



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

WARLEY DE SOUSA MACÊDO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENNAN SOBRE *STAPHYLOCOCCUS*
*SPP.***

Barreiras - Ba
2022

WARLEY DE SOUSA MACÊDO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENNAN SOBRE *STAPHYLOCOCCUS*
*SPP.***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial
para obtenção do Diploma de Graduação
no Curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Contelli Klein

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mary Hellen Fabres Klein

Barreiras – BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

M141 Warley de Sousa Macêdo.

Avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme de *anadenanthera colubrina* (vell.) brenan sobre *staphylococcus spp.*/ Warley de Sousa Macêdo. – 2022.

56f.

Orientador: Dr. Raphael Contelli Klein.

TCC (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Angico-Branco. 2. Antipatogênica. 3. MRSA. I. Klein, Dr. Raphael Contelli. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 615.32

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

WARLEY DE SOUSA MACÊDO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENNAN SOBRE
STAPHYLOCOCCUS SPP.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial
para obtenção do Diploma de Graduação
no Curso de Farmácia.

Aprovado em 25 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 **Raphael Contelli Klein**
Data: 05/08/2022 17:17:23-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Raphael Contelli Klein
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **JAMILLE SOUZA FERNANDES**
Data: 01/08/2022 10:17:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profª. Drª. Jamille Souza
Fernandes(Membro)

Documento assinado digitalmente
 **KATYUSCYA VELOSO LEAO**
Data: 01/08/2022 10:26:15-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profª. Drª. Katyuscya Veloso
Leão(Membro)

***Dedico este trabalho a DEUS, aos meus pais e a
toda a minha família.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pois sem ele nada disso teria acontecido, quem todos os dias têm me guiado, e que em momento algum deixou que eu desistisse dos meus propósitos e deste sonho.

A minha mãe, Maria Leile, que nunca mediu esforços para me ver feliz. A quem tenho como referência de garra, determinação e persistência, que me ensinou a buscar e nunca desistir dos meus sonhos, sem deixar de lado as qualidades de um ser humano honesto e bondoso.

O meu pai, Raimundo Nonato, que nunca mediu esforços para me ver feliz. A quem tenho na vida de exemplo, pela sua determinação, persistência, humildade, honestidade, que me ensinou a buscar e nunca desistir dos meus sonhos e quem sempre me ajudou, sem deixar de lado as qualidades de um ser humano com princípios e valores.

Agradeço ao meu irmão Wilas, que sempre esteve me apoiando em tudo que faço.

Agradeço a Minha irmã Adriana, a qual sempre esteve me apoiando em tudo que faço.

Agradeço também a minha cunhada, Valdeny, que acompanhou toda minha trajetória acadêmica, e que esteve presente nos momentos de dificuldades.

Aos meus amigos Janaílton Vargas, Sérgio Evangelista, Maria Luiza, José Carlos, Igor Oliveira, Iago Senna, Euder Kácio e Jonathas Santana, que ao longo dessa jornada sempre estiveram presentes, apoiando e emanando energias positivas para que eu não desistisse. Agradeço pela empatia, pelos abraços, pelos choques de realidade, pelo carinho, pelas discussões, pelos risos, pelas lágrimas que choramos juntos, agradeço por todos os momentos que compartilhamos, mas acima de tudo, agradeço a irmandade que juntos construímos.

Sou grato ao meu professor orientador Raphael, pela confiança depositada na minha pessoa, por ter aceitado me orientar e realizar este projeto, por me manter motivado durante todo o processo, por todo seu esforço e pela sua amizade.

Sou grato à minha coorientadora Mary Hellen, pela confiança depositada na minha pessoa, por ter aceitado me orientar e realizar este projeto, pelo seu esforço no presente trabalho e pela sua amizade.

Agradeço aos discentes/amigas Ingrid Andrade e Andressa Garcez por terem papel de destaque na minha formação acadêmica. Por terem me auxiliado com paciência e cuidado nesta pesquisa científica.

Agradeço também à Universidade Federal do Oeste da Bahia e a todo o seu corpo docente e funcionários.

*“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

A utilização de plantas medicinais acompanha o homem desde seu surgimento, sendo o seu primeiro recurso terapêutico, passando a ser utilizado até os dias atuais pela sociedade. Durante as últimas décadas, pesquisas envolvendo extratos de plantas tiveram um grande avanço, se destacando as que buscam identificar possíveis propriedades farmacológicas contra bactérias. Atualmente, a OMS (Organização Mundial da Saúde) tem se preocupado com a resistência bacteriana a antibióticos, principalmente a resistência de *Staphylococcus aureus*, esse microrganismo é frequentemente encontrado na microbiota da pele e tem adquirido resistência a diversos antibióticos, dentre eles a meticilina e a vancomicina, sendo responsável por grande parte de infecções hospitalares em todo o mundo. Nesse sentido, a OMS ressalta a importância de investimento em pesquisas científicas que visam a descoberta de novos compostos que possam contribuir no tratamento contra *Staphylococcus aureus*. A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan popularmente conhecida como angico, é encontrada no cerrado baiano, sendo usada popularmente em tratamento de tosse, bronquite e infecções respiratórias. O angico é uma planta rica em metabólitos secundários, incluindo os taninos, que podem ser explorados para a identificação de compostos com atividade biológica. Então, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato etanólico do caule de *A. colubrina* em *Staphylococcus spp*, incluindo a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. O extrato não demonstrou atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em disco e foram classificados inativos perante o valor encontrado de concentração inibitória mínima. Notou-se que o extrato influencia na velocidade de crescimento das cepas trabalhadas e a atividade antibiofilme foi significativa para ½ CIM em *S. epidermidis* e *S. warneri*. Considerando os presentes resultados, o extrato etanólico do caule de *A. colubrina* demonstrou ser potencial agente que possa ser testado em associação antibiótica, contra bactérias resistentes.

Palavras-chave: Angico-Branco. Antipatogênica. MRSA. *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus warneri*.

ABSTRACT

The use of medicinal plants accompanies the man since its inception, being its first therapeutic resource, starting to be used until the present day by society. During the last decades, research involving plant extracts had a great advance, highlighting those that seek to identify possible pharmacological properties against bacteria. Currently, the WHO (World Health Organization) has been concerned about bacterial resistance to antibiotics, especially the resistance of *Staphylococcus aureus*, this microorganism is often found in the skin microbiota and has acquired resistance to several antibiotics, including methicillin and vancomycin, being responsible for a large part of nosocomial infections worldwide. In this sense, the WHO emphasizes the importance of investing in scientific research aimed at discovering new compounds that can contribute to the treatment of *Staphylococcus aureus*. The species *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, popularly known as angico, is found in the Bahian cerrado, being popularly used in the treatment of cough, bronchitis and respiratory infections. Angico is a plant rich in secondary metabolites, including tannins, which can be explored for the identification of compounds with biological activity. Therefore, this work aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of ethanolic extract from the stem of *A. colubrina* on *Staphylococcus* spp, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The extract did not show antimicrobial activity by the disk diffusion test and were classified as inactive according to the minimum inhibitory concentration value found. It was noted that the extract influences the growth rate of the strains worked and the antibiofilm activity was significant for $\frac{1}{2}$ MIC in *S. epidermidis* and *S. warneri*. Considering the present results, the ethanolic extract of *A. colubrina* stem proved to be a potential agent that can be tested in antibiotic association against resistant bacteria.

Key words: Angico-Branco. Antipathogenic. MRSA. *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus warneri*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DO	Densidade Óptica
EPS	Extracellular Polymeric Substances
MH	Mueller-Hinton
CIM	Minimum Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
TSB	Trypticase Soy Broth
TSBg	Trypticase Soy Broth with Glucose
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFOB	Universidade Federal do Oeste da Bahia
FDA	Food and Drug Administration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização Geográfica do Cerrado no Brasil.	19
Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie no Brasil.....	21
Figura 3 - Árvore de <i>Anadenanthera colubrina</i>	22
Figura 4 - Folhas, flores e frutos.	22
Figura 5 - Etapas do desenvolvimento de biofilmes bacterianos.....	25
Figura 6 - Imagem via satélite do local da coleta do material vegetal.	29
Figura 7 - Extrato de angico obtido a partir do processo de extração por etanol.....	30
Figura 8 - Passos do Ensaio de Microdiluição executado no Laboratório de Microbiologia (UFOB/ Campus Reitor Edgart Santos) Etapa 01.	31
Figura 9 - Passos do Ensaio de Microdiluição executado no Laboratório de Microbiologia (UFOB/ Campus Reitor Edgard Santos) Etapa 02.	32
Figura 10 - Teste de atividade antimicrobiana, halos de inibição observados do extrato do caule de <i>A. colubrina</i> na concentração de 100 mg/mL sobre (A) <i>S. aureus</i> ATCC 29219 com halo médio de (12mm); (B) MRSA USA 300 (8mm); (C) <i>S. epidermidis</i> NRS 101 (13mm); (D) <i>S. warneri</i> (10mm)	36
Figura 11 - Curvas de crescimento das bactérias nas condições testadas. (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29219 (B) MRSA USA 300 (C) <i>Staphylococcus epidermidis</i> NRS 101 (D) <i>Staphylococcus warneri</i> , em meio TSBg 0,25 % em função dos valores obtidos para densidade óptica.	39
Figura 12 - Placa de 96 poços utilizada para a leitura em espectrofotômetro durante 20 horas.	41
Figura 13 – Avaliação da atividade do extrato de <i>A. colubrina</i> sobre a produção de biofilme nas estirpes testadas. O gráfico apresenta a quantificação da formação de biofilme por meio da absorbância à 560nm das bactérias: <i>S. aureus</i> ATCC 29219, MRSA USA 300, <i>S. epidermidis</i> NRS 101, <i>S. warneri</i> na presença do: Veículo (DMSO), do meio de cultivo (TSBg), ½ CIM; ¼ CIM.	43
Figura 14 – Avaliação da atividade do extrato de <i>A. colubrina</i> sobre a pós- formação de biofilme nas estirpes testadas. O gráfico apresenta a quantificação da formação de biofilme por meio da absorbância à 560nm das bactérias: <i>S. aureus</i> ATCC 29219, MRSA USA 300, <i>S. epidermidis</i> NRS 101, <i>S. warneri</i> na presença do: Veículo (DMSO), do meio de cultivo (TSBg), ½ CIM; ¼ CIM.	45

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus centígrados
μ	Micro
cm	Centímetro
g	Gramas
h	Horas
m	Metro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μL	Microlitro
km	Kilômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de plantas pertencentes ao bioma cerrado com características antimicrobianas, encontrada na literatura consultada.	19
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de <i>A. colubrina</i> sobre as bactérias <i>S. aureus</i> ATCC 29219, MRSA USA 300, <i>S. epidermidis</i> NRS 101 e <i>S. warneri</i>	37
Tabela 3 - Velocidade de crescimento (μ) de bactérias expostos às concentrações do extrato.	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1. Contexto histórico de plantas com propriedades antimicrobianas	18
2.2. O cerrado brasileiro como provedor de novos antimicrobianos.	19
2.3. Metabólitos primários e secundários.....	20
2.4. <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.	21
2.5. <i>Staphylococcus spp.</i> e a resistência aos antibióticos.....	23
2.6. Biofilme bacteriano.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Materiais.....	27
4.2. Métodos	28
4.2.1. Material vegetal	28
4.2.2. Obtenção do Extrato vegetal	29
4.2.3. Concentração inibitória mínima.	30
4.2.4. Atividade antimicrobiana.....	32
4.2.5. Curva de crescimento bacteriano	33
4.2.6. Biofilme em formação	33
4.2.7. Biofilme pré-formado.	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Determinação da atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima.	35
5.2. Avaliação do crescimento bacteriano.....	38
5.3. Avaliação da atividade sobre o biofilme bacteriano	43

6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais acompanha o surgimento do homem, sendo um dos primeiros recursos terapêuticos para tratar problemas relacionados à saúde. Essa intervenção terapêutica foi mantida e é observada até os dias atuais. Contudo, ao decorrer do tempo foi descoberto que as plantas possuem características específicas não vitais chamadas de metabólitos secundários, que permitem vantagens para sobreviver e perpetuação da espécie vegetal (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Durante as últimas décadas houve um grande avanço nas pesquisas científicas, principalmente nas que envolvem plantas medicinais, tornando essa alternativa uma ferramenta importante na descoberta de propriedades farmacológicas, sobretudo com estudos envolvendo extratos de plantas que possuam atividades antimicrobianas (HAIDA et al., 2007).

