

AYLA DAS CHAGAS ALMEIDA

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIVIRULÊNCIA DE  
EXTRATOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA  
SOBRE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A447a  
2017  
Almeida, Ayla das Chagas, 1990-  
Atividades antibacteriana e antivirulência de extratos de  
espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica sobre  
*Staphylococcus aureus* / Ayla das Chagas Almeida. – Viçosa,  
MG, 2017.  
vi, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Extratos vegetais.  
3. Antibacteriano. 4. Biofilmes. 5. Hemólises . I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica  
Aplicada. II. Título.

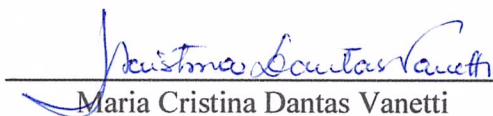
CDD 22 ed. 579.3

AYLA DAS CHAGAS ALMEIDA

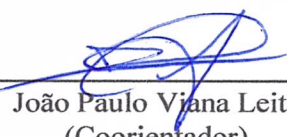
**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIVIRULÊNCIA DE  
EXTRATOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA  
SOBRE *Staphylococcus aureus***

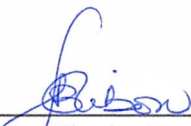
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2017.

  
\_\_\_\_\_  
Maria Cristina Dantas Vanetti

  
\_\_\_\_\_  
Luciano Gomes Fietto

  
\_\_\_\_\_  
João Paulo Viana Leite  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Andréa de Oliveira Barros Ribon  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por me dar forças e equilíbrio durante minha caminhada;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, funcionários e professores;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e auxílio financeiro, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À minha orientadora Andréa de Oliveira Barros Ribon por todos os ensinamentos que muito contribuíram para minha formação científica e, principalmente, pela oportunidade desta conquista;

Aos coorientadores João Paulo Viana Leite e Raphael Contelli Klein pelos ensinamentos e pela coorientação. À todos do Laboratório de Biodiversidade, em especial, à Graziela pela grande ajuda nos experimentos de prospecção fitoquímica e fracionamento e à Letícia pelas análises no HPLC-DAD.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela grande disponibilidade e pelas análises de microscopia de Força Atômica;

Aos professores Cristina Vanetti, Luciano Fietto e João Paulo Leite pelas sugestões e participação na banca examinadora;

Aos amigos do LBM pela convivência, aprendizados e risadas. Em especial, à Amanda, Ananda, Alex, Dani, Patrícia, Silvana e Vanessa por toda ajuda durante o mestrado, conselhos e companhia. Vocês foram um grande presente de Viçosa;

À minha família, em especial minha mãe, por todo amor e confiança, minha irmã, pelo carinho e apoio incondicional. Vocês são o meu alicerce! Ao Daniel, por toda ajuda, companheirismo e amor.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	3
<b>Capítulo I</b> .....	4
<b>RESUMO</b> .....	5
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	8
<b>Microorganismos e condições de cultivo</b> .....	8
<b>Material vegetal</b> .....	8
<b>Teste de inibição em ágar</b> .....	8
<b>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais</b> .....	9
<b>Prospecção fitoquímica, fracionamento e impressão digital do extrato</b> .....	9
<b>Efeito do extrato vegetal sobre o crescimento de <i>S. aureus</i></b> .....	10
<b>Microscopia de força atômica (AFM)</b> .....	10
<b>Extração de proteínas secretadas por <i>S. aureus</i></b> .....	10
<b>Atividade antimicrobiana <i>in vivo</i></b> .....	10
<b>Análises estatísticas</b> .....	11
<b>RESULTADOS</b> .....	12
<b>Triagem dos extratos quanto a atividade antimicrobiana</b> .....	12
<b>Prospecção, fracionamento, impressão digital e determinação da CIM</b> .....	15
<b>Efeito do extrato vegetal 11FO d sobre <i>S. aureus</i> ATCC 29213</b> .....	17
<b>Microscopia de força atômica</b> .....	17
<b>Atividade antimicrobiana <i>in vivo</i></b> .....	19
<b>DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22

<b>Capítulo II</b> .....	26
<b>RESUMO</b> .....	27
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>Microrganismos e condições de cultivo</b> .....	30
<b>Material vegetal</b> .....	30
<b>Efeito dos extratos vegetais sobre a formação do biofilme</b> .....	30
<b>Efeito dos extratos vegetais em ensaio de hemólise</b> .....	31
<b>Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais e fracionamento</b> .....	31
<b>Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos vegetais</b> .....	32
<b>Efeito de extratos vegetais sobre o crescimento bacteriano</b> .....	32
<b>RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)</b> .....	32
<b>Análises estatísticas</b> .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	34
<b>Ensaio antivirulência</b> .....	34
<b>Prospecção fitoquímica, fracionamento e ensaios antivirulência</b> .....	34
<b>Efeito dos extratos 6GO e 9GO sobre o crescimento de <i>S. aureus</i></b> .....	39
<b>Efeito de 6GO e 9GO sobre a expressão dos genes <i>hla</i> e <i>RNAlII</i></b> .....	43
<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	50

## RESUMO

ALMEIDA, Ayla das Chagas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Atividades antibacteriana e antivirulência de extratos de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica sobre *Staphylococcus aureus***. Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: João Paulo Viana Leite e Raphael Contelli Klein.

*Staphylococcus aureus* é um patógeno que causa diferentes patologias em humanos e animais. A bactéria produz vários fatores de virulência que desempenham papel determinante no estabelecimento das infecções e intoxicações. O desenvolvimento de novas estratégias de combate às bactérias é necessário, visto o crescente aumento mundial da resistência aos antibióticos convencionais. Nos últimos anos, tem se questionado se promover a diminuição na produção de toxinas, fatores de secreção e adesão não seria uma estratégia eficaz no combate a infecção. A Mata Atlântica é um importante bioma para a pesquisa de compostos bioativos. Pela crescente ameaça imposta às poucas áreas remanescentes corre-se o risco de perda de espécies vegetais que são fontes de produtos naturais com atividades biológicas ainda desconhecidas. Neste trabalho, avaliou-se a ação 99 extratos orgânicos e aquosos de 25 espécies arbóreas da Mata Atlântica sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Um total de 29 extratos apresentou atividade antibacteriana, com destaque para o extrato orgânico de folhas de *Maclura tinctoria* (11FO). O fracionamento biomonitorado desse extrato permitiu a obtenção da fração diclorometano (11FO d), que exibiu forte atividade *in vitro* sobre isolados veterinários de *S. aureus* e ação protetora em lagartas *Galleria mellonella* infectadas com *S. aureus* ATCC 29213. A fração 11FO d não afetou a superfície bacteriana e não promoveu danos a estrutura da membrana celular. Os 70 extratos vegetais que não tiveram atividade antibacteriana foram avaliados quanto ao potencial antivirulência. Um total de 33 extratos interferiu na atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 29213, enquanto 14 diminuíram a formação de biofilme de *S. epidermidis* NRS101 (ATCC 35983), considerada forte produtora de biofilme. Os extratos orgânicos de galhos das espécies *Casearia sylvestris* e *Siparuna guianenses* inibiram esses dois fatores de virulência. Concentrações subinibitórias desses extratos interferiram na hemólise e na formação do biofilme por isolados veterinários de *S. aureus*. A expressão do gene que codifica a  $\alpha$ -hemolisina (*hla*) e do gene *RNAIII*, regulador da expressão de fatores de virulência de *S. aureus*, também foi reduzida, confirmando o potencial dos extratos estudados.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Ayla das Chagas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Antibacterial and anti-virulence activities of extracts of native tree species of the Atlantic Forest on *Staphylococcus aureus***. Adviser: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co- advisers: João Paulo Viana Leite and Raphael Contelli Klein.

*Staphylococcus aureus* is a pathogen that causes different pathologies in humans and animals, and produces several virulence factors that play a determining role in the establishment of infections and foodborne intoxication. The development of new strategies to combat bacteria is needed, given the worldwide increase in resistance to conventional antibiotics. In recent years, it has been questioned whether promoting the decrease in toxin production, secretion, and adhesion factors would be an effective strategy for combating infection. The Atlantic Forest is an important biome for the research of bioactive compounds. Due to the growing threat posed to the few remaining areas there is a risk of loss of plant species that are sources of natural products with unexplored biological activities. In this work, the antibacterial activity of 99 organic and aqueous extracts from 25 tree species was evaluated on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Activity of 29 extracts was demonstrated, featuring the organic extracts of leaves of *Maclura tinctoria* (11FO) that showed the minimum inhibitory concentration of 0.08 mg/mL. A dichloromethane fraction (11FO d) obtained through biomonitoring fractionation showed strong in vitro activity on *S. aureus* veterinary isolates and protective action on *Galleria mellonella* caterpillars infected with *S. aureus* ATCC 29213. Fraction 11FO d did neither affect bacterial surface nor caused damage to the cell membrane. The 70 plant extracts that did not show antibacterial activity were evaluated for their putative antivirulence activities. A total of 33 extracts interfered with the hemolysis of *S. aureus* ATCC 29213, while 14 decreased *S. epidermidis* NRS101 (ATCC 35983) biofilm formation. Organic extracts of branches of *Casearia sylvestris* and *Siparuna guianenses* species inhibited both virulence factors as well as the subinhibitory concentrations tested. The expression of the  $\alpha$ -hemolysin (*hla*) encoding-gene and the *RNAIII* gene, which regulates the expression of *S. aureus* virulence factors, was also reduced, confirming the antivirulence potential of the studied extracts.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria coagulase-positiva, capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura e pH, além de ser tolerante a altas concentrações de NaCl. O alto grau de tolerância faz com que *S. aureus* tenha uma ampla distribuição, podendo ser encontrado em diversas partes do corpo humano, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, além da água, poeira e do ar. Estima-se que cerca de 30% da população seja colonizada de modo permanente com essa bactéria. As infecções causadas por *S. aureus* vão de simples afecções na pele até as mais graves, como pneumonia, osteomielite, endocardite infecciosa, síndrome do choque tóxico e sepse. Também está relacionada a intoxicações alimentares e infecções em animais.

*Staphylococcus aureus* produz uma grande variedade de fatores de virulência e as diferentes combinações desses fatores, a origem da infecção e a variabilidade da resposta imune do hospedeiro são responsáveis pelas diversas patologias causadas por esse microrganismo (Zecconi e Scali, 2013). Os fatores de virulência, como toxinas, enzimas e outras proteínas, participam dos processos de adesão celular, de captação de nutrientes e da evasão da resposta imunológica do hospedeiro. A capacidade de *S. aureus* em formar biofilmes é um dos fatores de virulência que facilitam a adesão e a colonização do patógeno, contribuindo também para a evasão das defesas imunológicas do hospedeiro. Sabe-se que bactérias que crescem em biofilmes apresentam um alto potencial em causar infecções persistentes, feridas crônicas, otite, fibrose cística e aquelas associadas com dispositivos médicos.

Os antimicrobianos exercem sua atividade pela morte ou inibição do crescimento da bactéria, que com o tempo acaba desenvolvendo mecanismos de contornar essa ação, gerando resistência. Essa resistência pode ser devida a mutações em genes específicos ou pela aquisição de elementos extra-cromossomais via transferência horizontal, como plasmídeos e ilhas de patogenicidade. Nos últimos anos, tem se questionado se desarmar o patógeno pela diminuição na produção de toxinas, fatores de secreção e adesão não seria mais eficaz no combate a infecção (Rasko e Sperandio, 2010). Desta forma, uma ação antivirulência reduziria a produção dos fatores de virulência sem afetar o crescimento das bactérias, o que poderia ser menos propenso ao desenvolvimento de resistência aos fármacos. Ao inibir a produção ou atuação dos fatores de virulência as bactérias seriam menos capazes de colonizar o hospedeiro.

A estratégia antivirulência pode se basear em diferentes alvos. Pode atuar na produção de toxinas de diversos patógenos como *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*,

*Clostridium* spp., nos mecanismos de adesão e no sistema especializado de secreção dos microrganismos, além na regulação dos genes de virulência (Rasko e Sperandio, 2010). Um número crescente de inibidores de virulência vem sendo descrito como importantes agentes terapêuticos (Allen *et al.*, 2014), como o Virstatin que inibe a expressão da toxina da cólera em *Vibrio cholerae* (Hung *et al.*, 2005), o fosfonosulfonato, inibidor da síntese do diidroesqualeno que impede a biossíntese de estafiloxantina, um pigmento de cor amarela que protege *Staphylococcus aureus* das espécies reativas do oxigênio (Liu *et al.*, 2008), o 2-imino-5-irilideno tiazolidinona que inibe sistemas de secreção do tipo II e III em diversos agentes patogênicos gram-negativos (Felise *et al.*, 2008) e os bicíclis 2-piridona, que se ligam às chaperonas PapC e FimH, o que impede a interação do complexo chaperona-subunidade pilus e inibe a formação de pilus em *Escherichia coli* (Pinkner *et al.*, 2006).

A Mata Atlântica é um reservatório ainda pouco explorado de produtos naturais, muitos dos quais são conhecidos pelas suas atividades biológicas e com potencial para se transformar em fármacos ou protótipos para o desenvolvimento de novas drogas. O Acheflan®, analgésico e anti-inflamatório de uso tópico, é um exemplo de fármaco oriundo da Mata Atlântica produzido com o óleo essencial extraído das folhas da erva baleeira (*Cordia verbenacea*) (Balbani *et al.*, 2009). A bioprospecção é uma importante área na descoberta de moléculas bioativas empregadas no desenvolvimento de fármacos direcionados ao tratamento de diferentes patologias como câncer, doenças neurodegenerativas e infecto-parasitárias.

