quinupristin/dalfopristin attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Journal of
Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p 564–574, 2006;

LEAL, R.I.; SILVA, J.M.C.da; TABARELLI, M.; JÚNIOR, T.E.L. Mudando o
curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil.
Megadiversidade, v. 1, n. 1, 2005;

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. Foye's principles
of medicinal chemistry. 6. ed. Philadelphia, USA: The Point, 2008;

LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 4, p. 999–1007, 2001.

LORENZI, H. *Leguminosae-Caesalpinioideae, Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Editora Plantarum, v. 2, p. 143 – 144. Nova Odessa, 1998;

MAHMOUD, M.; ALKHALEEF AH, F.; SHERIF, D.M. Antimicrobial effects of epigallocatechingallate and epicatechins of green tea on planktonic and biofilm forms of *staphylococcus aureus*, including MRSA. *Nature and Science*, v. 11, n.6, 2013;

MARINO, A.; BELLINGHIERI, V. ; NOSTRO, A.; MICELI, N.; TAVIANO , M. F.; GÜVENÇ, A.; BISIGNANO , G. In vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 59, p. 470–476, 2010;

MATTHEWS, H.B.; LUCIER, G.W.; FISHER, K.D. Medicinal herbs in the United States: research needs. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, p. 773–778, 1999;

MILLAR, B.C.; PRENDERGAST, B.D.; MOORE, J.E. Community-associated MRSA (CA-MRSA): an emerging pathogen in infective endocarditis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p.1–7, 2008;

NASCIMENTO, J.M.; CONCEIÇÃO, G.M. Plantas medicinais e indicações terapêuticas da comunidade quilombola Olho D'água do Raposo. *Biologia e Farmácia*, v. 6, n. 2, p. 138-144, 2011;

O'HARA, D.M.; REYNOLDS, P.E. Antibody used to identify penicillin-binding protein 2' in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Letters*, v. 212, p. 237–241, 1987;

O'GRADY, N.P. *et al.* Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *American Journal of Infection Control*, v. 39, p. 1–34, 2011.

QUAVE, C.L.; PLANO, L.R.W.; BENNETT, B.C. Quorum Sensing Inhibitors of *Staphylococcus aureus* from Italian Medicinal Plants. *Planta Medica*, v. 77, p. 188–195, 2011;

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

RASKO, D.A. & SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature*, v. 9, 2010.

RODRIGUES, S. A.; GIRÃO, R. J. S.; MARQUES, R. B.; COSTA, A. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, L. M. I. ALMEIDA, F. R. C. Estudo da atividade anti-inflamatória e analgésica de *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *Acuminata* Teles Freire. FeSBE, Caxambu - MG, 1999;

SÁ, M. E. P. de; CUNHA, M. L. R. S; ELIAS, A. O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importance of *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis: presence of enterotoxins, shock syndrome toxin and relationship with somatic cell count. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n. 5, 2004.

SILVA, H.R.; SILVA, C.C.M.; NETO, L.B.C.; LOPES, J.A.L. CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007;

SILVA, L. M. I.; CHAVES, M. H.; ROQUE, N. F. Isoprenóides das Folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Caesalpinaceae). 22^a RASBQ. Poços de Caldas-MG, 1999;

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007;

SOUSA, C.M. de M.; SILVA, H.R.; JÚNIOR, G.M.V.; AYRES, M.C.C. COSTA, C.L.S. da; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S. ARAÚJO, P.B. de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007;

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

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. *Microbiologia. Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.

WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae –Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. *Kew Bulletin*, v.64, p.135–146, 2009;

WERNER, G.; STROMMENGER, B.; WITTE, W; Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiology*, v. 3, p. 547–562, 2008;

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; MURATA, R.M.; REHDER, V.L.G.; MELO, L.V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 183-189, 2005;

YEE-GUARDINO, S.; KUMAR, D.; ABUGHALI, N.; TUOHY, M.; HALL, G.S.; KUMAR, M.L. Recognition and treatment of neonatal community-associated MRSA pneumonia and bacteremia. *Pediatric Pulmonology*, v. 43, p. 203–205, 2008;

ZHANG, W. & LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, v. 12, n.1, p. 9-18, 2002.

Assinatura e carimbo do Orientador

Assinatura do Discente