O cerrado brasileiro é rico em biodiversidade vegetal, sendo uma fonte natural de substâncias bioativas (PEIXOTO et al., 2019). *Anadenanthera colubrina*, é uma espécie encontrada na Caatinga, Cerrado e Mata atlântica, planta rica em taninos, que é utilizada na medicina popular brasileira, principalmente, em tratamento de tosse, bronquite e infecções da via respiratória (SAMPAIO, 2002; MAIA, 2004; OLIVEIRA, 2005; apud CORADIN et al., 2018). Testes *in vitro* realizados com extratos de plantas ricos em taninos ou taninos puros têm demonstrado que tais compostos apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas as ações bactericidas e fungicida (CHUNG et al., 1998a; 1998b; KILKUSKIE et al., 1992, apud CASTRO, 2011, p. 16), que poderiam ser exploradas para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus spp.*

Infecções bacterianas, em especial *Staphylococcus aureus*, têm se tornado cada vez mais corriqueiras, sendo uma comum causa de diversas infecções comunitárias e hospitalares. Dentre as infecções causadas por *S. aureus* podemos destacar: infecções do trato urinário, infecções da pele e de tecidos moles (impétigo, foliculite, furúnculos, carbúnculos, celulite, síndrome da pele escaldada, dentre outros), infecções prostéticas, infecções pulmonares (pneumonia e empiema), gastroenterite, osteomielite, artrite séptica, meningite, síndrome do choque tóxico, endocardite infecciosa e bacteremia, conforme o local da infecção e das cepas envolvidas, o quadro pode evoluir para infecção mais invasiva e letal (TONG SY et al., 2015).

Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, como *S. epidermidis* e *S. warneri*, também podem causar infecções oportunistas em seres humanos, *S. epidermidis* é frequentemente causadora de infecções associadas a dispositivos médicos em ambiente hospitalar e formação de biofilme, podendo causar quadro de sepse nosocomial (OTTO, 2012; (LEGIUS et al., 2012). *S. warneri* é outra bactéria clinicamente importante, estando envolvida em uma ampla gama de doenças, como infecções da pele, olhos e trato urinário, supressão imunológica, infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos e recém-nascidos (INCANI et al., 2010; IEGIUS et al., 2012).

O tratamento de infecções estafilocócicas tem sido cada vez mais complicado em virtude do surgimento de cepas resistentes a antibióticos. Segundo a OMS 2020 “Os antibióticos estão se tornando cada vez mais ineficazes à medida que a resistência a medicamentos se espalha globalmente, dificultando o tratamento de infecções e aumentando o número de morte”. Com isso, é necessário investimento em pesquisas para o descobrimento de novos compostos com atividade antimicrobiana e/ou antipatogênica para o tratamento das infecções (OMS, 2020).

Tendo em vista toda essa problemática das infecções causadas por *Staphylococcus spp.*, o presente trabalho propõe avaliar possíveis atividades antimicrobiana e antibiofilme do extrato do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre cepas de *Staphylococcus spp.*, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Contexto histórico de plantas com propriedades antimicrobianas

O uso de plantas para fins medicinais, acompanha o ser humano desde o seu surgimento, sendo o seu único e principal recurso para fins terapêuticos nas civilizações antepassadas. Porém, devido ao desconhecimento das propriedades que cada planta possuía, ocorriam bastante casos de morte por intoxicação. Com isso, logo se notou que nem toda planta possui efeitos benéficos. Na pré-história, o ser humano apresentava um certo conhecimento empírico, advindo das observações perante o comportamento dos animais ao ingerir determinadas plantas e pelo conhecimento adquirido por seus antecessores (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Alguns autores relatam como foram os primeiros registros de usos de plantas para fins terapêuticos, como descrito a seguir:

As referências históricas sobre plantas medicinais trazem relatos de seu uso em praticamente todas as antigas civilizações. As primeiras descrições do uso de plantas com fins terapêuticos foram escritas em cuneiforme. Essas descrições são originárias da Mesopotâmia e datam de 2.600 a.C., incluindo óleo de cedro (*Cedrus* sp.), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), mirra (*Commiphora* sp.), papoula (*Papaver somniferum*), entre outros derivados de drogas vegetais que ainda são utilizados no tratamento de doenças, como gripes, resfriados e infecções bacterianas (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, p. 2).

A utilização de plantas medicinais no Brasil se iniciou muito antes da chegada dos colonizadores, o povo indígena já fazia o uso de ervas para seus rituais, o conhecimento era transmitido dos mais velhos para os mais novos. Com a chegada dos europeus (os quais possuíam um certo conhecimento do uso de espécimes) e logo mais com a vinda do povo africano, que em sua cultura possuía também tinha conhecimento de vegetais para fins medicinais, houve uma miscigenação desses conhecimentos, e pode-se afirmar que a base do conhecimento da população brasileira sobre plantas medicinais foi advinda do conhecimento desses três povos (BRAGA, 2011). Ideia essa compartilhada por outros autores, “No Brasil, a história da utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta influências marcantes das culturas africana, indígena e europeia” (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, p. 9).

2.2. O cerrado brasileiro como provedor de novos antimicrobianos.

“O Bioma Cerrado é um dos principais núcleos de biodiversidade genética do planeta e o Brasil possui ampla área territorial (do norte ao sul do país)” (MENEZES et al., 2015.p.1070). Dispõem de uma formação savânica de cerca de 2,0 milhões de km², correspondendo a cerca de 23% do território nacional, área que abrange o sul de Mato Grosso, o norte do Piauí, o oeste da Bahia, o sul do Maranhão, os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rondônia e São Paulo, e Distrito Federal (SOARES et al., 2017).



Figura 1 - Localização Geográfica do Cerrado no Brasil.

Fonte: SANO et al (2008)

Pesquisas envolvendo plantas brasileiras do bioma cerrado têm evidenciado, principalmente, as características antimicrobianas das espécies estudadas. Na tabela 1 estão descritas algumas dessas espécies com atividade antimicrobiana descrita na literatura.

Tabela 1 - Espécies de plantas pertencentes ao bioma cerrado com características antimicrobianas, encontrada na literatura consultada.

Nome Científico	Nome popular	Autor
<i>Psidium Cattleianum</i> Sabine	Araça	MENEZES et al., 2015
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro	GONÇALVES et al., 2005; SILVA et al., 2007
<i>Bixa orellana</i>	Urucum	GONÇALVES et al., 2005
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Copaíba	

<i>Eugenia uniflora</i>	Pitangueira	
<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá	
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	
<i>Pterodon emarginatus</i>	Sucupira	
<i>Schinus terebinthifolia</i>	Aroeira	
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	
<i>Syzygium cumini</i>	Jambolão	
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão	ALVARENGA et al., 2007
<i>Lantana câmara</i>	Cambará	BERTO, 2014
<i>Cochlospermum regium</i>	Algodãozinho-do-cerrado	

Fonte: Autor, 2022.

Os princípios ativos das espécies são oriundos do metabolismo secundário, os que se destacam por possuir atividade antimicrobiana são, os glicosídeos, alcalóides (álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e lactonas), compostos fenólicos e polifenólicos (quinonas, flavonas, taninos e cumarinas), terpenos (mono e sesquiterpenos e esteróides), saponinas, flavonóides e óleos essenciais. Essas substâncias ativas das plantas medicinais, dificilmente se encontram pura e sim sob a forma de complexos, cujos componentes se completam melhorando a ação sobre tal organismo patogênico (MARTINS et al., 2000).

2.3. Metabólitos primários e secundários.

A atividade metabólica é uma característica presente em todos os seres vivos, sendo caracterizada por reações químicas que ocorrem no meio interior celular. Em células vegetais, o metabolismo é dividido em dois, primários e secundários, o metabolismo primário é responsável por desempenhar funções cruciais para a vida do vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, sendo assim são compostos que possuem uma distribuição universal nas plantas. Este é o caso dos aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e da clorofila (PERES, s.d).

Os metabólitos secundários aparentemente não possuem funções essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do vegetal, mas desempenham um papel importante na interação planta e meio ambiente. Todos os vegetais são capazes de

sintetizar metabólitos secundários, entretanto é mais comum em espécies selvagens, que durante o processo natural evolutivo desenvolveram mecanismos de defesa para competir com outras plantas por nutrientes e defesa contra ataques de patógenos. Além disso, esses metabólitos secundários possuem funções essenciais para a perpetuação de espécies, por ser capaz de induzir uma atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos de simbiontes (PERES, s.d; FILHO, ALVES, 2002)

2.4. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan é uma espécie vegetal que pertence à família *Fabaceae*, sendo conhecida popularmente como angico, angico amarelo, angico-branco, angico-bravo-liso, angico camburí, angico-cedro, angico-coco, angico-de-cariço, angico-escuro, angico-liso, angico-vermelho e cambuí-angico (ANDRADE-LIMA, 1989; MAIA, 2004; LORENZI, 2008). No Brasil, é uma espécie tipicamente encontrada nos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, na região Nordeste é encontrada no estado da Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, na região Centro-Oeste nos estados do Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, na região Sudeste nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, na região Sul no estado do Paraná (MORIM, 2020).



Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie no Brasil.

Fonte: MORIM (2020)

É uma planta de grande porte, sua altura pode variar de 10 a 20 m, enquanto a circunferência do seu caule chega a cerca de 60 cm de diâmetro à altura do peito, possui tronco em forma mais ou menos cilíndrica, ramificação cimoso, dicotômica,

tortuosa e irregular. Casca grossa com espessura de até 20 mm, casca externa acinzentada e interna avermelhada, as folhas são paripinadas com comprimento de 15 a 20 cm, flores são geralmente pequenas na cor de brancas a amareladas, sendo bem perfumadas, as sementes são orbicular achatadas, com até 15 mm de comprimento (CARVALHO, 1994), seus frutos são alongados do tipo vagem (KILL; DA SILVA, 2016).



Figura 3 - Árvore de *Anadenanthera colubrina*.

Fonte: Árvores do Brasil (2021)



Figura 4 - Folhas, flores e frutos.

Fonte: Árvores do Brasil (2021)

É uma planta medicinal bastante utilizada principalmente, na forma de infusão para o tratamento de afecções das vias respiratórias e pulmonares, bronquites, tosses, faringites, antidiarreica, expectorante e asma. As cacas de angico-branco são ricas em taninos (CARVALHO, 2003), que podem apresentar efeito antimicrobiano e antifúngico (BRUNETON, 1991).

2.5. *Staphylococcus spp.* e a resistência aos antibióticos.

O gênero *Staphylococcus* é um dos principais grupos bacterianos encontrado na microbiota humana, sendo mais frequente na pele (GAO et al., 2010), possuem forma de cocos Gram positivos, são diferenciados de outros microrganismos que possuem a mesma forma pela prova de catalase. Na literatura, há ao menos cerca de 60 espécies e subespécies (LAMERS et al., 2012). Esse gênero, possui um grande espectro de causar doença, devido a sua translocação do habitat natural (DHANOA et al., 2012).

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria frequentemente encontrada na microbiota humana, principalmente nas fossas nasais, possui uma morfologia esférica e pertencendo ao grupo dos cocos gram-positivos, entretanto, embora estejam na microbiota humana, é a mais virulenta desse grupo, sendo capazes de provocar infecções chegando a ser letais em decorrência da capacidade de adquirir resistência a antibióticos (SANTOS et al., 2007; DHANOA et al., 2012).