Neste trabalho, realizou-se uma bioprospecção por espécies arbóreas com atividades antibacteriana e antivirulência. O trabalho consiste de dois capítulos, sendo o primeiro referente ao potencial antibacteriano de 99 extratos vegetais oriundos de uma reserva da Mata Atlântica sobre *S. aureus*, enquanto no segundo se apresenta a ação antivirulência dos extratos estudados no capítulo I que não afetaram o crescimento bacteriano.

## REFERÊNCIAS

- Allen, R.C., Papat, R., Diggle, S.P., Brown, S.P., 2014. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 300-308.
- Balbani, A.P., Silva, D.H., Montovani, J.C., 2009. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 19, 461-473.
- Felise, H.B., Nguyen, H.V.; Pfuetzner, R.A., Barry, K.C., Jackson, S.R., Blanc, M.P., Bronstein, P.A., Kline, T., Miller, S.I., 2008. An inhibitor of gram negative bacterial virulence protein secretion. *Cell Host Microbe.* 4, 325-336.
- Hung, D.T., Shakhnovich, E.A., Pierson, E., Mekalanos, J.J., 2005. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670–674.
- Liu, C.I., Liu, G.Y., Song, Y., Yin, F., Hensler, M.E., Jeng, W.Y., Nizet, V., Wang, A.H., Oldfield, E., 2008. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 319, 1391–1394.
- Pinkner, J.S., Remaut, H., Buelens, F., Miller, E., Aberg, V., Pemberton, N., Hedenstrom, M., Larsson, A., Seed, P., Waksman, G., Hultgren, S. J., Almqvist, F., 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17897–17902.
- Rasko, D.A., Sperandio, V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117–128.
- Zecconi, A., Scali, F., 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol. Lett.* 150, 12- 22.

## **Capítulo I**

**Bioprospecção de espécies arbóreas da Mata Atlântica - ação antimicrobiana de  
*Maclura tinctoria* (L.) Don. ex Steud. sobre *Staphylococcus aureus***

## RESUMO

A crescente resistência a antimicrobianos torna necessária o desenvolvimento de novas estratégias de combate às infecções bacterianas. A Mata Atlântica é um bioma de grande potencial para pesquisas com fins medicinais. Metabólitos secundários de plantas possuem propriedades biológicas promissoras para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Neste trabalho, avaliou-se a ação de extratos de 25 espécies arbóreas da Mata Atlântica sobre *Staphylococcus aureus*, um importante patógeno humano e veterinário. Dentre os 99 extratos orgânicos ou aquosos testados, 29 exibiram atividade antimicrobiana. Dezoito espécies demonstraram resultados relevantes, com concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 1 mg/mL, com destaque para *Tabernaemontana hystrix*, *Anadenanthera peregrina*, *Miconia petropolitana*, *Xilopia sericea* e *Myrciaria glazioviana*, para as quais ainda não havia sido reportada atividade antibacteriana. O extrato orgânico de folhas da espécie *Maclura tinctoria* mostrou CIM de 0,08 mg/mL sobre *S. aureus* ATCC 29213, enquanto a CIM determinada para a fração obtida com o solvente diclorometano (11FO d) foi de 0,04 mg/mL. Essa fração apresentou forte atividade sobre isolados veterinários de *S. aureus* e promoveu o aumento da sobrevivência de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com *S. aureus* ATCC 29213. A superfície bacteriana não foi alterada pela presença de 11FO d e não houve extravasamento de proteínas intracelulares, confirmando a integridade da membrana celular. Perfis exibidos pela impressão digital por HPLC/UV são característicos de uma mistura de xantonas que podem estar associados à atividade biológica.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo mundo (Hammer *et al.*, 2016) e representa a causa mais comum de infecções de pele, embora possa também estar associado à osteomielite, bacteremia e sepse (Kobayashi *et al.*, 2015). Em bovinos é a principal causa de mastite, considerada hoje a principal doença do rebanho leiteiro (Peton e Le Loir, 2014). A grande adaptação a diferentes nichos e hospedeiros é, em parte, determinada pela variedade de fatores de virulência produzidos pela bactéria que contribuem para o estabelecimento da doença.

*S. aureus* tem grande capacidade de desenvolver resistência a antimicrobianos. As primeiras cepas resistentes à penicilina surgiram em meados de 1940 e já na década de 1960, relatos descreviam o isolamento de *S. aureus* com ampla resistência a beta-lactâmicos, em especial à meticilina (MRSA) (Jevons *et al.*, 1963; Chambers e Deleo, 2009). A princípio, as infecções causadas por MRSA limitavam-se a pacientes hospitalizados (HA-MRSA), porém desde a década de 90, cepas associadas a infecções adquiridas na comunidade (CA-MRSA) passaram a ser isoladas (Otto, 2013). Existem diferentes cepas de CA-MRSA em todo mundo que normalmente são prevalentes em determinadas regiões, como a cepa ST 80 disseminada na Europa e a ST 30, na Austrália e proximidades (Otto, 2013). A cepa USA 300, associada a infecções em hospitais e na comunidade, foi inicialmente reportada nos EUA, mas vem sendo isolada nos diferentes continentes e representa uma grande preocupação mundial por sua hipervirulência, reduzida suscetibilidade a diferentes antimicrobianos e grande potencial para gerar epidemias (Tenover e Goering, 2009; Van Der Mee-Marquet, 2015).

O surgimento de cepas resistentes a antibióticos ocorre mais rapidamente do que a introdução de novas drogas no mercado, uma vez que o desenvolvimento de antimicrobianos é um processo demorado e dispendioso (Ling *et al.*, 2015, Wright, 2015). A teixobactina, descoberta recentemente por meio de um *screening* de bactérias não cultiváveis, mostrou alta atividade contra patógenos gram-positivos, incluindo MRSA e já foi usada como protótipo para a síntese de análogos revelando o quão promissor é o estudo de produtos naturais (Ling *et al.*, 2015, Jad *et al.*, 2015, Jin *et al.*, 2016, Parmar *et al.*, 2016).

As plantas também podem ser fontes naturais de compostos com propriedades antimicrobianas. Existem relatos de compostos derivados de cumarina e alcaloides com atividade *in vitro* contra MRSA e *S. epidermidis* e resultados promissores em camundongos infectados com patógenos (Hou *et al.*, 2015, Yin *et al.*, 2015). Vinte

compostos isolados de plantas foram testados contra bactérias entéricas gram-negativas, com destaque para dois compostos polifenólicos que aumentaram a sobrevivência do nematódeo *Caenorhabditis elegans* infectado com *Vibrio cholerae* (Kim *et al.*, 2015).

O bioma Mata Atlântica é o segundo maior bloco de floresta tropical do Brasil e também o segundo com maior diversidade biológica, ficando atrás apenas da Amazônia. (Mittermeier *et al.*, 2004). Considerada uma área de grande potencial para pesquisas com fins medicinais (Rovedder *et al.*, 2016), originalmente cobria 15% do território brasileiro, mas hoje pela crescente ameaça imposta às poucas áreas remanescentes corre-se o risco de perda de espécies vegetais que são fontes de produtos naturais com atividades biológicas ainda desconhecidas. Neste trabalho, foi avaliada a atividade de 99 extratos vegetais oriundos de uma reserva da Mata Atlântica sobre *Staphylococcus aureus*. Embora a atividade tenha sido comprovada para várias espécies, o estudo comprovou, *in vitro* e *in vivo*, o potencial de *Maclura tinctoria*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos e condições de cultivo

A cepa referência *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada neste trabalho, assim como as bactérias *S. aureus* 302/4, 469/4, 4130 e 4651 isoladas de animais com mastite bovina (da Silva, 2015). As bactérias foram estriadas em placas contendo BHI ágar (Fluka®) ou Müeller-Hinton (MH, Himedia®) um dia anterior ao experimento. Todos os isolados utilizados foram estocados a -80°C em meio BHI contendo 20% de glicerol.

### Material vegetal

O material vegetal foi coletado da Mata Atlântica da Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA), conhecida por Mata do Paraíso, que pertence à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. As exsiccatas de todas as espécies do acervo da biblioteca de extratos foram depositadas no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG).

A partir do material vegetal foi construída uma extratoteca por integrantes do grupo de pesquisa BIOPROS, UFV- MG (Almeida, 2015), onde extratos orgânicos (diclorometano e metanol 1:1) e aquosos de cada espécie foram produzidos a partir de galhos e folhas, secos e pulverizados. Estoques de todos os extratos vegetais foram preparados na concentração de 50 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec®) para uso nos testes biológicos. As espécies foram numeradas aleatoriamente e os extratos referidos pelas siglas FO, extrato orgânico de folhas, FA, extrato aquoso de folhas, GO, extrato orgânico de galhos e GA, extrato aquoso de galhos.

### Teste de inibição em ágar

A atividade antimicrobiana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar pelo método *hole plate*, conforme recomendações do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Foi feita uma suspensão de *S. aureus* ATCC 29213, correspondente a 0,5 McFarland, que foi espalhada sobre meio ágar MH em uma concentração final de  $10^6$  UFC/mL. Furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos, onde foram adicionados 20 µL dos extratos na concentração de 50 mg/mL. Como controles utilizaram-se 10 µL de DMSO e 10 µL de ampicilina a 10 mg/mL (Sigma®, A9518). As placas foram mantidas a 4 °C durante 4 h e a 37 °C por 24 h. Os halos de inibição medidos em milímetros. Os testes foram realizados em três repetições biológicas.

### **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais**

A concentração mínima inibitória foi realizada em placas de 96 poços, conforme recomendações Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Os poços foram preenchidos com caldo MH, com concentrações de extratos variando de 0 até 10 mg/mL e  $10^5$  UFC/mL da suspensão bacteriana. Para o controle do crescimento, 100  $\mu$ L do inóculo foram adicionados a 100  $\mu$ L do caldo MH. O controle negativo consistiu de caldo MH acrescido de DMSO no volume correspondente a maior concentração de extrato testada. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, foram adicionados 5  $\mu$ L de *p*-iodo-nitrotetrazolium violeta (INT, I8377, Sigma®) a 2 mg/mL. Após incubação de 2 h, a CIM foi definida como a menor concentração do extrato no qual visualmente não se observou a formação da cor púrpura indicativa de viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em três repetições biológicas e todas as cepas de *S. aureus* citadas anteriormente foram usadas.

### **Prospecção fitoquímica, fracionamento e impressão digital do extrato**

O fracionamento por partição líquido-líquido foi realizado para aquele extrato seco que apresentou melhor atividade antimicrobiana. Para isto, 1g do extrato bruto foi ressuspensionado em água, em seguida, transferido para um funil de separação, iniciando-se a partição com hexano (h). Após a retirada da fração hexânica, foram adicionados sucessivamente os solventes diclorometano (d), acetato de etila (ac), butanol (b), restando no final uma fase aquosa (a). Todas as frações foram submetidas á completa retirada do solvente em evaporador rotatório, sendo então submetidos a análises fitoquímicas e biológicas

A prospecção fitoquímica foi realizada por cromatografia de camada fina em placas revestidas com sílica gel (Whatman®, Maidstone, Kent, Inglaterra). O extrato bruto e as frações foram pesquisados quanto a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, óleos essenciais, saponinas, alcaloides, triterpeno/esteroides, utilizando padrões e reveladores específicos para cada classe de metabólitos secundários (Wagner *et al.*, 1984).

A impressão digital foi feita por HPLC com detector DAD Shimadzu Prominence (bomba LC-20AD, detector SPD-M20A, forno CTO-20A, software Lab Solutions) para obter o perfil fitoquímico da planta. Como fase móvel, foram utilizados os solventes A (água) e B (acetonitrila), com o seguinte gradiente: 70% B em 0,01 min, 90% B em 15 min, 95% B em 16 min e 70% B em 17 min, a um fluxo total de 0,700 mL/min e

temperatura de 35 °C. O volume de injeção foi 5 µL e o detector de UV foi ajustado a 264 nm. O comprimento e o diâmetro da coluna são 25 e 4,6 cm, respectivamente.

### **Efeito do extrato vegetal sobre o crescimento de *S. aureus***

Uma curva de crescimento bacteriano, com o inóculo inicial de 10<sup>6</sup> UFC/mL foi realizada na ausência e na presença do extrato, em diferentes valores de CIM. Em tempos específicos, alíquotas foram retiradas, diluídas seriadamente e plaqueadas em BHI para determinação da UFC/mL. O experimento foi realizado em três repetições biológicas.

### **Microscopia de força atômica (AFM)**

A cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi crescida em meio BHI a 37 °C por 12 h, centrifugada (2100 x g por 15 min), lavada três vezes em tampão fosfato (5 mM, pH 6,5) e ressuspendida no mesmo tampão a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em seguida, foi adicionado o extrato vegetal na CIM (0,04 mg/mL), por 4 h a 37 °C. Como controle, foram utilizadas células sem o extrato. Seguiu-se a centrifugação (6200 x g por 15min) de 1 mL de células, que foram utilizadas para fazer um esfregaço em lâminas com mica. Essas foram submetidas à microscopia de força atômica no modo contato intermitente - IT-AFM (NT-MDT Co., Ntegra Prima, Russia) ( Santana *et al.*, 2011).

### **Extração de proteínas secretadas por *S. aureus***

A cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi cultivada em meio BHI a 37 °C por 14 h, antes que o extrato vegetal na CIM (0,04 mg/mL), fosse adicionado por 4 h. Bactérias sem adição do extrato foram utilizadas como controle. O sobrenadante da cultura foi obtido por centrifugação (3584 x g por 5 min), e tratado com 10% TCA por 30 min no gelo. As proteínas foram coletadas após centrifugação (81 x g, a temperatura de 4 °C, por 30 min) e o *pellet* foi lavado com 5% TCA e acetona gelada por duas vezes. Após seco, esse foi ressuspendido em 25 µL de tampão de solubilização (ureia 7M; tiourea 2M e CHAPS 2%) e 14 µL de cada amostra foram analisados por SDS-PAGE 12,5% (Laemmli *et al.*, 1970). O gel foi corado com Comassie blue R-250 por 30 min sob agitação branda. O mesmo gel foi posteriormente submetido à coloração com nitrato de prata após passar por etapa de descoloração (Schägger, 2006).

### **Atividade antimicrobiana *in vivo***

A criação de *Galleria mellonella* foi feito como descrita por Silva (2016). Lagartas pesando entre 250 - 350 mg foram infectadas com *S. aureus* ATCC 29213 na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Após 2 h, foram injetados 10 µL do extrato vegetal, diluído em PBS para

uma dose correspondente a 200 mg/kg. A cada 24 h aplicou-se uma dose do extrato num total de cinco injeções e as lagartas foram monitoradas por 96 h após a última aplicação. Da mesma forma, foi feito para o grupo de lagartas que recebeu gentamicina a 200 mg/kg (Sigma®, G1397). As lagartas foram mantidas em ambiente escuro a 37 °C. Por grupos controles, utilizaram-se lagartas inoculadas somente com PBS, extrato vegetal ou DMSO. Para cada grupo foram utilizadas 10 lagartas e os experimentos foram realizados em triplicatas.

### **Análises estatísticas**

Os dados de sobrevivência foram realizados pelo método de Kaplan–Meier e a comparação entre o grupo controle e o grupo com o tratamento foi feito pelo teste Log-rank. Foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ . Para a análise foram consideradas 30 lagartas, correspondentes às triplicatas.

## RESULTADOS

### Triagem dos extratos quanto a atividade antimicrobiana

No teste de inibição em ágar foi avaliada a ação de 99 extratos vegetais sobre *S. aureus* ATCC 29213 dos quais 29 exibiram atividade antimicrobiana visualizada pelos diferentes tamanhos de halos de inibição (Tabela 1). O maior halo de inibição (19 mm) foi registrado com o extrato de *Miconia petropolitana* (24FO). Todos os extratos preparados a partir de *Anadenanthera pergrina* levaram à formação de zonas de inibição que variaram de 9 a 13 mm; Em *Maclura tinctoria*, ausência de crescimento foi vista somente nos extratos provenientes das folhas (11FA e 11FO). Três dos quatro extratos preparados com as espécies *Bathysa nicholsonii*, *Piptadenia gonoacantha*, *Tabernaemontana hystrix*, *Xilopia sericea* e *Myrciaria glazioviana* também mostraram atividade sobre *S. aureus*. Os extratos que produziram halos de inibição foram selecionados para determinar a CIM, que variou de 0,08 a 10,0 mg/mL (Tabela 1). O extrato orgânico 11FO preparado de folhas de *Maclura tinctoria* foi o que apresentou menor CIM e, por isso, foi escolhido para os ensaios posteriores.

**Tabela 1.** Extratos vegetais avaliados neste trabalho quanto à atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Extrato	Família	Espécie	Nº Herbário VIC	Halo médio (mm)	CIM (mg/mL)
2FO	Caesalpinioideae	<i>Senna macranthera</i>	40.533	0,0	-
2FA		<i>Senna macranthera</i>		0,0	-
2GO		<i>Senna macranthera</i>		0,0	-
2GA		<i>Senna macranthera</i>		0,0	-
4FO	Mimosoideae	<i>Anadenanthera pergrina</i>	40.213	10,0 ± 1,0	0,62
4FA		<i>Anadenanthera pergrina</i>		13,0 ± 1,0	0,31
4GO		<i>Anadenanthera pergrina</i>		9,0 ± 1,4	0,62
4GA		<i>Anadenanthera pergrina</i>		9,6 ± 0,6	0,62
6FO	Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i>	40.409	0,0	-
6FA		<i>Siparuna guianensis</i>		0,0	-
6GO		<i>Siparuna guianensis</i>		0,0	-
6GA		<i>Siparuna guianensis</i>		7,0 ± 0,0	2,5
8FO	Rubiaceae	<i>Bathysa nicholsonii</i>	40.273	6,6 ± 1,1	10,0
8FA		<i>Bathysa nicholsonii</i>		6,3 ± 0,6	1,25
8GO		<i>Bathysa nicholsonii</i>		9,3 ± 0,6	0,62
8GA		<i>Bathysa nicholsonii</i>		0,0	-

**Tabela 1.** Continuação.

Extrato	Família	Espécie	N° Herbário VIC	Halo médio (mm)	CIM (mg/mL)
9FO	Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	40.390	0,0	-
9FA		<i>Casearia sylvestris</i>		0,0	-
9GO		<i>Casearia sylvestris</i>		0,0	-
9GA		<i>Casearia sylvestris</i>		0,0	-
10FO	Moraceae	<i>Ficus eximia</i>	40.263	0,0	-
10FA		<i>Ficus eximia</i>		0,0	-
10GO		<i>Ficus eximia</i>		0,0	-
10GA		<i>Ficus eximia</i>		0,0	-
11FO	Moraceae	<i>Maclura tinctoria</i>	40.269	15,0 ± 1,0	0,08
11FA		<i>Maclura tinctoria</i>		10,0 ± 1,7	1,25
11GO		<i>Maclura tinctoria</i>		0,0	-
11GA		<i>Maclura tinctoria</i>		0,0	-
12FO	Sapindaceae	<i>Allophylus sericeus</i>	40.333	0,0	-
12FA		<i>Allophylus sericeus</i>		0,0	-
12GO		<i>Allophylus sericeus</i>		0,0	-
12GA		<i>Allophylus sericeus</i>		0,0	-
14FO	Meliaceae	<i>Trichilia pallida</i>	40.287	0,0	-
14FA		<i>Trichilia pallida</i>		0,0	-
14GO		<i>Trichilia pallida</i>		0,0	-
14GA		<i>Trichilia pallida</i>		0,0	-
16FO	Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i>	40.227	0,0	-
16FA		<i>Guapira opposita</i>		0,0	-
16GO		<i>Guapira opposita</i>		0,0	-
16GA		<i>Guapira opposita</i>		0,0	-
18FO	Malvaceae	<i>Ceiba speciosa</i>	40.342	0,0	-
18FA		<i>Ceiba speciosa</i>		0,0	-
18GO		<i>Ceiba speciosa</i>		6,6 ± 0,6	1,25
18GA		<i>Ceiba speciosa</i>		0,0	-
20FO	Euphorbiaceae	<i>Joannesia princeps</i>	40.481	0,0	-
20FA		<i>Joannesia princeps</i>		0,0	-
20GO		<i>Joannesia princeps</i>		0,0	-
20GA		<i>Joannesia princeps</i>		6,0 ± 0,0	2,5
22FO	Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i>	40.485	0,0	-
22FA		<i>Alchornea glandulosa</i>		7,3 ± 1,1	1,25
22GO		<i>Alchornea glandulosa</i>		0,0	-
22GA		<i>Alchornea glandulosa</i>		0,0	-
23FO	Annonaceae	<i>Annona sylvatica</i>	40.508	0,0	-
23FA		<i>Annona sylvatica</i>		0,0	-

**Tabela 1.** Continuação.

Extrato	Família	Espécie	N° Herbário VIC	Halo médio (mm)	CIM (mg/mL)
23GO	Annonaceae	<i>Annona sylvatica</i>	40.508	0,0	-
23GA		<i>Annona sylvatica</i>		0,0	-
24FO	Melastomataceae	<i>Miconia petropolitana</i>	40.397	19,0 ± 0,0	0,31
24FA		<i>Miconia petropolitana</i>		0,0	-
24GO		<i>Miconia petropolitana</i>		14,0 ± 1,73	0,31
24GA		<i>Miconia petropolitana</i>		0,0	-
28FO	Mimosoideae	<i>Piptadenia gonoacantha</i>	40.225	0,0	-
28FA		<i>Piptadenia gonoacantha</i>		10,0 ± 0,0	0,62
28GO		<i>Piptadenia gonoacantha</i>		8,0 ± 0,0	1,25
28GA		<i>Piptadenia gonoacantha</i>		8,3 ± 1,1	1,25
29FO	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana hystrix</i>	40.611	10,0 ± 1,0	0,15
29FA		<i>Tabernaemontana hystrix</i>		8,6 ± 0,6	1,25
29GO		<i>Tabernaemontana hystrix</i>		12,6 ± 0,6	1,25
29GA		<i>Tabernaemontana hystrix</i>		0,0	-
30FO	Rubiaceae	<i>Psychotria vellosiana</i>	40.282	0,0	-
30FA		<i>Psychotria vellosiana</i>		0,0	-
30GO		<i>Psychotria vellosiana</i>		0,0	-
30GA		<i>Psychotria vellosiana</i>		0,0	-
32FO	Annonaceae	<i>Xilopia sericea</i>	40.432	0,0	-
32FA		<i>Xilopia sericea</i>		11,3 ± 0,6	0,31
32GO		<i>Xilopia sericea</i>		10,0 ± 0,0	0,62
32GA		<i>Xilopia sericea</i>		10,3 ± 0,6	0,31
34FO	Solanaceae	<i>Solanum cernuum</i>	40.323	0,0	-
34GO		<i>Solanum cernuum</i>		0,0	-
34GA		<i>Solanum cernuum</i>		0,0	-
40FO	Phytolaccaceae	<i>Seguiera langsdorffii</i>	40.202	0,0	-
40FA		<i>Seguiera langsdorffii</i>		0,0	-
40GO		<i>Seguiera langsdorffii</i>		0,0	-
40GA		<i>Seguiera langsdorffii</i>		0,0	-
44FO	Malvaceae	<i>Luehea grandiflora</i>	40.338	0,0	-
44FA		<i>Luehea grandiflora</i>		0,0	-
44GO		<i>Luehea grandiflora</i>		11,3 ± 0,6	0,62
44GA		<i>Luehea grandiflora</i>		0,0	-
47FO	Cercideae	<i>Bauhinia fortificata</i>	40.549	0,0	-
47FA		<i>Bauhinia fortificata</i>		0,0	-
47GO		<i>Bauhinia fortificata</i>		0,0	-
47GA		<i>Bauhinia fortificata</i>		0,0	-
50FO	Faboideae	<i>Dalbergia nigra</i>	40.498	0,0	-

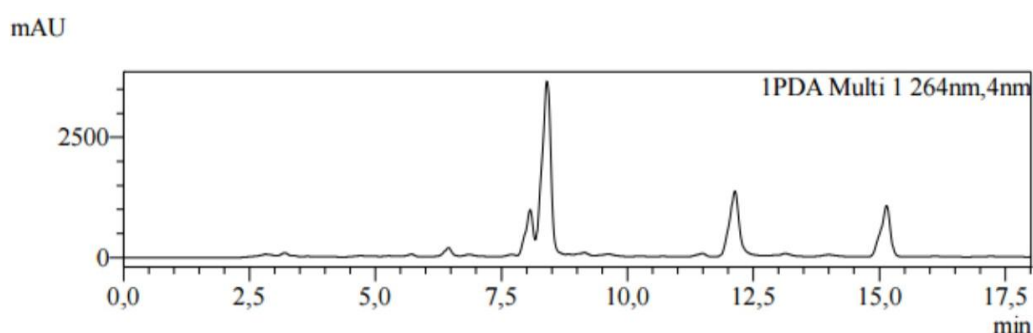
**Tabela 1.** Continuação.

Extrato	Família	Espécie	N° Herbário VIC	Halo médio (mm)	CIM (mg/mL)
50FA	Faboideae	<i>Dalbergia nigra</i>	40.498	9,6 ± 0,6	0,62
50GO		<i>Dalbergia nigra</i>		0,0	-
50GA		<i>Dalbergia nigra</i>		0,0	-
51FO	Myrtaceae	<i>Myrciaria glazioviana</i>	40.584	0,0	-
51FA		<i>Myrciaria glazioviana</i>		11,3 ± 0,6	0,62
51GO		<i>Myrciaria glazioviana</i>		12,6 ± 0,6	0,62
51GA		<i>Myrciaria glazioviana</i>		10,5 ± 0,7	0,31

FO, extrato orgânico obtido de folhas; FA, extrato aquoso obtido de folhas; GO, extrato orgânico obtido de galhos; GA, extrato aquoso obtido dos galhos.

### Prospecção, fracionamento, impressão digital e determinação da CIM

A prospecção fitoquímica do extrato bruto orgânico 11FO revelou a presença de cumarinas, flavonóides, óleos essenciais, saponinas, taninos, e triterpeno/esteroides (Tabela 2). As frações obtidas com os solventes, hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol ou água foram avaliadas quanto a CIM de *S. aureus* ATCC 29213, e observou-se que o valor obtido com a fração diclorometano (11FO d) foi superior ao extrato bruto, o que estimulou novos ensaios (Tabela 3). A prospecção fitoquímica dessa fração registrou as mesmas classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto (Tabela 2). Através da impressão digital para fração diclorometano observou-se a presença de quatro constituintes majoritários, com tempos de retenção ( $T_R$ ) de 1min para o primeiro pico observado e 1,5 min para os demais picos, assim como absorvância máxima de 263 e 330, 223 e 261, 207 e 268, e 268 e 338 nm, respectivamente (Figura 1). A CIM da fração 11FO d para isolados bovinos de *S. aureus* também foi determinada e novamente forte atividade antimicrobiana foi registrada (Tabela 3).