A *Staphylococcus epidermidis* faz parte da microbiota humana, coloniza a pele humana e mucosas, esse microrganismo é um patógeno oportunista, comumente é associado a infecções hospitalares, devido a produz um biofilme que age como um revestimento ao material plástico e células, e também causa resistência a fagocitose e resistência a alguns antibióticos. Os indivíduos mais suscetíveis a infecção por este agente são os pacientes submetidos a terapia intravenosa, recém-nascidos, idosos, aqueles que utilizam cateteres e outros produtos médicos como bolsas, respiradores, próteses etc (THEISEN, 2010). Outro patógeno oportunista capaz de causar várias infecções é a *Staphylococcus warneri*, especialmente em pacientes com dispositivos médicos em habitação. *S. warneri* isolados em infecções são geralmente resistentes a agentes antimicrobianos beta-lactâmicos (KARAM, RIBEIRO, 2022).

Segundo Santos (2004), ao falar de resistência aos antibióticos, ressalta que este problema ocorre de maneira natural, em virtude do uso indiscriminado desta classe farmacológica pela população, onde as bactérias apresentam capacidade de se adaptar ao ambiente que é inserida, facilitando assim o desenvolvimento do mecanismo de resistência. A utilização de antibióticos está se tornando cada vez mais ineficaz, isso se dá devido a resistência bacteriana que cresce em escala mundial (OMS, 2020).

As penicilinas se destacam na história por ser a primeira classe de medicamento capaz de curar infecções bacterianas, sendo introduzidas no mercado na década de 40 (LOWY, 2003). Entretanto, logo após seu desenvolvimento na década de 50, surgiu bactérias resistente ao anel beta lactâmico, estrutura química que compõe o núcleo fundamental das penicilinas, conseqüentemente em meio laboratorial, através de modificação no anel beta lactâmico, surgindo assim a meticilina, que resolveu a problemática em vigor da época (HAUSER, 2009). Mas, na década de 70 surgiu a MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) que rapidamente se disseminaram pelos ambientes hospitalares e são responsáveis por grande parte das infecções até os dias atuais (SANTOS et al., 2007). “Pessoas com infecções *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) têm 64% mais chances de morrer do que pessoas com infecções sensíveis a medicamentos (OMS, 2020)”.

Um dos principais mecanismos de virulência que é desencadeado pelos microrganismos na resistência antimicrobiana, é o desenvolvimento da formação biofilmes, uma vez neste estado ele pode ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes a um antibiótico do que comparada com as células bacterianas em estado planctônico (HENGZHUANG et al., 2011).

2.6. Biofilme bacteriano

Costerton et al. (1999) conceitua biofilme bacteriano como comunidade de células bacterianas, encapsuladas e envolvida por uma substância polimérica extracelular (EPS), se destacam pela capacidade de adesão irreversível em superfície biótica (tecidos vivos) ou abiótica (superfícies inertes), causando infecções crônicas. Os cateteres e biomateriais utilizados em procedimentos hospitalares são exemplos de superfícies abióticas comuns, já em superfícies bióticas destaca-se o epitélio pulmonar em casos de Fibrose Cística (Fricks-Lima et al., 2011). O processo de formação de biofilmes é dinâmico e bem definido sendo uma reação em cadeia, a qual envolve processos químicos, físicos e principalmente biológicos, podendo ser dividido em 5 etapas (PERCIVAL et al., 2011).

A primeira etapa de formação do filme condicionante é a adesão, ocorrendo de maneira reversível, para isso são utilizadas pelas bactérias várias organelas e proteínas extracelulares para detecção e fixação em superfícies; na segunda etapa ocorre a fixação irreversível em decorrência da secreção da EPS, que auxiliam para uma melhor adesão à superfície; já na etapa 3 ocorre a replicação, onde as células

adsorvidas se multiplicam de forma a desenvolver microcolônias; na etapa 4 acontece o processo de amadurecimento/maturação em uma estrutura tridimensional, um biofilme maduro envolvida pela EPS e capaz de resistir a tensões mecânicas, contribuindo para ineficácia dos tratamento com antibióticos, após isso ocorre a etapa final, sendo caracterizada pela dispersão de algumas células do biofilme, podendo assim aderir em outras superfícies e formar novos biofilmes, essa etapa é considerada muito importante para propagar e renovar a comunidade (HIGA, 2017).

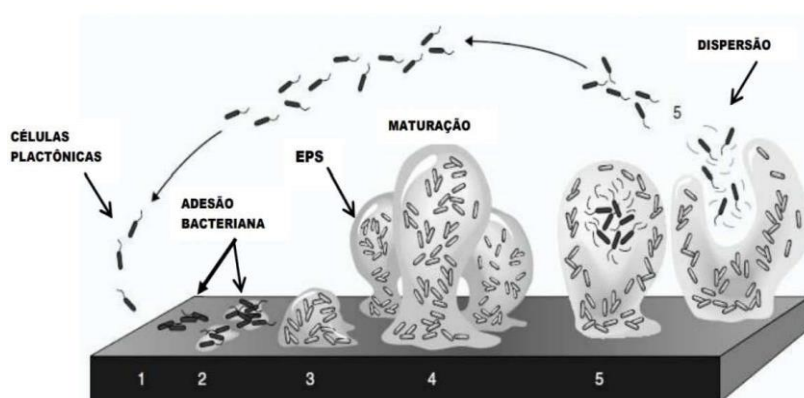


Figura 5 - Etapas do desenvolvimento de biofilmes bacterianos.

Fonte: STOODLEY et al., (2002).

A matriz age com função protetora nos microrganismos contra radiação ultravioleta, células de defesas, dessecação, oxidantes e antimicrobianos. Além disso, atuam como uma espécie de sistema digestivo externo, de modo a manter enzimas extracelulares próximas das bactérias, permitindo assim que ocorra a metabolização de biopolímeros, servido como fonte de nutrientes e de energia para os biofilmes. Contudo, ainda são capazes de armazenar componentes de células lisadas para um posterior uso (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

O crescimento bacteriano na forma de biofilmes permite que as bactérias possam ser capazes de evadir defesas naturais do hospedeiro e ao tratamento antimicrobiano, dessa forma contribuem para a resistência a antibióticos. Teste de sensibilidade *in vitro* demonstraram que biofilmes são capazes de sobreviver em concentrações de antibióticos até milhares de vezes maiores do que a utilizadas comumente, o que torna sua eliminação desafiadora (STEWART; COSTERTON, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre *Staphylococcus spp in-vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre *Staphylococcus spp*;
- Verificar atividade bactericida ou bacteriostática de extrato etanólico da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre *Staphylococcus spp*;
- Analisar o efeito do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre o biofilme de *Staphylococcus spp*;
- Avaliar a influência do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre a velocidade de crescimento em *Staphylococcus spp*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- Ágar Mueller Hinton;
- Água destilada;
- Alça bacteriológica;
- Alça de drigalski
- Álcool 92.8%;
- Algodão;
- Autoclave;
- Cabine de segurança biológica;
- Extrato do caule de *A. colubrina*;
- Cepas de *Staphylococcus spp*;
- Cristal violeta;
- Dimetilsulfóxido;
- Espectrofotômetro;
- Estante.
- Estufa incubadora BOD;
- Etanol 95%;
- Glicose;
- Isqueiro;
- Lamparina;
- Luvas descartáveis;
- Máscara de proteção;
- Micropipeta monocanal automática 0,5- 20 μ L;
- Micropipeta monocanal automática 100-1000 μ L;
- Micropipeta monocanal automática 20-200 μ L;
- Micropipeta multicanal automática 100 μ L;
- Microplacas de 96 poços;
- Microtúbulos;
- Moinho;
- NaCL P. A;
- Paquímetro;
- Papel alumínio;

- Papel toalha;
- Papel filtro;
- Placa de petri;
- Ponteira 100 µL;
- Ponteira 200 µL;
- Ponteira 100 µL;
- Rotaevaporador;
- Saco plástico resistente ao calor;
- Salina 0,9%;
- Tampão salina fosfato (PBS);
- TSB;
- Tubo criogênico;
- Tubo de ensaio;
- Tubo Falcon;
- Ultra freezer.

4.2. Métodos

4.2.1. Material vegetal

A amostra do caule da espécie *Anandenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foi coletada por Ribeiro (2018), durante o mês de maio de 2017, em mata nativa do bioma cerrado, na zona rural do município de Serra Dourada – Bahia, território que faz parte da bacia do Rio Grande. Foi realizada também a coleta de um material para a herborização e identificação botânica, a exsiccata produzida da espécie recebeu a numeração BRBA 7554, estando depositada no acervo do Herbário da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).

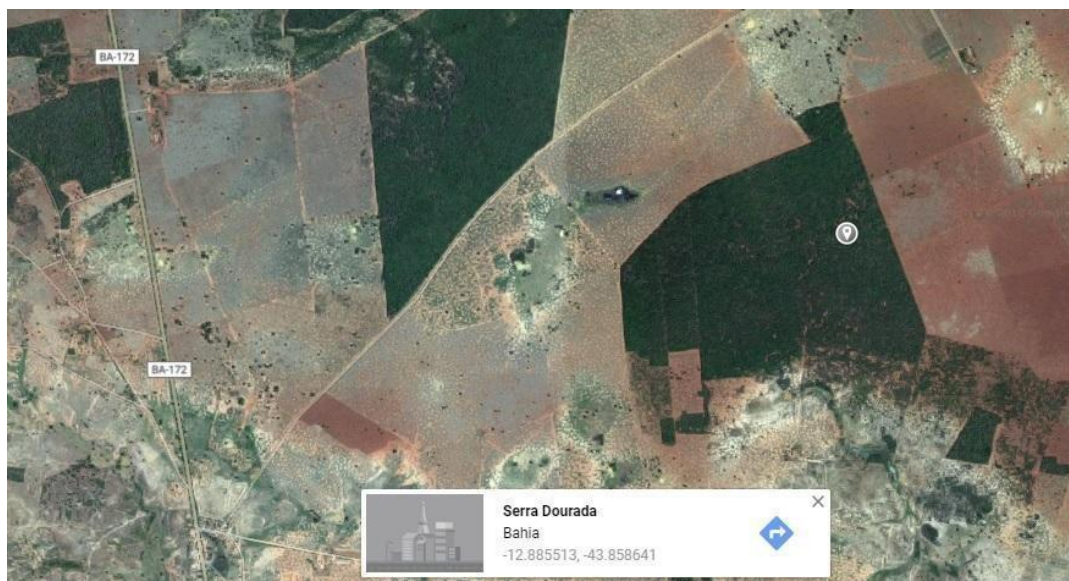


Figura 6 - Imagem via satélite do local da coleta do material vegetal.

Fonte: RIBEIRO (2018).

4.2.2. Obtenção do Extrato vegetal

O extrato do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foi gentilmente cedido pela professora Katyscyra Veloso Leão do departamento de Química da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) Campus Reitor Edgard Santos, Barreiras-BA. O processo de extração se deu conforme descrito a seguir. Inicialmente, o material vegetal coletado foi lavado com uma solução de hipoclorito de sódio (2%) por 10 minutos. Posteriormente, o caule foi seco em temperatura ambiente por 24 horas, em seguida realizou-se o processamento em moinho de facas modelo SL – 31, o material processado foi pesado, e posteriormente foi realizada a obtenção do extrato bruto. O material moído foi acondicionado em um béquer, em seguida, adicionou-se o volume aproximado de 300 mL do solvente I por 96 horas (4 dias), agitando-o uma vez por dia.

Após o período de repouso, o mesmo foi submetido ao processo de filtração a vácuo, em seguida o sobrenadante do extrato do caule foi destilado e concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador, à temperatura aproximadamente 20°C abaixo do ponto de ebulição do Etanol 79°C, posteriormente levados a banho maria 60°C, por 1 hora para completa secagem do solvente, ao final foi realizado a identificação, ocorrendo a realização de testes fitoquímicos qualitativos, obtendo resultado positivo para fenóis e taninos.