**Figura 1.** Impressão digital da fração diclorometano (11FO d) realizada por HPLC com detector DAD. Como fase móvel, foram utilizados os solventes, acetonitrila e água.

**Tabela 2.** Classes de metabólitos secundários identificados no extrato bruto 11FO e frações.

Classe de metabólitos secundários	Extrato bruto 11FO	Fração 11FO h	Fração 11FO d	Fração 11FO ac	Fração 11FO b	Fração 11FO a
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	X	X	X	X	X	-
Flavonoides	X	X	X	X	X	X
Óleos essenciais	X	X	X	X	-	-
Saponinas	X	-	X	X	X	X
Taninos	X	-	X	X	X	X
Triterpenos/ Esteroides	X	X	X	X	X	X

**Tabela 3.** Frações obtidas do extrato bruto 11FO e determinação da concentração inibitória mínima de cepas de *Staphylococcus aureus*

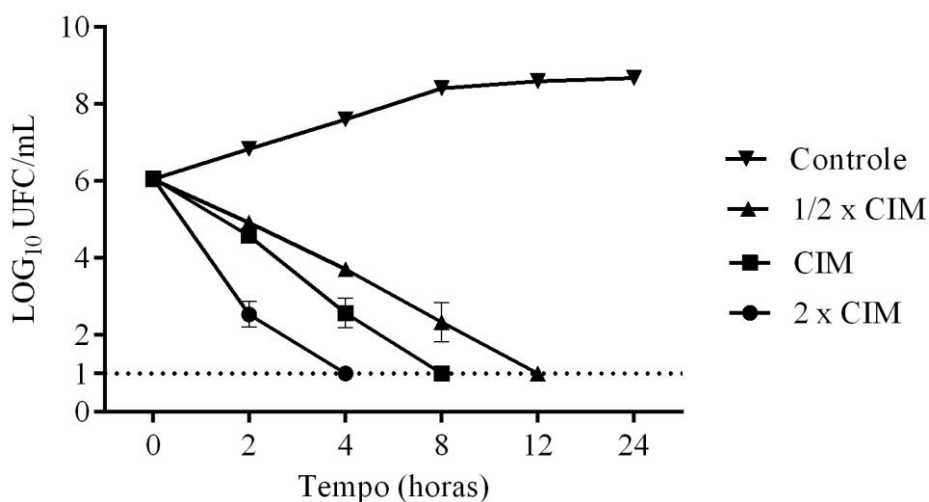
Frações	Solvente	CIM (mg/mL) ATCC 29213
11FO h	Hexano	0,31
11FO d	Diclorometano	0,04
11FO ac	Acetato de etila	0,31
11FO b	Butanol	0,15
11FO a	Água	10,0
Ampicilina		0,004
Gentamicina		0,00025

Fração	Cepas	CIM (mg/mL)
11FO d	302/4	0,01
11FO d	469/4	0,01
11FO d	4130	0,01
11FO d	4651	0,04

## Efeito do extrato vegetal 11FO d sobre *S. aureus* ATCC 29213

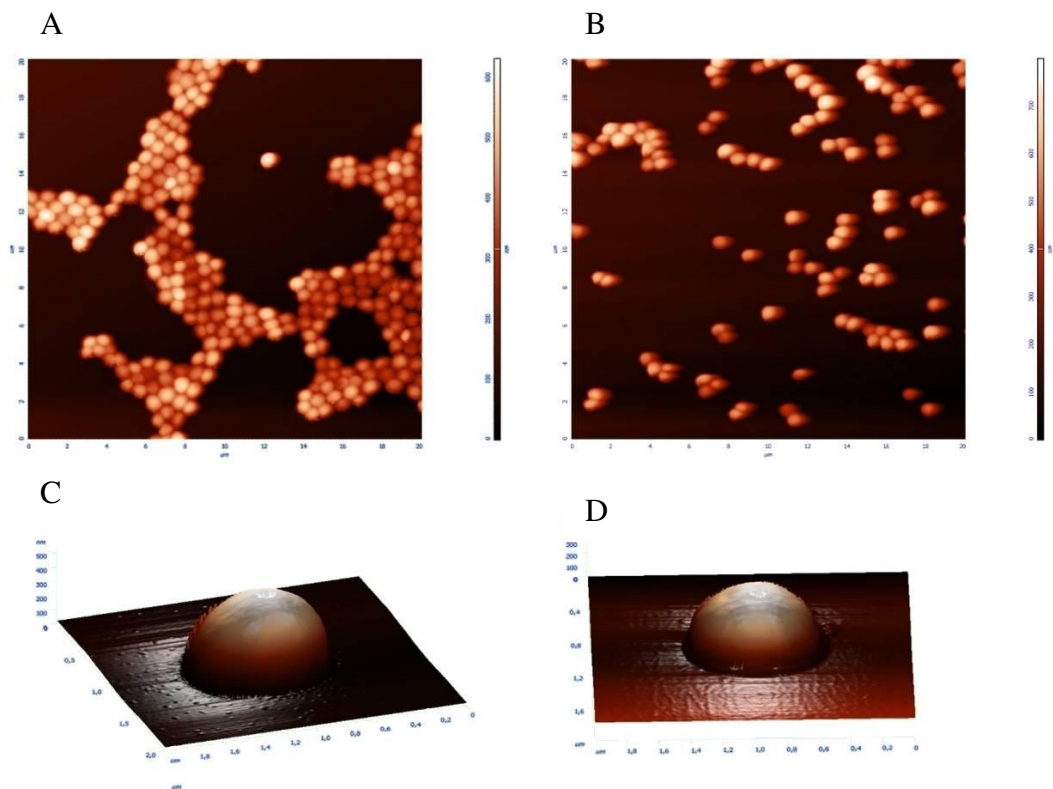
O efeito da fração diclorometano 11FO d sobre *S. aureus* ATCC 29213 foi avaliado nas concentrações equivalentes à 2X CIM, CIM e 1/2 X CIM. Após 4, 8 e 12 horas de interação com o extrato na concentração correspondente à 2 X CIM, CIM e 1/2 X CIM, respectivamente, não foi mais registrado crescimento bacteriano, o que demonstrou o efeito bactericida do extrato.



**Figura 2.** Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na presença do extrato 11FO d em diferentes concentrações inibitórias.

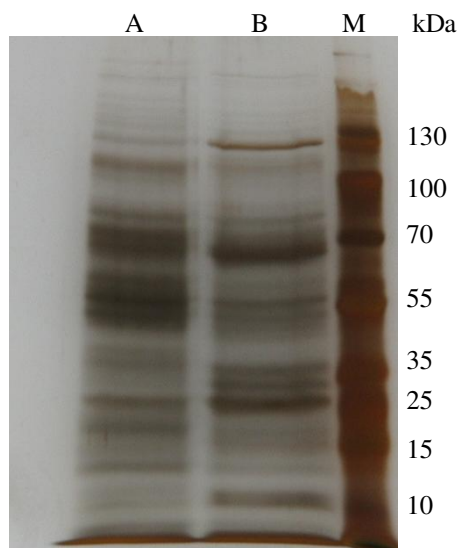
## Microscopia de força atômica

Alíquotas da suspensão bacteriana tratadas ou não com a fração 11FO d foram submetidas à microscopia de força atômica para avaliar possíveis alterações morfológicas provocadas pelo extrato. Não foi possível detectar modificações na superfície bacteriana, embora diminuição no número de bactérias após as 4 h de tratamento tenha sido observada, assim como alterações no arranjo celular (Figura 3). Não houve modificação nas dimensões celulares (1  $\mu\text{m}$  x 500 nm), mas as células tratadas com a fração perderam o arranjo característico de cocos



**Figura 3.** Imagens de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 obtidas por microscopia de força atômica. Células incubadas com a fração 11FO d durante 4 h a 37 °C (B, D) e células de *Staphylococcus aureus* como controle (A, C).

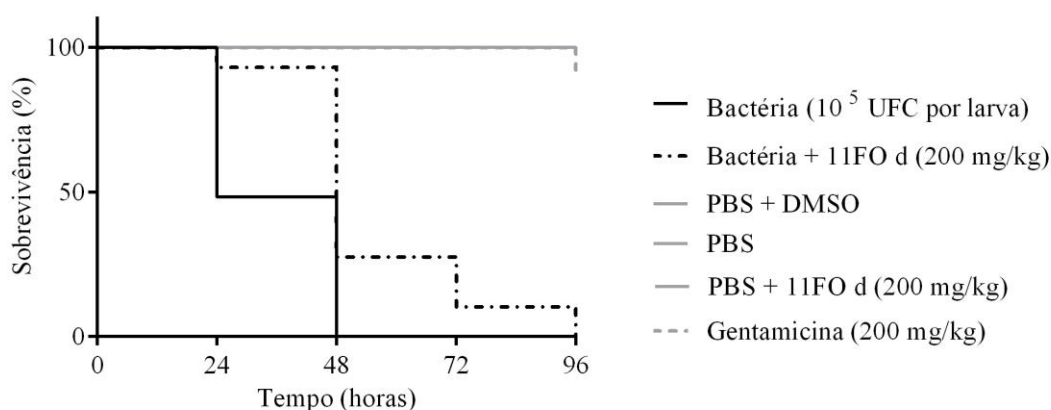
Para avaliar um possível extravasamento de proteínas para o meio extracelular, o perfil de proteínas secretadas por *S. aureus* ATCC 29213 cultivadas na presença e na ausência da fração 11FO d foi avaliado (Figura 4). Pode-se notar uma diferença no perfil protéico na presença da fração, no entanto a quantidade de proteínas parece ter se mantido a mesma, não caracterizando um processo de extravasamento de proteínas intracelulares, quando ocorreriam bandas mais intensas e em maior número.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% de proteínas secretadas por *Staphylococcus aureus* na presença (A) e na ausência (B) da fração 11FO d. Marcador (M), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa).

#### Atividade antimicrobiana *in vivo*

A fração 11FO d usada na concentração 200 mg/kg aumentou a sobrevivência de lagartas infectadas com *S. aureus* ATCC 29213 quando comparado às larvas dos grupos controles. Após 24 h, 48% das lagartas encontravam-se mortas, comparada à sobrevivência de 93% no grupo que recebeu a fração como tratamento. Após 48 h de infecção registrou-se 100% de mortalidade no grupo infectado com a bactéria e 72% no grupo que foi tratado com 11FO d. Todas as lagartas que receberam PBS, PBS mais DMSO ou PBS mais o extrato, e 90% das lagartas que receberam gentamicina a 200 mg/kg sobreviveram, após 96 h de monitoramento (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito da fração diclorometano 11FO sobre lagartas *Galleria mellonella* infectadas com *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Sobrevivência do tratamento significativamente diferente do controle ( $p < 0,001$ ; Teste Log-rank).

## DISCUSSÃO

A Mata Atlântica apresenta uma grande riqueza de espécies vegetais, sendo uma importante fonte para a descoberta de novos compostos bioativos (Balbani *et al.*, 2009). Neste trabalho, foram identificadas espécies vegetais oriundas da Mata Atlântica com potencial antibiótico. Dezoito espécies demonstraram resultados relevantes, com CIM abaixo de 1 mg/mL, com destaque para *Tabernaemontana hystrix*, *Anadenanthera peregrina*, *Miconia petropolitana*, *Xilopia sericea*, *Myrciaria glazioviana* e *Maclura tinctoria*. Não há relatos da atividade antibacteriana de algumas espécies, como *T. hystrix*, descrita apenas por sua atividade anticolinesterásica (Marinho *et al.*, 2016) e *A. peregrina*, pela propriedade antioxidante (Mensor *et al.*, 2001). Não foram encontrados estudos sobre *M. petropolitana*, embora outras espécies deste gênero tenham atividades antiparasitária, antibiótica, analgésica e antitumoral (Cunha *et al.*, 2003). Extrato de folhas da espécie *M. tinctoria* (11FO) apresentou o menor CIM dentre todos os extratos avaliados, com CIM abaixo de 0,1 mg/mL, sendo por isso, considerado um promissor agente antibiótico (Lamounier *et al.*, 2012), sendo então, selecionado para a continuidade do presente trabalho.

O gênero *Maclura* é composto por 11 espécies tropicais. No Brasil, existem apenas as espécies *Maclura tinctoria* e *Maclura brasiliensis* (Lamounier *et al.*, 2012). *Maclura tinctoria* é uma espécie arbórea, com 10 a 20 metros de altura e rápido desenvolvimento (Batillani *et al.*, 2006). Compostos isolados de extratos orgânicos da casca de *M. tinctoria* apresentaram atividade *in vitro* antioxidante (Cioffi *et al.*, 2003) e anti-HIV (Groveiss *et al.*, 2000). Extratos orgânicos de casca também exibiram atividade antibiótica sobre *Streptococcus mutans*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis*, com CIM entre 0,02 e 0,08 mg/mL (Lamounier *et al.*, 2012). Extratos etanólicos das folhas da *M. tinctoria* exibiram atividade sobre os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (El-Sohly *et al.*, 2001) e efeito sobre bactérias, com valores de CIM de 0,12 e 0,50 mg/mL sobre *S. mutans* e *P. gingivalis*, respectivamente (Alvaro *et al.*, 2015).

O fracionamento do extrato 11FO foi realizado com solventes de diferentes polaridades, que teve a finalidade de separar os diferentes compostos presentes no extrato, dependendo do seu coeficiente de partição, a fim de realizar o estudo biomonitorado. A fração diclorometano apresentou a menor CIM (0,04 mg/mL) e exibiu efeito bactericida. A ação bactericida elimina mais rapidamente o patógeno, através de sua morte, diminuindo a

probabilidade de propagação da infecção e surgimento de resistência, quando comparado aos bacteriostáticos (French, 2006).

Pela impressão digital obtida com a fração 11FO d por HPLC/UV pode-se observar a presença majoritária de quatro compostos. Todos apresentaram perfis espectrais no UV característicos de xantonas, quando analisados por detector de arraste de diodos. Uma identificação complementar dos compostos bioativos está em andamento por cromatografia líquida - espectrometria de massas (LC/MS). Trabalhos anteriores identificaram diferentes grupos de metabolitos secundários como flavonóides e xantonas, que exibiram atividades antifúngica, antiviral ou antioxidante (Groweiss *et al.*, 2000; El-Sohly *et al.*, 2001; Cioffi *et al.*, 2003). Registra-se neste trabalho a atividade biológica não apenas sobre cepa de referência, mas também sobre isolados veterinários de *S. aureus*, mostrando uma possível aplicação do composto ativo no tratamento da mastite bovina.

Normalmente, a atividade biológica de extratos vegetais é avaliada *in vitro*. Neste trabalho, *Galleria mellonella* foi usada para avaliar a eficácia do extrato 11FO d como antimicrobiano *in vivo*. Os resultados mostram que esse modelo é uma boa alternativa a experimentação com murinos, além de não depender da aprovação de comitê de ética (Tsai *et al.*, 2016). Houve um aumento na sobrevivência de lagartas, que receberam a fração ou o antibiótico gentamicina a 200 mg/kg, e constatou-se a ausência de toxicidade na dose usada. Novos testes devem ser realizados para determinar a menor dose a mostrar efeito *in vivo* e a existência de sinergismo com antibióticos usados em terapias.

Pela microscopia de força atômica observou-se que as células bacterianas tratadas apresentaram a mesma estrutura regular que as células não tratadas com a fração 11FO d, embora em menores quantidades, o que pode sugerir a morte celular e alterações no arranjo celular. Os resultados sugerem a ausência de extravasamento de proteínas intracelulares. Estudos serão realizados para avaliar a ação sobre a membrana bacteriana, uma vez que relatos associam a interferência de xantonas nesse processo (Koh *et al.*, 2013).

Em resumo, este trabalho revelou o potencial de espécies arbóreas da Mata Atlântica como fontes para a pesquisa de novos antimicrobianos contra bactérias gram-positivas. A fração 11FO d exibiu promissoras atividades *in vitro* e *in vivo* sobre *S. aureus*, apresentando perfil cromatográfico característico de mistura de xantonas, que não promoveram alterações visíveis na parede celular e na membrana celular bacteriana.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, A.A., 2015. Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
- Alvaro, M.R., Alejandra, H.H., Antonio, D.C., 2015. *In vitro* antibacterial activity of *Maclura tinctoria* and *Azadirachta indica* against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. Br. J. Pharm. Res. 7, 291-298
- Balbani, A.P., Silva, D.H., Montovani, J.C., 2009. Patents of drugs extracted from brazilian medicinal plants. Expert. Opin. Ther. Pat. 19, 461-473.
- Battilani, J.L., Santiago, E.F., Souza, A. D., 2006. Morfologia de frutos, sementes e desenvolvimento de plântulas e plantas jovens de *Maclura tinctoria* (L.) D. Don. ex Steud.(Moraceae). Acta Bot. Bras. 20, 581-589.
- Chambers, H.F., Deleo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat. Rev. Microbiol. 7, 629-641.
- Cioffi, G., Escobar, L.M., Braca, A., De Tommasi, N., 2003. Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura (Chlorophora) tinctoria*. J. Nat. Prod. 66, 1061-1064.
- Clinical and Laboratory Standards Institute., 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. CLSI Doc. M07-A9.
- Cunha, W.R., Martins, C., da Silva Ferreira, D., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Albuquerque, S., 2003. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. Planta Med. 69, 470-472.
- da Silva, M.P., 2015. Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa.
- El-Sohly, H.N., Joshi, A.S., A. C. Nimrod, A.C., Walker, L.A., Clark, A.M., 2001. Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. Planta Med. 67, 87-89.
- French, G. L., 2006. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections- the potential role of daptomycin. J. Antimicrob. Chemother. 58, 1107-1117.
- Groweiss, A., Cardellina, J.H., Boyd, M.R., 2000. HIV-Inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. J. Nat. Prod. 63, 1537-1539.

- Hammer, N.D., Schurig-briccio, L.A., Gerdes, S.Y., Gennis, R.B., Skaar, E.P., 2016. CtaM is required for menaquinol oxidase aa<sub>3</sub> function in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 7, e00823-16.
- Hou, Z., Zhou, Y., Li, J., Zhang, X., Shi, X., Xue, X., Li, Z., Ma, B., Wang, Y., Luo, X., 2015. Selective *in vivo* and *in vitro* activities of 3, 3'-4-nitrobenzylidene-bis-4-hydroxycoumarin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibition of DNA polymerase III. *Sci. Rep.* 5, 1-12.
- Jad, Y.E., Acosta, G.A., Naicker, T., Ramtahal, M., El-Faham, A., Govender, T., Kruger, H.G., de La Torre, B.G., Albericio, F., 2015. Synthesis and biological evaluation of a teixobactin analogue. *Org. Lett.* 17, 6182-6185.
- Jevons, M.P., Coe, A.W., Parker, M.T., 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* 281, 904-907.
- Jin, K., Sam, I.H., Po, K.H.L., Zadeh, E.H.G., Chen, S., Yuan, Y., Li, X., 2016. Total synthesis of teixobactin. *Nature Commun.* 7, 1-6.
- Kim, S.Y., Kim, J., Jeong, S.I., Jahng, K.Y., Yu, K.Y., 2015. Antimicrobial effects and resistant regulation of magnolol and honokiol on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1-10.
- Kobayashi, S.D.; Malachowa, N.; Deleo, F.R., 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *Am. J. Pathol.* 185, 1518-1527.
- Koh, J.J., Qiu, S., Zou, H., Lakshminarayanan, R., Li, J., Zhou, X., Tang, C., Saraswathi, P., Verma, C., Tan, D.T.H., Tan, A.I., Liu, S., Beuerman, R.W., 2013. Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 834-844.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamounier, K.C., Cunha, L.C.S., de Moraes, S.A.L., de Aquino, F.J.T., Chang, R., do Nascimento, E.A., de Souza, M.G.M., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., 2012. Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schaberle, T.F., Hughes, D.H., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517, 455-459.

- Marinho, F.F., Simões, A.O., Barcellos, T., Moura, S., 2016. Brazilian *Tabernaemontana* genus: indole alkaloids and phytochemical activities. *Fitoterapia* 114, 127-137.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C.D., Coube, C.S., Leitão, S.G., 2001. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15, 127-130.
- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., Fonseca, G.A.B., 2004. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: CEMEX Books on Nature Series.
- Otto, M., 2013. Community-associated MRSA: what makes them special ?. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 324-330.
- Parmar, A., Iyer, A., Vincent, C.S., Van Lysebetten, D., Prior, S.H., Maddar, A., Taylor, E.J., Singh, I., 2016. Efficient total syntheses and biological activities of two teixobactin analogues. *Chem. Commun.* 52, 6060-6063.
- Peton, V.; Le Loir, Y., 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol.* 21, 602-615.
- Rovedder, A.P.M., Piazza, E.M., Thomas, P.A., Felker, R.M., Hummel, R.B., Farias, J. A.D., 2016. Potential medicinal use of forest species of the deciduous seasonal forest from Atlantic Forest biome, South Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59, 1-11.
- Santana, H.F., Barbosa, A. A.T., Ferreira, S. O., Mantovani, H.C., 2012. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 485-491.
- Schägger, H., 2006. Tricine–SDS–PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16-22.
- Silva, D.M., 2016. Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, UFV.
- Tenover, F.C., Goering, R.V., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 441-446.
- Tsai, C.J.-Y., Loh, J.M.S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7, 214-229.
- Van Der Mee-Marquet, N.L., 2015. Whole-genome sequencing analysis: an essential tool for shedding light on the obscure evolution of *Staphylococcus aureus* USA300. *J. Infect. Dis.* 213, 1362-1363.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer Verlag.

Wright, G., 2015. Antibiotics: an irresistible newcomer. *Nature* 517, 442-444.

Yin, S., Rao, G., Wang, J., Luo, L., He, G., Wang, C., Ma, C., Luo, X., Hou, Z., Xu, G., 2015. Roemerine improves the survival rate of septicemic BALB/c mice by increasing the cell membrane permeability of *Staphylococcus aureus*. *PloS One* 10, e0143863.

## **Capítulo II**

**Ação de extratos vegetais sobre a virulência de *Staphylococcus* spp.**

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* é responsável por simples infecções de pele até patologias mais graves como pneumonia, endocardite e sepse e produz variados fatores de virulência essenciais no curso da infecção. Nos últimos anos, muito tem se discutido a respeito de uma nova estratégia de combate às bactérias que tem por objetivo “desarmar” o patógeno pela diminuição da produção de fatores de virulência. Acredita-se que uma menor interferência no crescimento bacteriano possa resultar em menor desenvolvimento de resistência a fármacos. As plantas são fontes de produtos naturais, os quais têm atividades biológicas bem descritas, porém pouco se explorou da ação de metabólitos secundários sobre a virulência bacteriana. Neste trabalho, 70 extratos vegetais preparados de folhas e galhos de espécies arbóreas da Mata Atlântica foram avaliados quanto ao potencial antivirulência sobre *Staphylococcus* spp. Um total de 33 extratos interferiu na atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 29213 com redução máxima de 84,35% obtida com o extrato orgânico produzido de galhos de *Siparuna guianensis*, sendo que, em quatro deles, foi verificado um aumento na hemólise. Quatorze extratos reduziram a produção de biofilme de *S. epidermidis* NRS101 (ATCC 35983). Os extratos orgânicos de galhos das espécies *Casearia sylvestris* e *Siparuna guianenses* inibiram os dois fatores de virulência. Concentrações subinibitórias desses extratos foram testadas sobre isolados veterinários de *S. aureus* confirmando o efeito sobre a hemólise e o biofilme. Por qRT-PCR, comprovou-se redução dos transcritos da  $\alpha$ -hemolisina (*hla*) e do *RNAlIII*, regulador da expressão de fatores de virulência, o que demonstra a presença de compostos bioativos nos extratos estudados.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista responsável por simples infecções de pele até patologias mais graves como bacteremia e sepse (Tong *et al.*, 2015). A bactéria é conhecida pela produção de um arsenal de fatores de virulência que desempenham função determinante durante o processo infeccioso, embora variem entre as cepas. De forma geral, as proteínas de superfície auxiliam na adesão do patógeno a célula do hospedeiro ou impedem a ativação de proteínas do complemento e inibição da fagocitose (Foster *et al.*, 2014). Algumas proteínas de superfície também são importantes na fase inicial do estabelecimento do biofilme, estrutura onde as células estão revestidas por uma matriz extracelular que as protege da ação de antimicrobianos (Cegelski *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2014). Proteínas secretadas têm um importante papel na evasão do sistema imune e na captação de nutrientes, em especial o ferro, limitante nas condições encontradas *in vivo* (Kong *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os determinantes de virulência passaram a ser vistos como alvos para novas estratégias de combate às bactérias, motivado pela dificuldade de descobrir antimicrobianos eficazes no combate às infecções e pela cada vez crescente resistência bacteriana às drogas usadas na clínica (Kong *et al.*, 2016). Os antimicrobianos atuais interferem no crescimento do microrganismo, exercendo uma pressão seletiva que leva a adaptação evolutiva das bactérias e ao desenvolvimento de resistência (Kong *et al.*, 2016). Na estratégia antivirulência, interfere-se nos fatores de virulência sem afetar diretamente o crescimento da bactéria, o que, segundo alguns autores, poderia retardar o desenvolvimento de resistência (Allen *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2016). Porém, ainda existem muitas dúvidas a respeito da terapia antivirulência, tais como, eficácia, resistência e aplicação terapêutica, o que motiva a continuidade das pesquisas visando uma avaliação mais criteriosa da estratégia (Rasko e Sperandio, 2010; Allen *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2016).

As plantas sempre foram investigadas quanto às suas propriedades antibióticas (Mahady *et al.*, 2008), mas pouco se explorou sobre a ação dos compostos naturais na inibição da virulência bacteriana. O flavonoide baicalina inibiu a atividade *in vitro* da  $\alpha$ -hemolisina e apresentou efeitos terapêuticos sobre camundongos com infecção pulmonar causada por *S. aureus*, com diminuição da porcentagem de mortalidade, inflamação pulmonar e carga bacteriana (Qui *et al.*, 2012). Ação semelhante foi relatada para o flavonoide morina, que por inibir a atividade da  $\alpha$ -hemolisina, aumentou a taxa de

sobrevivência dos camundongos com pneumonia e diminuiu a reação inflamatória local (Wang *et al.*, 2015).