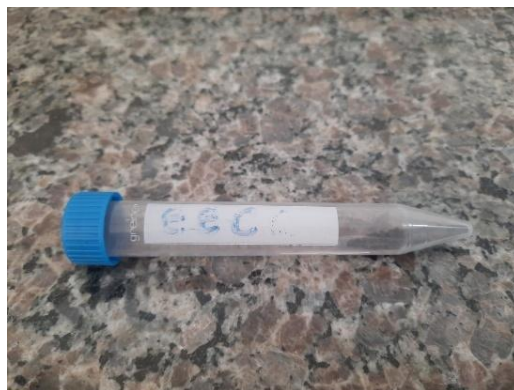


Figura 7 - Extrato de angico obtido a partir do processo de extração por etanol.

Fonte: Autor, 2022.

4.2.3. Concentração inibitória mínima.

Para este ensaio utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo criada por Eloff (1998), a qual envolve o uso de pequenos volumes, que são adicionados em placas de plásticos estéreis, com 96 orifícios de fundo arredondado dispostos em 12 colunas e 8 poços cada, como se ilustra na figura 8 e 9.

Na coluna 1 da placa 1 nos poços de A a D foram adicionados 100 μL de diluição a 1024 $\mu\text{g/mL}$ e 16384 $\mu\text{g/mL}$ na placa 2 do extrato a ser testado, nas demais colunas e nos poços de A a D, foram inseridos 50 μL do meio de cultura caldo TSB (MARIÑO, 2014). Ademais, acrescentou-se também suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland, nos poços da coluna 2 até 11. Os poços da coluna 12 foram utilizados como controle de crescimento bacteriano, ou seja, para ver se houve ou não contaminação, para isso foi utilizado 50 μL meio de cultura TSB e suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland. Os poços G da coluna 1, 2, 3, 4 e 5 foram utilizados como controle de bactérias do meio de cultura líquido TSB.

Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foi realizada a diluição seriada do extrato em análise, pipetando 50 μL dos poços da coluna 1 para os poços da coluna do lado, posteriormente, foi realizada a homogeneização com a pipeta em 30 vezes e em seguida pipetou-se 50 μL da coluna 2 para a coluna 3 sendo repetido todo o processo até a coluna 11, ao final dispersou-se 50 μL desta coluna, para todos os poços apresentarem o mesmo volume final.

Após este procedimento, as placas foram incubadas em BOD por 20 horas a 37 °C, ao fim desse tempo e em um local de boa iluminação, foi feita a leitura das microplacas e a CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica encontradas, para maior confiabilidade nos resultados encontrados esse teste foi

realizado em triplicatas. As figuras a seguir demonstram a técnica de microdiluição em placa para obtenção do valor de concentração inibitória mínima. Vale ressaltar que as concentrações da placa 2 foram maior porque nas concentrações trabalhadas na placa 1 não foram observado inibição do crescimento, e só trabalhou com 4 concentrações na placa 2 devido a turvação ser muito grande, de forma a atrapalhar a identificação de CIM.

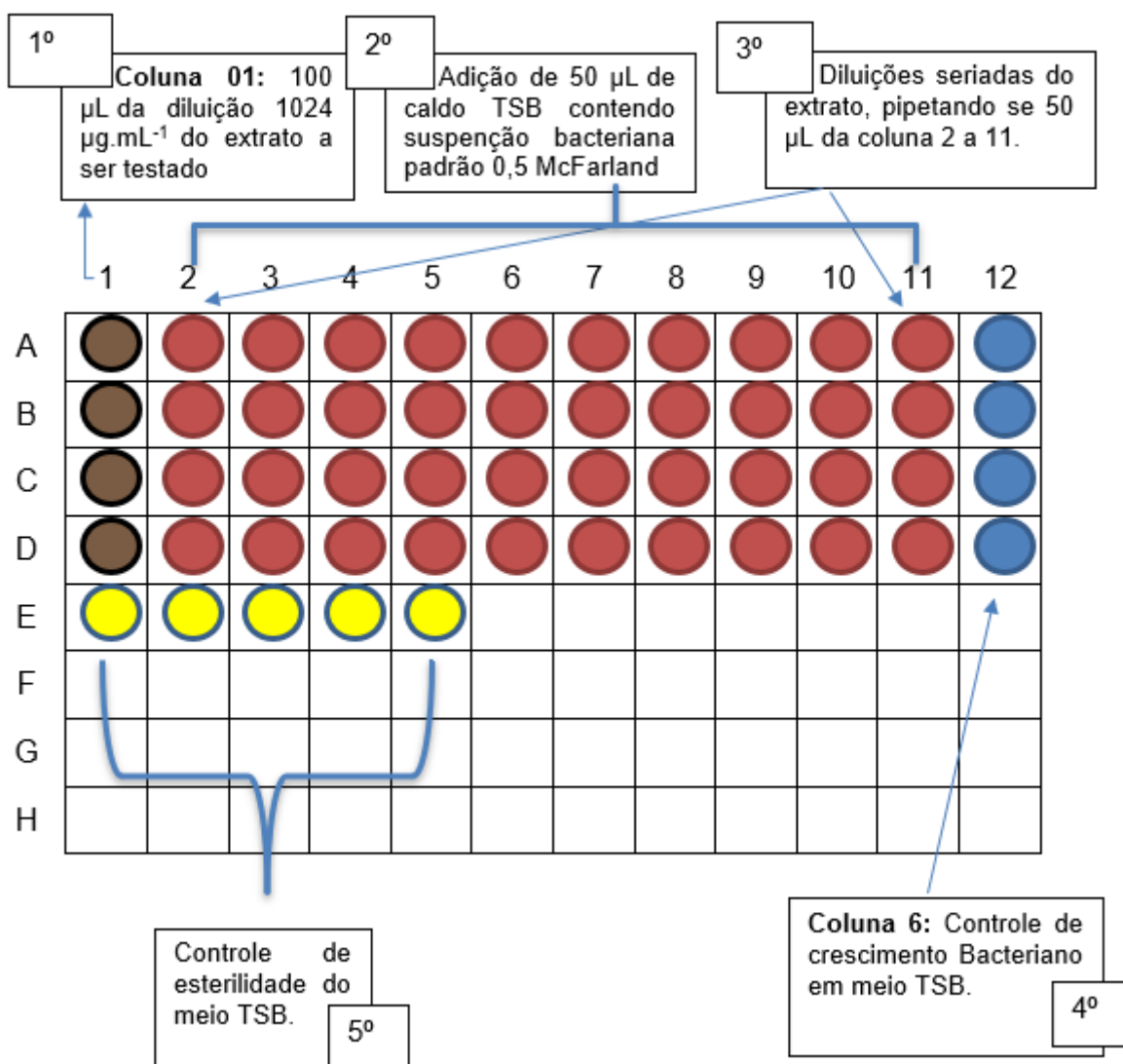


Figura 8 - Passos do Ensaio de Microdiluição executado no Laboratório de Microbiologia (UFOB/ Campus Reitor Edgart Santos) Etapa 01.

Fonte: Autor, 2022.

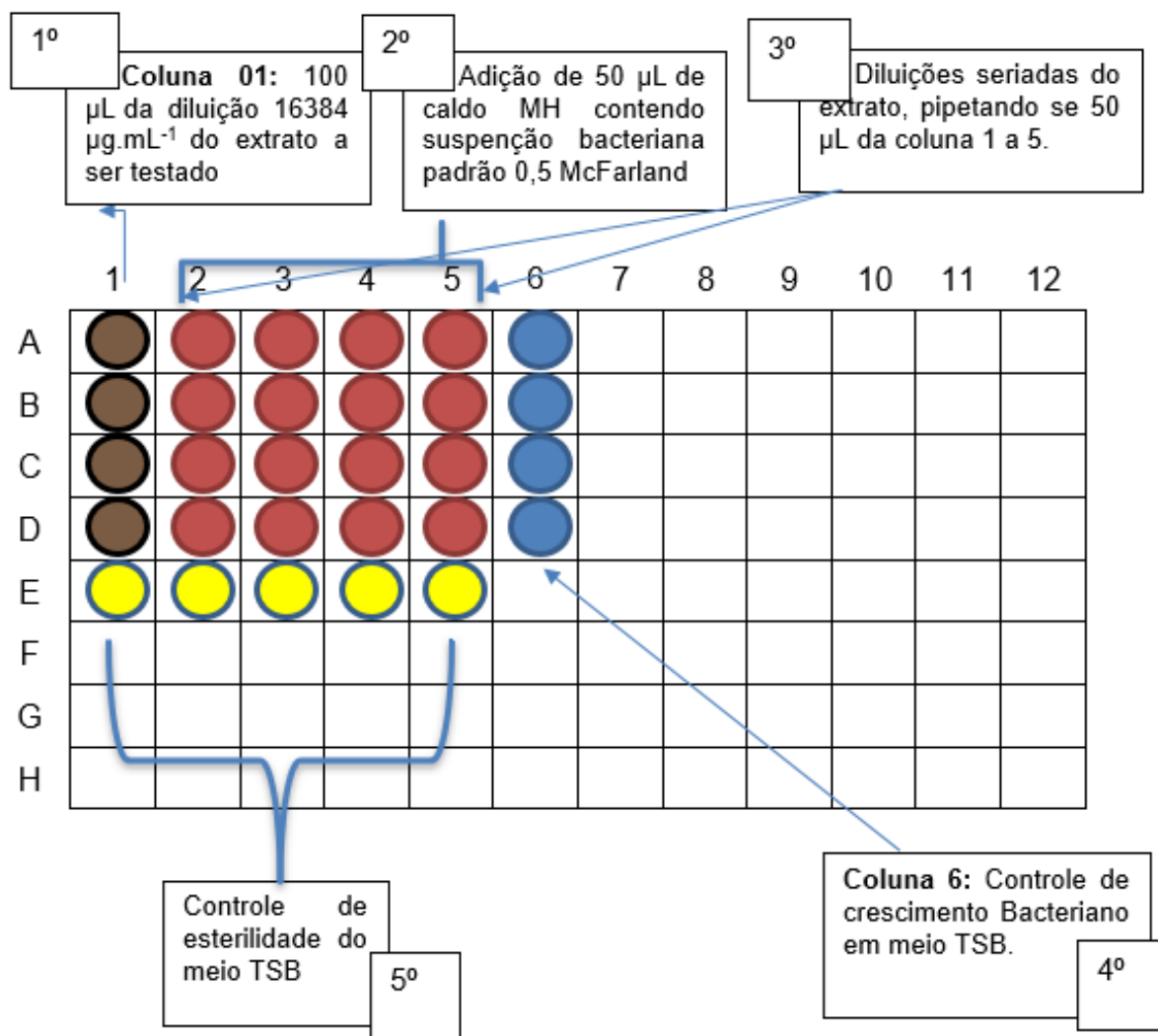


Figura 9 - Passos do Ensaio de Microdiluição executado no Laboratório de Microbiologia (UFOB/ Campus Reitor Edgard Santos) Etapa 02.

Fonte: Autor, 2022.

Os resultados de CIM foram avaliados segundo a classificação de Tanaka et al. (2005), os extratos vegetais são considerados como promissores, em relação ao potencial antimicrobiano quando o mesmo apresenta CIM < 100 µg/mL, moderada com CIM de 100-500 µg/mL, baixa atividade com CIM 500-1000 µg/mL e inativos com CIM > 1000 µg/mL.

4.2.4. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana ocorreu segundo a técnica de difusão em ágar adaptado de RABANAL et al., 2002. Para isto, em meio ágar sólido Mueller Hinton a 55 °C, foram adicionados 200 µL de uma suspensão contendo 10⁶ UFC mL⁻¹, homogeneizados com a alça de Drigalski. Sucedeu com a realização de furos de

aproximadamente 5 mm de diâmetro em papel filtro, no qual foi colocado sobre o ágar e adicionar sobre esse papel filtro estéril 10 µL extratos na concentração de 100 mg/mL. As placas ficaram mantidas a 37 °C por 24 h e os halos de inibição medidos em milímetros com auxílio de um paquímetro. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica, cada um com duas repetições técnicas.

Os resultados da atividade antibacteriana foram avaliados através da mensuração dos halos de inibição conforme os parâmetros sugeridos por Alves et al. (2000) da seguinte forma:

- < 9 mm, são considerados inativos;
- 9-12 mm, pouco ativo;
- 13-18 mm, ativo;
- > 18 mm muito ativo.

4.2.5. Curva de crescimento bacteriano

A curva de crescimento bacteriano foi realizada em placas de 96 poços. Cada poço foi preenchido com um volume de 100 µL de TSB (2x), 75 µL de água estéril e 20 µL de suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland e 5 µL de glicose. Após a preparação, a placa foi incubada a 37 °C por um período de 20 horas no equipamento Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific) e o crescimento foi acompanhado pela leitura da absorbância DO600nm a cada 30 minutos de intervalo (Klein et al. 2015). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com três repetições técnicas.

4.2.6. Biofilme em formação

A avaliação do efeito do extrato vegetal sobre a produção de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo chato conforme descrito (Klein et al., 2015). Um volume de 100 µL suspensão bacteriana padrão 0,5 McFarland foi adicionado em cada poço da microplaca, seguido da adição de 100 µL de TSBg contendo ou não extratos vegetais. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 22 h. Após esse período, os poços foram lavados com tampão salina fosfato (PBS)

três vezes, secos em capela de exaustão e corados com solução aquosa de cristal violeta 0,1% por 30 min, em seguida lavou-se com salina 0,9% três vezes e adicionado o 100 µL de etanol comercial e mantido à temperatura ambiente por 15 min. Após este período, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO 560nm) em leitor de microplacas Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica, cada um com três repetições técnicas. as bactérias testadas foram classificadas quanto a produção de biofilme conforme a classificação utilizada por Klein e colaboradores, 2015:

- DO560nm menor que 0,250, fracos produtores de biofilme;
- DO560nm entre 0,250 e 0,500, moderados;
- DO560nm maior que 0,500, como fortes produtores.

4.2.7. Biofilme pré-formado.

O efeito do extrato vegetal sobre o biofilme pré-formado foi analisado em microplacas de poliestireno de 96 poços. As placas contendo meio líquido TSBg e 20µL de suspensão bacteriana de 0,5 McFarland foram incubadas a 37 °C por 22 horas sem agitação. Após este período, o sobrenadante foi removido e adicionado nos poços TSBg contendo ou não os extratos vegetais. As placas foram novamente incubadas 37 °C por um período de 4h. O biofilme foi quantificado utilizando a metodologia descrita no item anterior. Os ensaios também foram feitos em triplicata biológica com três repetições técnicas cada.

4.2.8. Avaliação estatística

A Análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. As análises foram realizadas pelo teste de Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni considerando $p < 0,05$ como significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies estafilocócicas, apesar de fazerem parte da microbiota normal dos seres humanos, representam os principais patógenos causadores de infecções comunitárias e hospitalares (OMS, 2020). Tais infecções estão se tornando um problema mundial devido ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos utilizados para o tratamento. Além disso, o *Staphylococcus* também possui um grande arsenal de fatores de virulência que contribuem com a persistência da infecção (WU et al., 2019). Isso tem estimulado a pesquisa por novos tratamentos que possam ser utilizados no combate de infecções estafilocócicas, em especial as infecções causadas por bactérias resistentes à antibióticos.

Diversos estudos têm indicado que extratos de plantas são promissores na busca por compostos bioativos que possam auxiliar no tratamento das infecções bacterianas (WU et al., 2019). A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan é uma espécie nativa do cerrado, que é utilizada na cultura popular no tratamento de tosse, bronquite e infecções de vias respiratórias. Recentemente, Volpato e colaboradores (2022), descreveram a atividade antimicrobiana de *A. colubrina* contra *S. aureus* sensível à meticilina. Em outro estudo, foi observado que o extrato hidroalcólico da casca de angico apresentou atividade contra o biofilme formado por *Candida albicans* (SILVA et al., 2018). Dessa forma, este trabalho visou testar as atividades antimicrobianas e antibiofilme do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre diferentes espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina.

5.1. Determinação da atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais foi inicialmente avaliada por difusão em disco. O teste de difusão em disco é um teste amplamente aceito pela comunidade científica, pela FDA (Food and Drug Administration) além do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY, THORNSBERRY, 1991). Nos ensaios, verificou-se que o extrato de *A. colubrina* inibiu o crescimento das bactérias (figura 10).

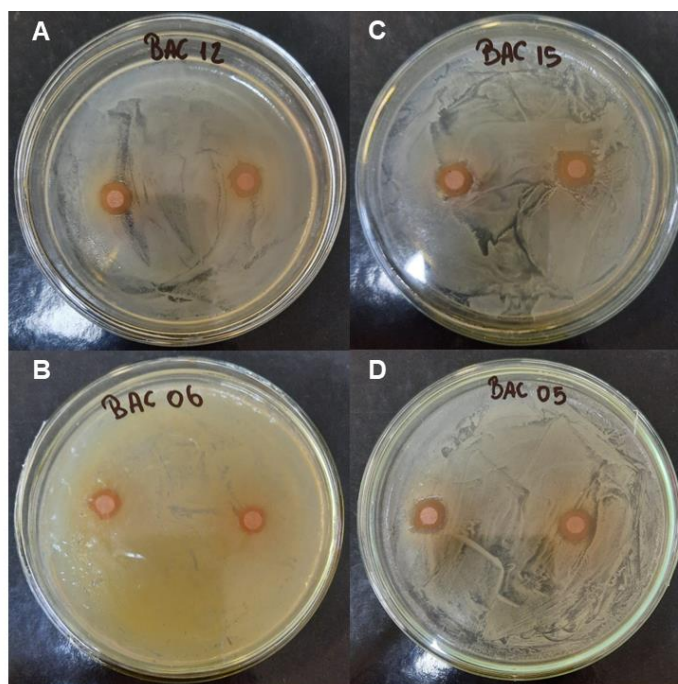


Figura 10 - Teste de atividade antimicrobiana, halos de inibição observados do extrato do caule de *A. colubrina* na concentração de 100 mg/mL sobre (A) *S. aureus* ATCC 29219 com halo médio de (12mm); (B) MRSA USA 300 (8mm); (C) *S. epidermidis* NRS 101 (13mm); (D) *S. warneri* (10mm)

Fonte: Autor, 2022.

Considerando essa classificação, observou-se que o extrato de *A. colubrina* foi inativo frente ao microrganismo MRSA USA 300 (8 mm), pouco ativo sobre *S. warneri* (10 mm) e *S. aureus* ATCC 29219 (12 mm) e ativo sobre *S. epidermidis* NRS 101 (13 mm).

Embora, essa seja uma classificação aceita no meio acadêmico, quando existe a ausência de uma zona de inibição significativa, não significa necessariamente que o extrato testado seja inativo, mas que ocorreu uma difusão não completa. Isso ocorre principalmente em compostos menos polares, que têm uma maior dificuldade de se difundir em meio à cultura (MORENO et al., 2006). Pode ser que o extrato testado tenha substâncias polares e por isso a inibição observada tenha sofrido influência, de modo a apresentar resultados falsos negativos/ positivos.

Em seguida, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (PINTO et al., 2003). As CIMs do extrato de angico obtidas para cada uma das quatro estirpes de bactérias testadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de *A. colubrina* sobre as bactérias *S. aureus* ATCC 29219, MRSA USA 300, *S. epidermidis* NRS 101 e *S. warneri*.

	<i>S. aureus</i> ATCC 29219	MRSA USA 300	<i>S. epidermidis</i> NRS 101	<i>S. warneri</i>
CIM	2048µg/mL	2048µg/mL	8192µg/mL	1024µg/mL
1/2 CIM*	1024µg/mL	1024µg/mL	4096µg/mL	512µg/mL
1/4 CIM*	512µg/mL	512µg/mL	2048µg/mL	256µg/mL

* Condições de trabalho para os demais experimentos.

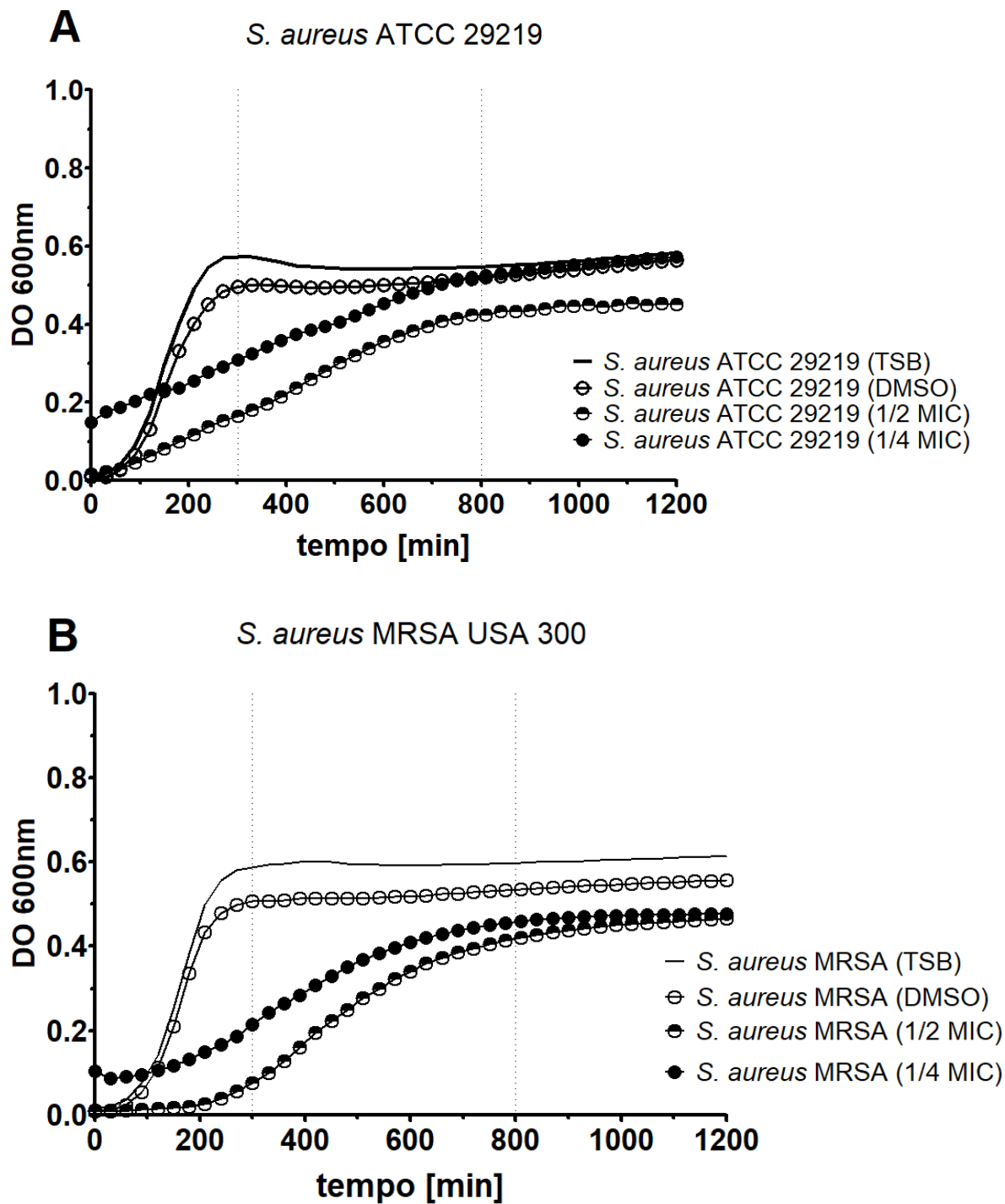
Fonte: Autor, 2022.

Observa-se que *S. warneri* é a espécie mais sensível ao extrato (CIM=1024 µg/mL), enquanto *S. epidermidis* NRS 101 foi a mais resistente com uma CIM de 8192 µg/mL (Tabela 2). Considerando essa definição, nossos resultados demonstram que o extrato de *A. colubrina* foi inativo frente aos microrganismos analisados, pois os valores CIM para todas as espécies testadas foram > 1000 µg/mL.