A mata Atlântica representa, aproximadamente, 35% da biodiversidade brasileira, no entanto é uma das áreas mais devastadas do mundo (Rovedder *et al.*, 2016). Até o momento, pouco foi explorado do potencial das espécies arbóreas em possuir compostos capazes de influenciar na virulência bacteriana. Neste trabalho, analisou-se a ação de 70 extratos vegetais oriundos de uma reserva da Mata Atlântica sobre o potencial hemolítico e de formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. Esses extratos foram aqueles estudados no Capítulo I que não apresentaram atividade antibacteriana pelo teste de difusão em disco. As espécies *Siparuna guianensis* e *Casearia sylvestris* inibiram a produção de hemólise e a formação de biofilme de *S. aureus* em concentrações subinibitórias.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Microrganismos e condições de cultivo**

A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada nos testes antimicrobianos e de hemólise. *Staphylococcus epidermidis* NRS101 (ATCC 35983), obtida da NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) foi utilizada nos ensaios de biofilme. Também foram utilizados os isolados bovinos *S. aureus* 302/4, 4651, 2221, 3810, 4130 e 469/4 (da Silva, 2015). As bactérias foram estriadas em placa contendo meio ágar infusão cérebro-coração (BHI, Himedia) ou Müeller-Hinton (MH, Himedia®), um dia anterior ao experimento. Para os ensaios de biofilme, as células bacterianas foram crescidas em meio BHI suplementado com 0,25% glicose (BHIg), a 37 °C sem agitação. Todos os isolados utilizados foram estocados a -80°C em meio BHI contendo 20% de glicerol.

### **Material vegetal**

O material vegetal foi coletado da Mata Atlântica da Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental (EPTEA), conhecida por Mata do Paraíso, que pertence à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. As exsiccatas de todas as espécies do acervo da biblioteca de extratos foram depositadas no herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa e no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG).

A partir do material vegetal foi construída uma extratoteca por integrantes do grupo de pesquisa BIOPROS, UFV- MG (Almeida, 2015), onde extratos orgânicos (diclorometano e metanol 1:1) e aquosos de cada espécie foram produzidos a partir de galhos e folhas, secos e pulverizados. Estoques de todos os extratos vegetais foram preparados na concentração de 50 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec®) para uso nos testes biológicos. As espécies foram numeradas aleatoriamente e os extratos referidos pelas siglas FO, extrato orgânico de folhas, FA, extrato aquoso de folhas, GO, extrato orgânico de galhos e GA, extrato aquoso de galhos.

### **Efeito dos extratos vegetais sobre a formação do biofilme**

A ação dos extratos vegetais sobre a formação do biofilme de *S. epidermidis* NRS 101 foi avaliada em placa de 96 poços TPP (# 92096). Uma suspensão de células (100 µL) ajustada para 0,5 na escala McFarland foi adicionada a cada poço juntamente com 2 mg/mL dos extratos vegetais (Rehman *et al.*, 2016) e o meio BHIg para um volume final de 200 µL. Após incubação por 24 h a 37 °C, as placas foram gentilmente lavadas três

vezes com PBS, pH 7,8, seguido de coloração com cristal violeta 0,1% por 30 min e de adição de álcool 95% por 45 min (Klein *et al.*, 2015). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm VersaMax ELISA Microplate Reader. O biofilme incubado somente com BHIg foi utilizado como controle. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

### **Efeito dos extratos vegetais em ensaio de hemólise**

O efeito dos extratos sobre a capacidade de hemólise de *S. aureus* foi realizado em microtubos contendo  $10^7$  UFC/mL de uma suspensão bacteriana crescida em meio BHI, na presença de 1 mg/mL dos extratos vegetais (Qiu *et al.*, 2010a). As culturas foram incubadas por 16 h em estufa a 37 °C e então centrifugadas a 5500 x g por 1 min. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados ao sangue de coelho a 4%, seguido por incubação por 30 min a 37 °C. Após nova centrifugação a 686 x g por 1 min, os sobrenadantes foram recolhidos para leitura a D.O.<sub>543nm</sub> em espectrofotômetro VersaMax ELISA Microplate Reader. O sangue de coelho na presença de solução salina (NaCl 0,85%) ou água foi utilizado como controles negativo e positivo, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

### **Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais e fracionamento**

A prospecção fitoquímica foi realizada por cromatografia de camada fina em placas revestidas com sílica gel (Whatman®, Maidstone, Kent, Inglaterra). Os extratos brutos foram pesquisados quanto a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, óleos essenciais, saponinas, alcaloides, triterpeno/esteroides, utilizando padrões específicos para cada classe de metabólitos secundários (Wagner *et al.*, 1984).

O fracionamento por partição líquido-líquido foi realizado para os extrato seco que interferiram nos dois fatores de virulência. Para isto, 0,5 g dos extratos foram ressuspensos em água, em seguida, transferidos para um funil de separação, iniciando-se a partição com hexano. Após a retirada da fração hexânica, foram adicionados sucessivamente os solventes diclorometano, acetato de etila, butanol, restando no final uma fase aquosa. Todas as frações foram submetidas a completa retirada do solvente em evaporador rotatório, sendo então realizada análises fitoquímicas e biológicas.

### **Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos vegetais**

A concentração mínima inibitória foi realizada em placas de 96 poços, conforme recomendações do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Os poços foram preenchidos com caldo MH, com concentrações de extratos variando de 0 até 10 mg/mL e  $10^5$  UFC/mL da suspensão bacteriana. Para o controle do crescimento, 100  $\mu$ L do inóculo foram adicionados a 100  $\mu$ L do caldo MH. O controle negativo consistiu de caldo MH acrescido de DMSO no volume correspondente a maior concentração de extrato testada. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, foram adicionados 5  $\mu$ L de p-iodo-nitrotetrazolium violeta (INT, I8377, Sigma®) a 2 mg/mL. Após incubação de 2 h, a CIM foi definida como a menor concentração do extrato no qual visualmente não se observou a formação da cor púrpura indicativa de viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Efeito de extratos vegetais sobre o crescimento bacteriano**

Uma curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213, com o inóculo inicial de  $10^6$  UFC/mL foi realizada na ausência e na presença dos extratos vegetais, em diferentes valores de CIM. Em tempos específicos, alíquotas foram retiradas, diluídas seriadamente e plaqueadas em BHI para determinação da UFC/mL. O mesmo foi realizado para *S. epidermidis* na ausência e na presença dos extratos vegetais a 2 mg/mL.

### **RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)**

Uma suspensão bacteriana foi incubada com os extratos selecionados, a uma concentração correspondente a 1/4 da CIM, durante 16 h. Em seguida foi feita extração de RNA total pelo método do Trizol (Life Technologies) e tratamento do RNA com DNase-RNase Free (Promega) para eliminação do DNA contaminante. O cDNA foi sintetizado com o kit (Promega) a partir de 1  $\mu$ g de RNA total e, a expressão dos genes foi avaliada pela técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). A análise da expressão foi realizada utilizando a quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001). A condição de amplificação para todos os sistemas foi 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60 °C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para obtenção da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1 °C durante 30 seg, partindo de 60 °C até atingir o limite de 95 °C. Os oligonucleotídeos utilizados estão

representados na tabela 1, e o 16S rRNA foi utilizado como o gene endógeno. O qPCR foi realizado utilizando o StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados no experimento de RT-PCR

Gene	Nome	Oligo
<i>Hla</i>	Alfa-hemolisina	Forward 5' -AGTCTGGTGAAAACCCTGAAGA -3'
		Reverse 5' -CCGGTATATGGCAATCAACTTT -3'
<i>RNAIII</i>	Regulador do sistema <i>agr</i>	Forward 5' -TAATTAAGGAAGGAGTGATTTCAATG -3'
		Reverse 5' -TTTTTAGTGAATTTGTTCACTGTCTC -3'
<i>16S rRNA</i>	Componente dos ribossomos	Forward 5' -TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG -3'
		Reverse 5' -TCATCGTTTACGGCGTGGACTACC -3'

### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas pelo *software* GraphPad Prism (v.6). O qPCR foi realizado pelo método do  $\Delta\Delta CT$ .

## RESULTADOS

### Ensaio antivirulência

Dos 99 extratos vegetais analisados quanto à capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 pelo teste de difusão em ágar, exibidos na Tabela 1 do Capítulo 1, 70 não produziram halo de inibição e por isso foram testados em ensaios de hemólise e formação de biofilme neste capítulo (Tabela 2). Desse montante, aproximadamente 35% promoveram inibição maior que 50% na atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 29213. Os extratos 6GO, 9GO e 22GO foram os que afetaram mais fortemente a hemólise, que foi reduzida em 84,35%, 79,1%, 82,73%, respectivamente (Figura 1). Vinte e nove extratos não tiveram efeito significativo sobre a atividade hemolítica, enquanto que quatro (11GO, 40FO, 40GA e 50FO) estimularam a produção em comparação com o controle. Quanto ao potencial antibiofilme dos extratos, observou-se que muitos reduziram a produção de biofilme de *S. epidermidis* NRS101, em especial os extratos, 6GO e 9GO ( $p < 0,0001$ ), enquanto a maioria não mostrou forte atividade. Em alguns casos (23GA, 32FO, 44FA, 50FO e 50GA), observou-se um leve aumento ( $p < 0,05$ ) no biofilme (Figura 1). Nota-se que os extratos 6GO e 9GO interferiram nos dois fatores de virulência, sendo selecionados para os testes posteriores.

### Prospecção fitoquímica, fracionamento e ensaios antivirulência

As classes de metabólitos secundários reveladas pela prospecção fitoquímica dos extratos brutos 6GO e 9GO, assim como das frações obtidas com os solventes, hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol ou água estão exibidas na Tabela 3. As frações também foram avaliadas nos ensaios de hemólise e formação de biofilme, a 1 e 2 mg/mL respectivamente (Tabela 4), assim como realizado para os extratos brutos e observa-se que as frações não exibiram potencial antivirulência superior aos extratos brutos. Dessa forma os ensaios seguintes continuaram utilizando os extratos brutos.

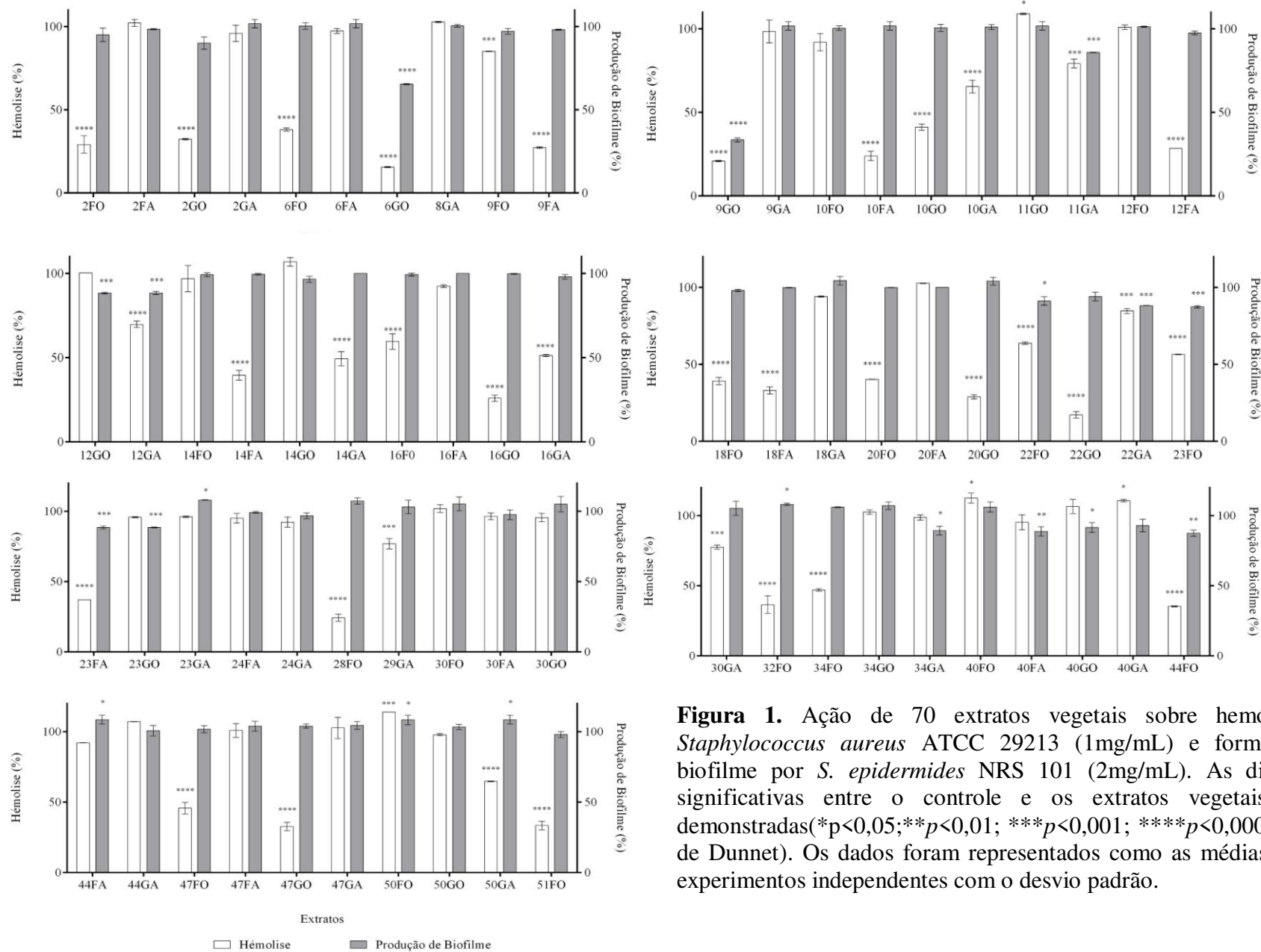
**Tabela 2.** Extratos vegetais que não apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 pelo teste de difusão em ágar.