Os valores de CIM para todas as espécies testadas foram maiores que os observados em outros trabalhos com o mesmo extrato. Colacite (2015) encontrou os seguintes valores de CIM: 125µg/mL para *Micrococcus luteus* e *S. aureus*; enquanto Sobrinho e colaboradores (2010), encontrou CIM 250µg/mL para *S. aureus*. Essa diferença pode ser devido à produção diferencial dos metabólitos secundários durante as estações do ano. Além da variação sazonal, fatores como temperatura, horário da coleta, idade da espécie, são outros fatores que podem influenciar na quantidade e o tipo de metabólitos ativos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

5.2. Avaliação do crescimento bacteriano

O efeito do extrato de *A. colubrina* sobre o crescimento bacteriano também foi avaliado e os resultados obtidos estão apresentados na figura 11.



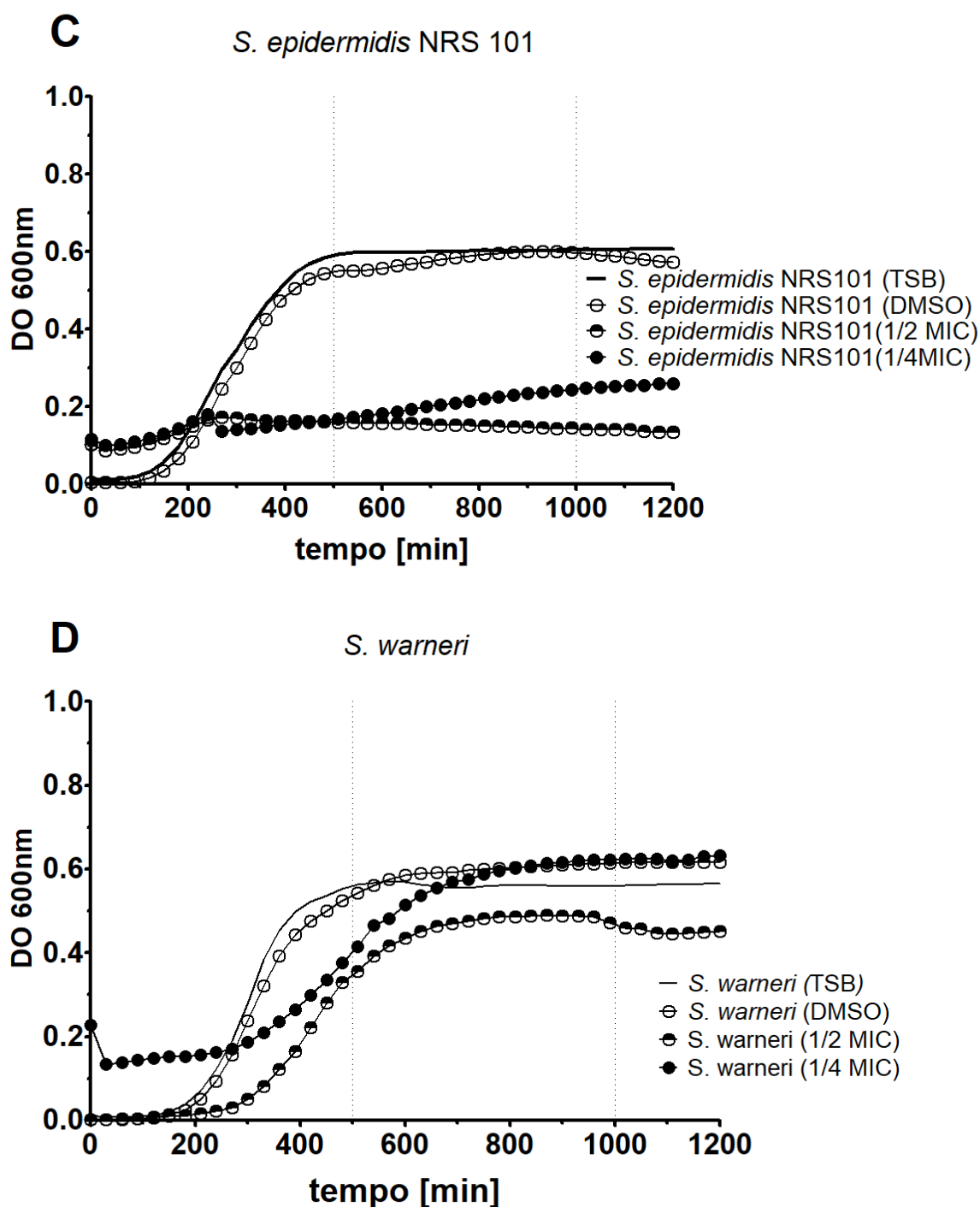


Figura 11 - Curvas de crescimento das bactérias nas condições testadas. (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 29219 (B) MRSA USA 300 (C) *Staphylococcus epidermidis* NRS 101 (D) *Staphylococcus warneri*, em meio TSBg 0,25 % em função dos valores obtidos para densidade óptica.

Fonte: Autor, 2022.

As bactérias da espécie *S. aureus*, a saber, MRSA USA 300 e *S. aureus* ATCC 29219 apresentaram um comportamento de crescimento similar. Nas condições de

controle DMSO e TSB, ambas atingiram a DO_{600nm} máxima 0,6 com aproximadamente 200 minutos, mas quando exposta ao extrato de angico nas concentrações de $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{2}$ CIM a DO_{600nm} máxima foi observada por volta de 1000 minutos, demonstrando que o extrato retardou o alcance da DO máxima pela bactéria, embora não tenha alterado o alcance da população máxima bacteriana. Para a ATCC 29219, a fase estacionária foi alcançada após 200 minutos de crescimento, já com $\frac{1}{4}$ CIM e $\frac{1}{2}$ CIM o tempo para atingir a mesma fase foi de cerca de 800 minutos. (Figura 11A).

As bactérias *S. epidermidis* e *S. warneri*, quando crescidas em DMSO e TSB, atingiram a fase estacionária em aproximadamente de 500 minutos. Para *S. epidermidis*, na condição de $\frac{1}{4}$ CIM, a DO máxima foi 0,2, sendo alcançada por volta de 1000 minutos, enquanto em $\frac{1}{2}$ CIM, DO máxima foi 0,1. Para *S. warneri* em $\frac{1}{2}$ CIM, a DO máxima foi atingida em aproximadamente 700 min e para $\frac{1}{4}$ CIM a fase estacionária foi atingida em cerca de 800 minutos. Para todas as bactérias, notou-se que os valores de $\frac{1}{2}$ CIM foram os que mais afetaram o crescimento bacteriano, tanto por diminuir o valor máximo de DO alcançada quanto por retardarem o tempo para que as bactérias alcancem a DO máxima. Esse resultado demonstra que o extrato de angico possui um efeito sobre o crescimento bacteriano que pode ser explorado como potencial terapêutico, pois ao reduzir o valor máximo de DO alcançado pela bactéria, demonstra que este extrato pode diminuir a população microbiana total e/ou retardar o crescimento bacteriano. Em ambos os casos, podemos vislumbrar um cenário positivo para a utilização desse extrato para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias, pois em ambos os casos, a utilização do extrato poderia oferecer um cenário favorável para debelar a infecção, pois a tanto a diminuição da quantidade total de bactérias quanto o retardamento para alcançar um limiar de densidade bacteriana podem fornecer ao sistema imunológico do hospedeiro, tanto mais tempo quanto uma maior facilidade para agir. Além disso, esse mesmo cenário pode ser vislumbrado para a utilização do extrato em combinação com antibióticos.

De acordo com a Figura 11, observa-se também que, à exceção de *S. warneri*, todas as demais bactérias, tiveram uma discreta diminuição no alcance da DO máxima quando na presença de DMSO, o que poderia-ser esperado porque alguns estudos já confirmaram essa atividade antimicrobiana desse veículo (CORRÊA et al. 1981; JACOB, 1982; OSTROSKY, 2008; FARIAS et al., 2018). O DMSO é bastante utilizado na microbiologia devido a sua capacidade anfipática, isso faz com que ele tenha maior

capacidade de dissolver certos antibióticos ou outros compostos, como os extratos vegetais além de potencializar a ação destes, isso devido a capacidade de facilitar o transporte através de membranas biológicas, fazendo com que a molécula alcance mais facilmente seu sítio de ação (FARIAS et al., 2018).

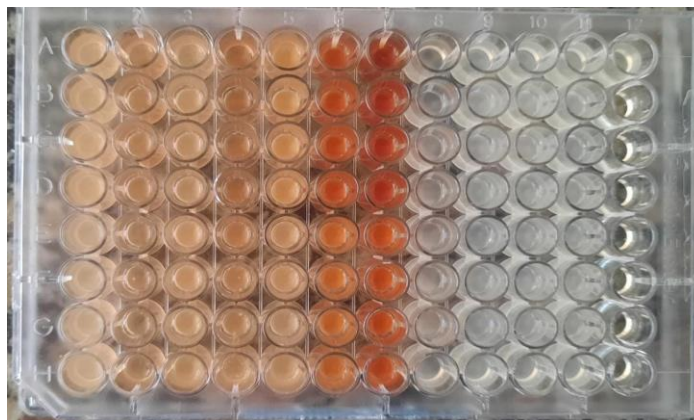


Figura 12 - Placa de 96 poços utilizada para a leitura em espectrofotômetro durante 20 horas.

Fonte: Autor, 2022.

O efeito do extrato etanólico de *A. colubrina* sobre a velocidade de crescimento (μ) de *Staphylococcus spp.* também foi avaliado (Tabela 3). Observa-se que $\frac{1}{2}$ CIM do extrato reduz significativamente as velocidades de crescimento das bactérias MRSA USA 300 *S. warneri* e *S. aureus* ATCC 29219. O valor de $\frac{1}{4}$ de CIM diminuiu ainda mais o valor de μ calculado para MRSA USA 300 e *S. warneri*, mas não para *S. aureus* ATCC 29219.

Os resultados encontrados, demonstram que as concentrações testadas do extrato de angico podem interferir na fase logarítmica e estacionária do crescimento dos isolados testados. A ação do extrato em diminuir a velocidade de crescimento de microrganismos podem contribuir para uma possível utilização em associação com drogas, por agir diretamente na fase de crescimento logarítmica, de modo a diminuir a virulência e auxiliar na ação do antibiótico (XIAO et al., 2020). Já foi comprovado que a associação do extrato de *A. colubrina* é capaz de potencializar a atividade dos antibióticos neomicina e amicacina contra cepas de *S. aureus* e MRSA (BARRETO et al., 2016).

Tabela 3 - Velocidade de crescimento (μ) de bactérias expostos às concentrações do extrato.

	<i>S. aureus</i> ATCC 29219	MRSA USA 300	<i>S. epidermidis</i> NRS 101	<i>S. warneri</i>
	μ médio	μ médio	μ médio	μ médio
TSB	0,0221	0,0196	0,0152	0,0154
DMSO	0,0238	0,0221	0,0182	0,0176
1/2 CIM	0,0053*	0,0159*	N/C	0,0112*
1/4 CIM	0,0070*	0,0046**	N/C	0,0050**

*Redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pela análise significativa em Anova, realizado no programa GraphPad Prism versão 5; ** Redução estatística maior que em *; N/C = Não Calculado.

Fonte: Autor. 2022.

Ao longo das fases do crescimento estafilocócico há um acúmulo de fatores que induzem o surgimento de um grupo de células persistentes que são menos responsivas à ação de antibióticos (CHANG et al., 2020). Esses fatores de indução de persistência atingem uma concentração ótima a partir da DO600 de 0,5 (CURRY et al., 2021). O extrato de angico, ao reduzir a velocidade de crescimento e a DO600 máxima das bactérias testadas neste estudo, pode estar contribuindo com a redução da população de células persistentes.

Esse presente trabalho pode ser tornar pioneiro em análise de velocidade de crescimento, pois na presente literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo, com avaliação da influência do extrato do caule de *A. colubrina* e de nenhum outro extrato de planta, sobre a velocidade de crescimento de bactérias. Com essa avaliação, pesquisadores podem acabar incluindo esse teste em suas pesquisas de modo a enriquecer ainda mais seus trabalhos em meio científico, ao analisar atividade antimicrobiana de extratos de plantas e outros compostos que venham a ser adicionados ao meio microbiológico.

5.3. Avaliação da atividade sobre o biofilme bacteriano

O biofilme é um importante fator de virulência estafilocócico, pois contribui com a evasão do sistema imune e menor susceptibilidade ao tratamento com antibióticos (Wu et al., 2019). As células dentro da comunidade bacteriana estruturadas dentro do biofilme possuem uma capacidade de resistir aos antibióticos de até 1000 vezes maior do que células planctônicas (MELCHIOR et al., 2006). Em âmbito hospitalar essa característica é especialmente preocupante devido a capacidade das espécies de *Staphylococcus* formar biofilme em dispositivos médicos (WALKER, MOORE, 2014).

Diante dessa problemática, pesquisas que busquem alternativas que possam inibir a formação e destruição do biofilme, têm sido cada vez mais visadas. Nesse sentido, os extratos de plantas e seus metabólitos secundários se apresentam como uma possível alternativa. (BOLINGON et al., 2013; REEN et al., 2018; SAMPATHKUMAR et al., 2019). E por isso, a atividade antibiofilme do extrato de angico foi testada e os resultados estão descritos na Figura 13.

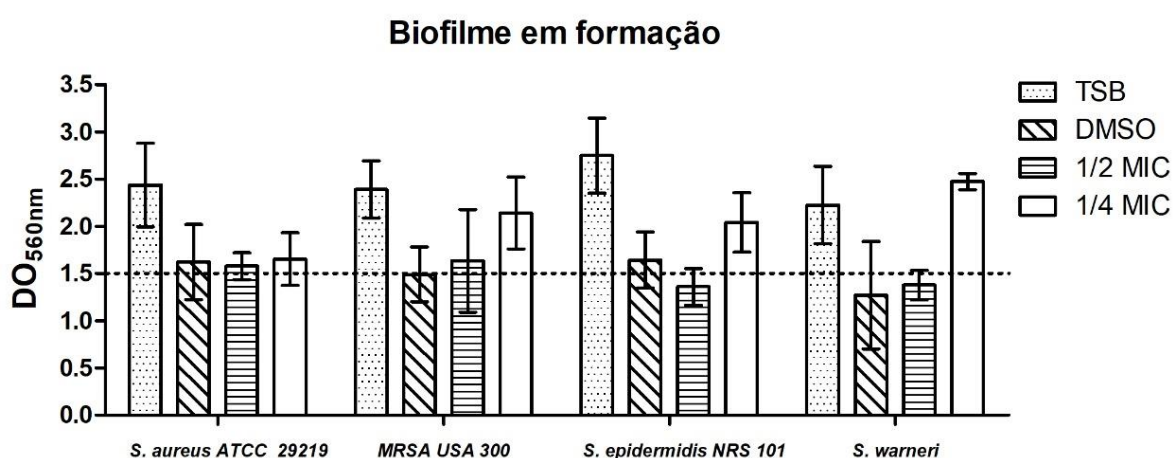


Figura 13 – Avaliação da atividade do extrato de *A. colubrina* sobre a produção de biofilme nas estirpes testadas. O gráfico apresenta a quantificação da formação de biofilme por meio da absorbância à 560nm das bactérias: *S. aureus* ATCC 29219, MRSA USA 300, *S. epidermidis* NRS 101, *S. warneri* na presença do: Veículo (DMSO), do meio de cultivo (TSBg), ½ CIM; ¼ CIM.

Fonte: Autor, 2022.

As análises indicaram que houve diferença significativa em *S. epidermidis* entre as condições:

- TSB com DMSO;
- TSB com ½ CIM.

Em geral, as condições de tratamento com DMSO e ½ CIM em todos os microrganismos apresentaram valores similares entre si, já ¼ CIM se aproximou bastante do controle com TSB para todos, exceto para *S. aureus* ATCC 29219, podendo ser um indicativo de que baixas concentrações do extrato não alteram a produção do biofilme para as bactérias analisadas.

A inibição da formação de biofilme também foi observada na pesquisa de SILVA e colaboradores (2019), que na condição de tratamento com o extrato de angico, obteve uma diminuição do biofilme em formação produzida por *Candida albicans*. Não foram encontradas na literatura ação do presente extrato contra biofilme bacteriano.

Os produtos naturais estão no centro das atenções da comunidade científica, isso devido a eficácia dos metabólitos secundários em possuir atividades contra os biofilmes. Nesse sentido, LIU e colaboradores 2022 observou que o extrato de *Macleaya cordata* devido a presença de Alcalóides, foi verificado que o isolado 6-ES é um potencial composto com atividade antimicrobiana contra o biofilme formado de MRSA, isso possivelmente por possuir ação contra a membrana e funções metabólicas, incluindo a produção de ROS.

Outra pesquisa importante nesse aspecto foi a de Mendonça (2021), onde a mesma obteve a inibição do crescimento do biofilme formação e morte do pré-formado, ou seja, descobriu que extrato hidroalcóolico da folha de *Spondias mombin* L. que possui a capacidade de impedir a aderência do microrganismo e ainda é capaz de desorganizar o já formado em *S. aureus*, na presença dos isolados flavonóides, taninos e ácidos fenólicos, Adnan (2020), relatou o efeito do extrato de *Adiantum philippense* na formação de biofilme em *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. flexneri*, atuando na inibição da adesão na superfície isso devido a compostos ativos como compostos fenólicos (ácido clorogênico), cumarina, terpenóides (betulin e poligodial).

No entanto, alguns compostos que estão presentes em extratos de plantas pode acabar agindo de forma a promover a formação de um biofilme bacteriano, proporcionando uma melhor adesão, nesse sentido a presença de compostos como as lectinas de plantas comestíveis, pode se ligar a mucosa da boca, se tornando um receptor de glicanos de bactérias, aumentar a adsorção inicial e a aderência microbiana, colaborando para esse mecanismo de virulência (OFEK et al., 2003, SANDASI et al., 2010).

No biofilme pré-formado, inicialmente se elevar a formação do biofilme, após a formação se aplicar o extrato, justamente para verificar se há atividade para desfazer esse biofilme, vale salientar que neste experimento não levar em consideração o efeito do extrato sobre o crescimento bacteriano (Ceotto-Vigoder et al., 2016). Os resultados do ensaio de inibição do biofilme pré-formado estão apresentados na Figura 14.

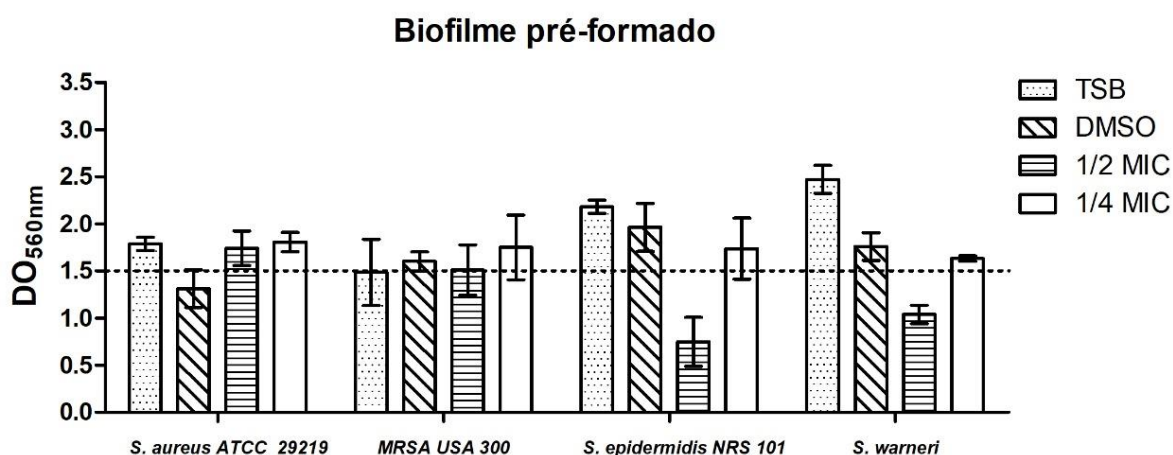


Figura 14 – Avaliação da atividade do extrato de *A. colubrina* sobre a pós- formação de biofilme nas estirpes testadas. O gráfico apresenta a quantificação da formação de biofilme por meio da absorbância à 560nm das bactérias: *S. aureus* ATCC 29219, MRSA USA 300, *S. epidermidis* NRS 101, *S. warneri* na presença do: Veículo (DMSO), do meio de cultivo (TSBg), $\frac{1}{2}$ CIM; $\frac{1}{4}$ CIM.

Fonte: autor, 2022.

A Análise estatística foi realizada como no biofilme em formação, indicando que houve diferença significativa em *S. epidermidis* entre as seguintes condições:

- TSB com $\frac{1}{2}$ CIM;
- DMSO com $\frac{1}{2}$ CIM;
- $\frac{1}{2}$ CIM com $\frac{1}{4}$ CIM.

Houve também redução estatisticamente significativa para algumas condições de *S. warneri*;

- Entre TSB e $\frac{1}{2}$ CIM;
- TSB e $\frac{1}{4}$ CIM;
- TSB e DMSO;
- DMSO e $\frac{1}{2}$ CIM.

De modo geral, notou-se que as condições envolvendo $\frac{1}{2}$ CIM sempre diminuíram mais a formação de Biofilme pré-formado, mesmo que sem significância estatística em MRSA USA 300 e *S. aureus* ATCC 29219.

Desse modo, a ação de um extrato vegetal que atue degradando o biofilme combinado com um agente antimicrobiano, pode ser uma estratégia eficaz para o combate de infecções persistentes e/ou com bactérias formadoras de biofilme. Outra característica dos biofilmes que contribui para o seu envolvimento em infecções crônicas é a potencial de dispersão pelo desprendimento de microcolônias de biofilme, que pode ocorrer devido ao efeito de fluxos biológicos ou como resultado do alcance de uma determinada densidade populacional, conhecida como quorum sensing bacteriano (Boles et al., 2008). Nesse sentido, a diminuição do patamar da quantidade máxima de bactérias alcançada na presença dos valores de $\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM (conforme apresentado na Figura 11) sugere que o extrato vegetal pode influenciar o quorum sensing bacteriano, que é um importante sistema de regulação de virulência em resposta à densidade populacional.

Dessa forma, a atuação do extrato tanto no biofilme quanto nas velocidades de crescimento e na densidade populacional, pode ser um indicativo da ação desses compostos sobre o quorum sensing estafilocócico e que, portanto, precisa ser melhor investigado para se estabelecer os seus mecanismos de funcionamento.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicaram que o extrato etanólico do caule de *A. colubrina*, apesar de não apresentar atividade antimicrobiana *in vitro*, foi capaz de reduzir a densidade populacional e a velocidade de crescimento de *S. aureus* ATCC 29219, MRSA USA300, *S. epidermidis* e *S. warneri*. Além disso, o extrato na concentração $\frac{1}{2}$ CIM também inibiu o biofilme pré-formado de *S. epidermidis* e *S. warneri*. Esses dados indicam que o extrato pode conter substâncias que possuem potencial antipatogênico contra espécies de *Staphylococcus*. Novos estudos ainda são necessários para entender melhor o modo de ação antibiofilme do extrato de caule de *A. colubrina* bem como o isolamento e a identificação dos princípios ativos com atividade antipatogênica.