Extrato	Família	Espécie	N° Herbário VIC
2FO	Caesalpinioideae	<i>Senna macranthera</i>	40.533
2FA		<i>Senna macranthera</i>	
2GO		<i>Senna macranthera</i>	
2GA		<i>Senna macranthera</i>	
6FO	Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i>	40.409
6FA		<i>Siparuna guianensis</i>	
6GO		<i>Siparuna guianensis</i>	
8GA		<i>Bathysa nicholsonii</i>	
9FO	Salicaceae	<i>Casearia sylvestris</i>	40390
9FA		<i>Casearia sylvestris</i>	
9GO		<i>Casearia sylvestris</i>	
9GA		<i>Casearia sylvestris</i>	
10FO	Moraceae	<i>Ficus eximia</i>	40.263
10FA		<i>Ficus eximia</i>	
10GO		<i>Ficus eximia</i>	
10GA		<i>Ficus eximia</i>	
11GO	Moraceae	<i>Maclura tinctoria</i>	40.269
11GA		<i>Maclura tinctoria</i>	
12FO	Sapindaceae	<i>Allophylus sericeus</i>	40.333
12FA		<i>Allophylus sericeus</i>	
12GO		<i>Allophylus sericeus</i>	
12GA		<i>Allophylus sericeus</i>	
14FO	Meliaceae	<i>Trichilia pallida</i>	40.287
14FA		<i>Trichilia pallida</i>	
14GO		<i>Trichilia pallida</i>	
14GA		<i>Trichilia pallida</i>	
16FO	Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i>	40.227
16FA		<i>Guapira opposita</i>	
16GO		<i>Guapira opposita</i>	
16GA		<i>Guapira opposita</i>	
18FO	Malvaceae	<i>Ceiba speciosa</i>	40.342
18FA		<i>Ceiba speciosa</i>	
18GA		<i>Ceiba speciosa</i>	
20FO	Euphorbiaceae	<i>Joannesia princeps</i>	40.481
20FA		<i>Joannesia princeps</i>	
20GO		<i>Joannesia princeps</i>	
22FO	Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i>	40.485

**Tabela 2.** Continuação.

<b>Extrato</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>N° Herbário VIC</b>
22GO	Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i>	40.485
22GA		<i>Alchornea glandulosa</i>	
23FO	Annonaceae	<i>Annona sylvatica</i>	40.508
23FA		<i>Annona sylvatica</i>	
23GO		<i>Annona sylvatica</i>	
23GA		<i>Annona sylvatica</i>	
24FA	Melastomataceae	<i>Miconia petropolitana</i>	40.397
24GA		<i>Miconia petropolitana</i>	
28FO	Mimosoideae	<i>Piptadenia gonoacantha</i>	
29GA	Apocynaceae	<i>Tabernaemontana hystrix</i>	40.611
30FO	Rubiaceae	<i>Psychotria vellosiana</i>	40.282
30FA		<i>Psychotria vellosiana</i>	
30GO		<i>Psychotria vellosiana</i>	
30GA		<i>Psychotria vellosiana</i>	
32FO	Annonaceae	<i>Xilopia sericea</i>	40.432
34FO	Solanaceae	<i>Solanum cernuum</i>	40.323
34GO		<i>Solanum cernuum</i>	
34GA		<i>Solanum cernuum</i>	
40FO	Phytolaccaceae	<i>Seguiera langsdorffii</i>	40.202
40FA		<i>Seguiera langsdorffii</i>	
40GO		<i>Seguiera langsdorffii</i>	
40GA		<i>Seguiera langsdorffii</i>	
44FO	Malvaceae	<i>Luehea grandiflora</i>	40.338
44FA		<i>Luehea grandiflora</i>	
44GA		<i>Luehea grandiflora</i>	
47FO	Cercideae	<i>Bauhinia fortificata</i>	40.549
47FA		<i>Bauhinia fortificata</i>	
47GO		<i>Bauhinia fortificata</i>	
47GA		<i>Bauhinia fortificata</i>	
50FO	Faboideae	<i>Dalbergia nigra</i>	40.498
50GO		<i>Dalbergia nigra</i>	
50GA		<i>Dalbergia nigra</i>	
51FO	Myrtaceae	<i>Myrciaria glazioviana</i>	40.584

FO, extrato orgânico obtido de folhas; FA, extrato aquoso obtido de folhas, GO, extrato orgânico obtido de galhos; GA, extrato aquoso obtido dos galhos.



**Figura 1.** Ação de 70 extratos vegetais sobre hemólise de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (1mg/mL) e formação do biofilme por *S. epidermidis* NRS 101 (2mg/mL). As diferenças significativas entre o controle e os extratos vegetais foram demonstradas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Teste de Dunnet). Os dados foram representados como as médias de três experimentos independentes com o desvio padrão.

**Tabela 3.** Classe de metabolitos secundários identificados nos extratos brutos 6GO e 9GO e frações.

Extratos e frações	Alcaloide	Antraquinona	Cumarina	Flavonoide	Oleo essencial	Saponina	Tanino	Triterpeno/ Esteroides
<b>6GO</b>	-	-	X	X	X	X	-	X
Hexano	-	-	X	X	X	X	-	X
Dicloro metano	-	-	X	X	X	X	-	X
Acetato de etila	-	-	X	X	X	X	-	X
Butanol	-	-	X	X	-	X	-	X
Água	-	-	X	X	-	X	X	X
<b>9GO</b>	-	-	X	X	X	X	-	X
Hexano	-	-	X	X	X	X	-	X
Dicloro metano	-	-	X	X	X	X	-	X
Acetato de etila	-	-	X	X	-	X	-	X
Butanol	-	-	X	X	-	X	-	X
Água	-	-	-	X	-	X	X	-

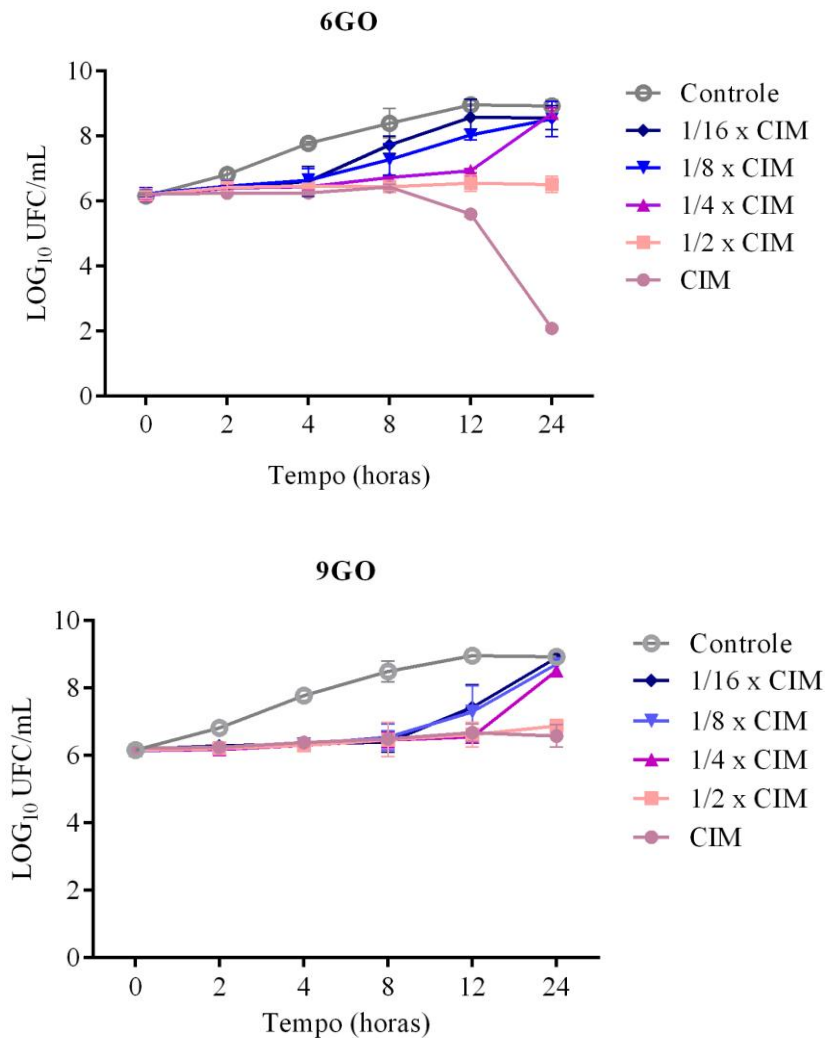
**Tabela 4.** Ação das frações obtidas pelo fracionamento dos extratos 6GO e 9GO sobre a hemólise e formação de biofilme de *Staphylococcus* sp.

Frações	Inibição de hémolise (%)		Inibição do biofilme (%)	
	6GO	9GO	6GO	9GO
Hexano	0,0 ± 0,84	<b>17,95 ± 7,88</b>	<b>16,76 ± 5,64</b>	<b>57,34 ± 1,79</b>
Diclorometano	<b>84,22 ± 2,00</b>	<b>76,78 ± 3,57</b>	0,70 ± 0,60	7,87 ± 4,18
Acetato de etila	<b>84,97 ± 0,55</b>	<b>64,87 ± 3,00</b>	2,00 ± 7,47	<b>80,33 ± 0,39</b>
Butanol	<b>19,12 ± 5,48</b>	<b>73,11 ± 2,21</b>	0,72 ± 2,47	0,0 ± 0,26
Água	<b>33,80 ± 0,93</b>	<b>80,28 ± 2,14</b>	1,08 ± 6,23	4,87 ± 2,01

Os resultados são as médias de três experimentos independentes com desvio padrão. Os valores destacados apresentaram significativa diferença comparada ao controle ( $p \leq 0,01$ ; Teste de Dunnet).

#### **Efeito dos extratos 6GO e 9GO sobre o crescimento de *S. aureus***

A concentração mínima inibitória (CIM) dos extratos 6GO e 9GO sobre *S.aureus* ATCC 29213 foi determinada em 1,25 mg/mL e 0,31 mg/mL, respectivamente. Foi avaliada a ação destes extratos, nas concentrações do CIM e subinibitórias, sobre o crescimento de *S. aureus* (Figura 2). Nota-se que quanto menor a concentração do extrato menor a interferência no crescimento da bactéria, sendo que essa redução não foi superior a  $2 \log_{10}$  em UFC/mL, exceto, no valor de CIM do extrato 6GO.



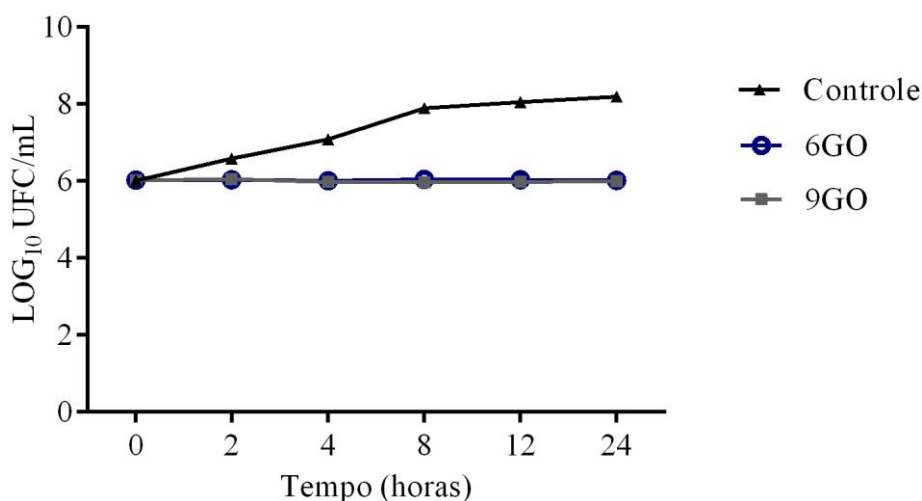
**Figura 2.** Efeito de diferentes concentrações dos extratos vegetais 6GO e 9GO sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Os dados foram representados como as médias de no mínimo dois experimentos independentes com o desvio padrão.

As concentrações de 6GO e 9GO usadas nos ensaios de hemólise (1 mg/mL) e biofilme (2 mg/mL) estavam próximas ou muito acima da CIM de 6GO (1,25 mg/mL) e 9GO (0,31 mg/mL), o que pode ter influenciado no resultado da triagem feita. Por esse motivo, repetiu-se a hemólise em concentrações subinibitórias dos extratos. Comparando-se a inibição da atividade hemolítica com a inibição do crescimento bacteriano causadas por esses extratos, nota-se que a concentração correspondente a 1/4 do CIM, interferiu mais na produção da hemólise do que no crescimento (Tabela 5). Da mesma forma, foi avaliada a ação dos extratos a 2 mg/mL sobre o crescimento de *S. epidermidis*. Os extratos interferiram no crescimento bacteriano, provocando uma redução de 2 log<sub>10</sub> em UFC/mL (aproximadamente 25%) comparado ao controle (Figura 3).

**Tabela 5.** Comparação entre a inibição da produção de hemólise e a inibição no crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 pelos extratos 6GO e 9GO.

Concentração	Inibição da hemólise (%)		Inibição do crescimento bacteriano (%)	
	Extratos		Extratos	
	6GO	9GO	6GO	9GO
CIM	79,51 ± 1,02	80,00 ± 1,25	76,59 ± 0,30	26,36 ± 2,15
1/2 CIM	64,42 ± 4,00	80,06 ± 0,82	27,10 ± 4,41	22,95 ± 1,40
1/4 CIM	57,10 ± 4,49	71,23 ± 1,82	2,54 ± 3,90	4,83 ± 2,96
1/8 CIM	9,73 ± 2,73	77,73 ± 0,71	4,47 ± 3,97	2,42 ± 4,22
1/16 CIM	0,00 ± 6,91	63,88 ± 0,66	3,97 ± 6,25	0,19 ± 3,74

Os resultados são as médias de três experimentos independentes com desvio padrão. Os valores destacados apresentaram significativa diferença comparada ao controle ( $p \leq 0,01$ ; Teste de Dunnet).