A. colubrina pode ser considerada uma fonte promissora de princípios ativos para ser utilizada em associação com antibióticos, tendo em vista os presentes resultados desse trabalho, entretanto para comprovar essa hipótese estudos clínicos são necessários para confirmar sua eficácia e segurança para o uso em seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

- ADNAN.M. et al. Effect of *Adiantum philippense* Extract on Biofilm Formation, Adhesion With His Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens, e Caracterização de Metabólitos Bioativos: Uma Abordagem *silico in vitro*. **Microbiol frontal**. 13 de maio de 2020.
- AKINDUTI, P. A. et al. Antibacterial activities of plant leaf extracts against multi-antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infections. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 47, dez. 2022.
- ALVES, T. M. A. et al. **Biological screening of brazilian medicinal plants**. Men inst Oswaldo Cruz. 2000, 95, 367-373.
- ANDRADE-LIMA, D. **Plantas da caatinga**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências. 1989.
- ARVORES DO BRASIL. **Angico branco- *Anadenanthera colubrina***. 2021. Disponível em: <://www.arvores.brasil.nom.br/new/angicobranco/index.htm>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- BARRETO, H. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by extracts from *Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan var. *cebil* against multi-drug resistant bacteria. **Natural Product Research**, v. 30, n. 11, p. 1289–1292, 2 jun. 2016.
- BARRY, A. L; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. **Manual of clinical microbiology 5.ed**. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125,1991.
- BECKER P, Hufnagle W, Peters G, et al. 2001. Detection of differential gene expression in biofilmforming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational difference analysis. **Appl Environ Microbiol** 67:2958-2965.
- BEENKEN KE, Dunman PM, McAleese F, et al. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Bacteriol** 186:4665-4684.
- BELATO, K. K. et al. **Extrato de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.): ação antimicrobiana sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em resina acrílica**. p. 3, [s.d.].
- BERTO, Luciana Aranha. **Atividade antimicrobiana de extratos de plantas do cerrado brasileiro contra *streptococcus mutans***. 2014. 55 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2014. Disponível em: < https://core.ac.uk/download/pdf/296873861.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2021.

BLACK, J.G; Black, L. J. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

BOLES BR, Horswill AR. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathog** 4:e1000052.

BOLIGON, A. A. et al. Potential use of *Buddleja thyrsoides* for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees. **Journal of Apicultural Science**, v, 58, n, 2, p, 75-79, 2014.

BRAGA, Carla de Moraes. Histórico da utilização de plantas medicinais. 2011.24

BROWN MR, Allison DG, Gilbert P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growthrate related effect? **J Antimicrob Chemother** 22:777-780.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Espanha. Ed. Acribia, AS. 1991.

CAMPBELL, M. et al. *Rhamnus prinoides* (gesho) stem extract prevents co-culture biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 294–302, set. 2020.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília/Colombo: Embrapa Informação Tecnológica & Embrapa Florestas. p. 1-15. 2003.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira. Brasília, Embrapa-CNPQ; 1994. 639p.

CASTRO, Valérium Thijan Nobre Almeida. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Anadenanthera columbrina* (Vell.) Brenan e incomparação em gel dermatológico**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

CEOTTO-VIGODER, H. et al. Nisin e atividade de lisostaphin contra biofilme pré-formado de *Staphylococcus aureus* envolvidos em mastite bovina. **J Appl Microbiol**, 121: 101-114.(2016)

CHANG, J.; LEE, R. E.; LEE, W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells. **Arch Pharm Res**. v. 43, n. 6, p. 630-638, 2020. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32627141/>> Acesso em: 25 jun. 2022.

COLACITE, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanedae*, *Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 3, p. 509-516, 2015.

CORADIN, L. et al. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018.

CORRÊA, W.M. **et al.** Ensaio "in vitro" de drogas antibacterianas e associadas ao dimetil sulfóxido (DMSO). **Arq Esc Vet UFMG**, Belo Horizonte, v.33, p.449-453, 1981.

COSTERTON, J. W. et al. Biofilmes bacterianos: Uma causa comum de infecções persistentes. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CURRY, E.C et al. Detection and partial characterization of extracellular inducers of persistence in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol**. 2021 Jun;70(6).

DHANO, A. et al. Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: case report and review of literature. **BMC Infect Dis**, v. 12, n. 1, p. 270, 2012.

Eloff JN 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** 64: 711-713.

FARIAS, C. S. et al. **Potencial antimicrobiano do dimetilsulfóxido (dmsO) frente a diversas cepas bacterianas**. Anais III CONBRACIS... Campina Grande: Realize Editora, 2018. Disponível em: <<https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/41292>>. Acesso em: 06/07/2022 15:31

FLEMMING, H. C; WINGENDER, J. A matriz de biofilme. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FRICKS-LIMA, J. et al. Diferenças na formação de biofilme e resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas das vias aéreas de pacientes mecanicamente ventilados e pacientes com fibrose cística. **International journal of antimicrobial agentes**, v. 37, n. 4, p. 309-315, 2011.

GOA, Z. et al. quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 10, p. 3575-81, 2010.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, A. L. et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 185-192, set./dez. 2007.

HAUSER, A. R. **Antibióticos na prática clínica**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

HENGZHUANG, W. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, n. 9, p. 4469-4474, 2011.

HIGA, J. S. Biofilmes bacterianos vivendo em comunidade. **Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**, 2017. Disponível em: <<https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-oral/biofilmes-bacterianos-vivendo-em-comunidade/>>. Acesso em: 16 abr. 2021.

INCANI, Renzo Nino et al. *Staphylococcus warneri* meningite em um paciente com *Strongyloides stercoralis* hiperinfecção e linfoma: primeiro relato de um caso. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, p. 169-170, 2010.

JACOB, S. DMSO. Mode of action and biologic effects. **Veterinary Medicine**, p.365-376, 1982.

JEFFERSON KK, Goldmann DA, Pier GB. 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother** 49:2467-2473.

KARAM, B. R. S.; RIBEIRO, P. M. A. P. *Staphylococcus warneri*: brief literature review / *Staphylococcus warneri*: breve revisão da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 4358–4364, 16 mar. 2022.

KIILL, L. H. P; DA SILVA, T. A. Fenologia e biologia floral de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) no Município de Petrolina, PE. **Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

KLEIN, Raphael Contelli. **Caracterização molecular de estirpes de *staphylococcus aureus* de mastite bovina e atividade anti-biofilme de uma lectina tipo c**. 2014,133 f. Tese (Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

LAMERS, R. P. et al. Phylogenetic relationships among *staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evol Biol**. v. 6, n. 12, p. 171, 2012.

LEGIUS, Barbara et al. Artrite séptica devido ao *Staphylococcus warneri*: um desafio diagnóstico. **A revista de reumatologia aberta**, v. 6, p. 310, 2012.

LIU, Z. H. et al. Natural Antibacteriano e Antivirulence Alkaloids From *Macleaya cordata* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Frente Pharmacol**. 17 de março de 2022.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, ed.5, 2008.

LOWY. F.D. Resistência antimicrobiana: o exemplo de *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest**. v.111, n.9, p. 1265-73, 2003.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo. D&Z Computação gráfica e editora. 2004.

MARIÑO, P. A. Universidade federal do pampa programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas área de concentração farmácia. p. 98, 2014.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas Medicinais**. 220p. Editora Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2000.

MELCHIOR, M. B. et al. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. **Vet J**. 2006 May;171(3):398-407. [DOI](#).

MENEZES, E.V. et al. Atividade Antinociceptiva e Antimicrobiana da Casca do Caule de Psidium Cattleianum Sabine. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.17, n.4, p. 1125-1133, 2015. Disponível em: < <https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s3/1516-0572-rbpm-17-4-s3-1125.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2021.

MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

MORENO, S. et al. **Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition**. **Free Radical Research, Buenos Aires**, v.40, p.223-231, 2006.

MORIM, M.P. 2020. *Anadenanthera* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18071>>. Acesso em: 02 mai. 2021.

OFEK, I. et al. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problemas. **FEMS immunology medical microbiology**, v. 38, p. 181-191, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS).2020. **Resistência antimicrobiana**. Disponível em:<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 06 mar. 2021.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. **Nat Rev Microbiol**. v. 7, n. 8, p. 555-67. 2009

OTTO, Ml. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. In: **Staphylococcus epidermidis**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 17-31.

PEIXOTO, J. C, et al. **Flavonoides do Cerrado Brasileiro: Biossíntese, Perfil Químico e Biológico**. **Moléculas**. 2019 Ago 9;24(16):2891.

PERCIVAL, S. L. et al. Introdução a biofilmes. Biofilmes e Medicina Veterinária. **Springer**. v. 6, p. 41-69, 2011.

PERES, L. E. P. **METABOLISMO SECUNDÁRIO**. p. 26, [s.d.].

PINTO, T. J. A. et al. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu Editora, 325p, 2003.

Rabanal, R. M. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **J Ethnopharmacol** 81: 287-292, 2002.

REEN, F. J. et al. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 5, p. 20063-2073, 2018.

RIBEIRO, João Bruno Martins. **Avaliação alelopática e atividade antioxidante e quantificação de fenóis totais de diversos extratos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nativa do cerrado**. 2018, 47 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Ambientais) - Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, 2018.

SAMPATHIKUMAR, S. J. et al. Lutein: A potential and antiquorum sensing molecule from green microalga *Chorella pyrenoidosa*. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, n. March, p. 103658, 2019.

SANDASI, M. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria Monocytogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 50, p. 30-35, 2010.

SANO, E. E. et al. Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.

SANTIAGO, L. B. et al. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. Inovação científica e tecnológica em zootecnia: anais dos resumos. Maringá: SBZ: UEM, 2009. 3 f. 1 CD-ROM., 2009.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência Bacteriana no Contexto da Infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**.v.13, (n.esp) p. 64-70. 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/tce/v13nspe/v13nspea07.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

SILVA, D. R. et al. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian Oral Research**, v. 33, 2019.

SILVA, J. G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SILVA, Keila de Cássia Ferreira de et al. Avaliação do uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana como conservantes em formulações farmacêuticas. 2011.

SIQUEIRA, V. L. D. et al. Mudanças estruturais e genes expressos diferencialmente em *pseudomonas aeruginosa* Expostos à Combinação Meropenem-Ciprofloxacin. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 58, n.7, p. 3957-3967, 2014.

SOARES, L. V. et al. Frutas do Cerrado Brasileiro e seu potencial uso em produtos de panificação. Pão: Consumo, significado cultural e efeitos na saúde. **Nova Science Publisher**. p. 125-160, 2017.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia**: princípios básicos e aspectos gerais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 260 p.

SOUZA, C. N. et al. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Revista unimontes científica**. Montes Claros, v. 19, n. 2, p 51-61. 2017.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Resistência a antibióticos de bactérias em biofilmes. **The lancet**. v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

STOODLEY, P. et al. Biofilmes como comunidade diferenciadas complexas. **Annual Reviews in Microbiology**. v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

TANAKA, J.C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quim Nova**. 2005. 28(5), 834- 837.

THEISEN, J. Suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* À. p. 28, 2010.

TONG, S. Y. et al. Infecções por *staphylococcus aureus*: epidemiologia, fisiopatologia, manifestações clínicas e manejo. **Clin Microbiol Rev**. 2015 Jul; 28(3):603-61.

WALKER, J.; MOORE, G. *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: Biofilms guidelines, and practicalities. **Journal of Hospital infection**, v. 89, n. 4, p. 324-327, 2014.

WATERS EM, Rowe SE, O'Gara JP, et al. 2016. Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? **PLoS Pathog** 12:e1006012.

WALTERS MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, et al. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrob Agents Chemother** 47:317-323.

WEBER SOBRINHO, Carlos Roberto. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de Anadenanthera colubrina (Vell.)**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

WERLANG, Pablo Santos. **Simulação da curva de crescimento do mycobacterium tuberculosis utilizando sistemas multiagentes**. 2013. Dissertação de Mestrado.

WU, S. C et al. Produtos naturais que visam fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos. **J Agric Food Chem**. 2019 Dez 4;67(48):13195-13211. doi: 10.1021/acs.jafc.9b05595. Epub 2019 Nov 21. 31702908.

XIAO, S. et al. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 99, dez. 2020.

KARAM, B. R. S.; RIBEIRO, P. M. A. P. Staphylococcus warneri: brief literature review / Staphylococcus warneri: breve revisão da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 4358–4364, 16 mar. 2022.