**Figura 3.** Efeito de 2 mg/mL dos extratos vegetais 6GO e 9GO sobre o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35983. Os dados foram representados como as médias de no mínimo dois experimentos.

Avaliou-se a ação dos extratos sobre a produção de hemólise e de biofilme, na concentração correspondente a 1/4 da CIM, por bactérias *S. aureus* isoladas de animais com mastite bovina (Tabela 6). O extrato 9GO foi mais eficiente na inibição da

atividade hemolítica dos quatro isolados testados quando comparado à 6GO, que apresentou mais efeito sobre o isolado 302/4. A redução no biofilme foi insignificante no isolado 469/4, enquanto não apresentou efeito sobre o isolado 4130. Nos outros dois, uma inibição maior que 64% foi alcançada.

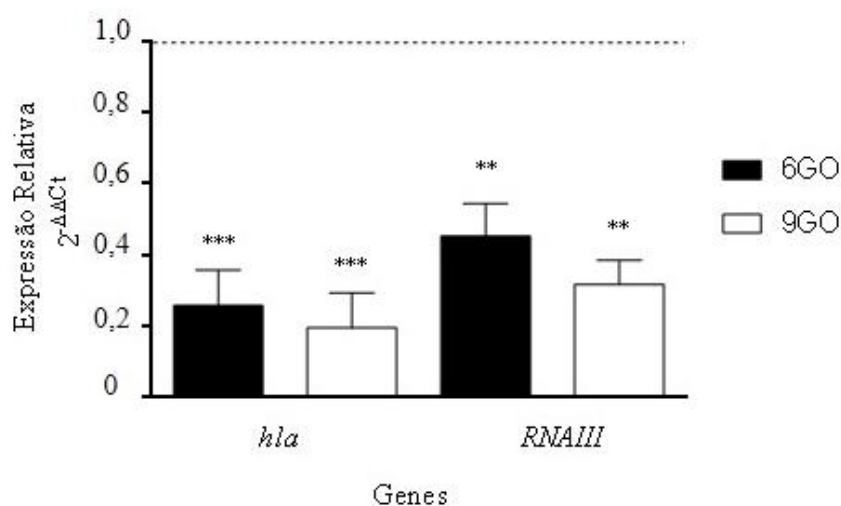
**Tabela 6.** Ação dos extratos brutos 6GO e 9GO, em concentração de 1/4 da CIM, sobre a hemólise e biofilme de diferentes isolados de *Staphylococcus aureus*

Isolado	Inibição de hemólise (%)		Isolado	Inibição do biofilme (%)	
	6GO	9GO		6GO	9GO
302/4	<b>67,41 ± 0,77</b>	<b>69,42 ± 6,12</b>	302/4	<b>64,68 ± 0,16</b>	<b>74,11 ± 2,99</b>
4651	0,0 ± 6,92	<b>75,04 ± 0,69</b>	4651	<b>79,63 ± 3,44</b>	<b>84,92 ± 1,20</b>
2221	<b>35,67 ± 0,97</b>	<b>73,40 ± 2,31</b>	469/4	1,45 ± 0,44	10,79 ± 3,09
3810	<b>10,72 ± 0,42</b>	<b>20,77 ± 2,18</b>	4130	0,0 ± 1,24	0,0 ± 0,00

Os resultados são as médias de três experimentos independentes com o desvio padrão. Os valores destacados apresentaram significativa diferença comparada ao controle ( $p \leq 0,05$ ; Teste de Dunnet).

### Efeito de 6GO e 9GO sobre a expressão dos genes *hla* e *RNAlII*

O qRT-PCR foi utilizado para avaliar diferenças na expressão de genes quando submetidos a ação dos extratos brutos 6GO e 9GO. Os dois extratos reprimiram a expressão da  $\alpha$ -hemolisina (*hla*) e do *RNAlII*, regulador da expressão de fatores de virulência de *S. aureus* (Figura 4), confirmando a redução de hemólise gerada por esses extratos.



**Figura 4.** Efeito de 1/4 de CIM dos extratos 6GO e 9GO sobre a expressão dos genes *hla* e *RNAlII* de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. A expressão relativa dos genes após o tratamento com 6GO e 9GO foi comparada ao controle (sem adição dos extratos, valor de 1,0) (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Teste de Dunnett). Os dados foram representados como as médias de no mínimo dois experimentos independentes com o desvio padrão.

## DISCUSSÃO

A terapia antivirulência tem como alvo fatores de virulência, sem afetar diretamente o crescimento das bactérias, o que poderia levar a um menor desenvolvimento de resistência a fármacos. Além disso, acredita-se que o sistema imunológico do hospedeiro diante dessa inibição, possa prevenir a colonização bacteriana ou eliminar a infecção existente (Rasko e Sperandio, 2010). As hemolisinas são importantes toxinas secretadas por *S. aureus* que auxiliam na invasão tecidual e aquisição de nutrientes sendo que sua inibição ou inativação pode auxiliar no combate à infecção. Este é o primeiro trabalho a reportar o potencial antivirulência de diversas espécies vegetais da Mata Atlântica. Pela ampla atividade biológica que muitas plantas apresentam sobre diferentes organismos e pelas opções limitadas na clínica para o tratamento de infecções causadas por bactérias multidrogas resistentes, estudos devem ser direcionados para a descoberta de compostos naturais com atividade antivirulência, que podem ser usados como base para a síntese de drogas com novas aplicações.

A maioria das espécies testadas neste trabalho promoveu uma diminuição na atividade hemolítica *in vitro* e por isso devem ser investigadas em mais detalhes quanto ao mecanismo de inibição. Alguns poucos extratos aumentaram a hemólise de *S. aureus*. É possível que os extratos ajam sobre a síntese da hemolisina ou sobre a montagem da toxina. O composto natural oroxilina A impediu a oligomerização da hemolisina alfa e, por consequência, a formação do poro transmembrana ao se ligar a sítios ativos da toxina (Dong *et al.*, 2013). O óleo essencial timol, apresentou atividade anti-hemolítica quando testado em concentrações subinibitórias em *S. aureus* ATCC 29213, com ação comprovada sobre a produção de *hla* e outras importantes toxinas, como *sea* e *seb* (Qiu *et al.*, 2010b). Efeito semelhante foi relatado com o flavonoide isorhamnetina isolado da fruta *Hippophae rhamnoides* L., que ao inibir a produção de *hla* de *S. aureus* 8325-3, protegeu células pulmonares cultivadas na presença de 16 µg/mL do composto (Jiang *et al.*, 2016). Embora não se tenha ideia da classe dos compostos que apresentaram atividade neste trabalho, acredita-se que um passo inicial para estabelecer o potencial das espécies vegetais estudadas tenha sido dado, o que motiva estudos futuros.

Alem disso, alguns extratos vegetais apresentaram efeito sobre o biofilme de *S. epidermidis* NRS 101, considerada forte produtora de biofilme, em especial os extratos de galhos da espécie *Siparuna guianensis* (6GO) e *Casearia sylvestris* (9GO), que também diminuíram fortemente a atividade hemolítica. Combinações de fármacos

antivirulência que afetem diferentes fatores de virulência, juntamente com um ambiente de tratamento adequado, podem ser mais efetivos e afetar menos o desenvolvimento de resistência (Allen *et al.*, 2014), o que revela o potencial desses dois extratos. Embora atividade antibacteriana dos extratos 6GO e 9GO não tenha sido vista pelo teste de difusão em halo, o crescimento em meio líquido revelou um efeito bacteriostático quando os extratos foram testados a 2 mg/mL, o que revelou uma limitação do teste em placa, provavelmente pela limitada difusão de compostos com atividade biológica pelo meio sólido (Eloff, 1998). Porém, concentrações subinibitórias afetaram significativamente a produção de biofilme dos isolados clínicos testados, demonstrando a existência de compostos bioativos que devem ser isolados. Se esses extratos têm atividade sobre biofilme pré-formado ainda precisa ser investigado.

Embora o extrato 6GO seja considerado por sua CIM maior que 0,50 mg/mL de fraca atividade ou inativo, 9GO foi classificado como de moderada atividade sobre *S. aureus*, segunda classificação de Costa *et al.*, (2015). Por isso, um segundo ensaio de hemólise foi feita em concentrações subinibitórias e comprovou a atividade antivirulência, mas com pouca atividade sobre o crescimento de *S. aureus*. Em um estudo que se propôs a avaliar a atividade antivirulência de drogas liberadas pelo órgão americano *Food and Drug Administration*, os autores consideraram como antimicrobiano as drogas que inibiram em mais de 50% o crescimento, e isso permitiu a seleção de fármacos que também podem ser aplicadas como antibiofilme no combate às infecções bacterianas (Dean e Hoeck, 2015).

Os extratos 6GO e 9GO reprimiram a expressão do gene *hla* e do regulador *RNAIII*. Como esse RNA controla a expressão de vários fatores de virulência como hemolisinas, enterotoxinas e enzimas, é possível que outros alvos tenham sido inibidos e por isso devam ser investigados (Kong *et al.*, 2015). A  $\alpha$ -hemolisina é um importante fator de virulência produzido por diversas cepas de *S. aureus* (Ouyang *et al.*, 2016) e que tem um papel na patogênese de doenças como pneumonia, septicemia e endocardite (Liu *et al.*, 2015). Embora já tenha sido sugerido que Hla possa ser alvo nas terapias antivirulências, ainda não se sabe como essa estratégia seria aplicada (Liu *et al.*, 2015; Ouyang *et al.*, 2016). Como possibilidade cita-se o desenvolvimento de anticorpos anti- $\alpha$ -hemolisina, antagonistas de receptores com os quais Hla interage e compostos que inibem a ação da  $\alpha$ -hemolisina (Kong *et al.*, 2016).

Este é o primeiro relato de atividade antivirulência das espécies *Casearia sylvestris* e *Siparuna guianensis*. *C. sylvestris* está amplamente distribuída no Brasil e folhas, raízes e troncos e as atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante,

antiparasitária, analgésica e antitumoral foram descritas (Ferreira *et al.*, 2011), enquanto *S. guianensis*, espécie nativa da América do Sul, foi relatada por possuir as atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (Aguiar *et al.*, 2015, Andrade *et al.*, 2015, Andrade *et al.*, 2016).

Em resumo, este estudo descreve pela primeira vez o potencial antivirulência de várias espécies vegetais da Mata Atlântica. Duas espécies se destacaram por apresentar atividade sobre a hemólise e produção de biofilme bacteriano, *Siparuna guianensis* e *Casearia sylvestris*. Outro tipo de fracionamento deve ser feito para identificar as classes de metabólitos secundários relacionados à atividade antivirulência.

## REFERÊNCIAS

- Aguiar, R.W.S., dos Santos, S.F., da Silva Morgado, F., Ascencio, S.D., de Mendonça Lopes, M., Viana, K.F., Didonet, J., Ribeiro, B.M., 2015. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. PloS One 10, e0116765.
- Allen, R.C., Popat, R., Diggle, S.P., Brown, S.P., 2014. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? Nat. Rev. Microbiol. 12, 300-308.
- Almeida, A.A., 2015. Bioprospecção de produtos naturais antitumorais em coleção de extratos de espécies arbóreas da Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
- Andrade, M.A., Azevedo, C.S., Motta, F.N., dos Santos, M.L., Silva, C.L., de Santana, J.M., Bastos, I.M., 2016. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. BMC Complement. Altern. Med. 16, 1-8.
- Andrade, M.A., Cardoso, M.D.G., Gomes, M.D.S., Azeredo, C.M.O.D., Batista, L.R., Soares, M.J., Rodrigues, L.M.A., Figueiredo, A.C.S., 2015. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. Braz. J. Microbiol. 46, 189-194.
- Cegelski, L., Marshall, G.R., Eldridge, G.R., Hultgren, S.J., 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nat. Rev. Microbiol. 6, 17-27.
- Clinical and Laboratory Standards Institute., 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. CLSI Doc. M07-A9.
- Costa, G.M., Endo, E.H., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., 2015. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 4, 908-917.
- da Silva, M.P., 2015. Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa.

- Dean, S.N., Hoek, M.L.V., 2015. Screen of FDA-approved drug library identifies maprotiline, an antibiofilm and antivirulence compound with QseC sensor-kinase dependent activity in *Francisella novicida*. *Virulence* 6, 487-503.
- Dong, J., Qiu, J., Zhang, Y., Lu, C., Dai, X., Wang, J., Li, H., Wang, X., Tan, W., Luo, M., Niu, X., Deng, X., 2013. Oroxylin A inhibits hemolysis via hindering the self-assembly of alpha hemolysin heptameric transmembrane pore. *PLoS Comput. Biol.* 2013, 9, e1002869.
- Eloff, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64, 711-713.
- Ferreira, P.M.P., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Barros, F.W., Martins, A., Cavaleiro, A.J., Bolzani, V.S., Santos, A.G., Pessoa, C., 2011. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 83, 1373-1384.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49-62.
- Jiang, L., Li, H., Wang, L., Song, Z., Shi, L., Li, W., Deng, X., Wang, J., 2016. Isorhamnetin attenuates *Staphylococcus aureus*-induced lung cell injury by inhibiting alpha-hemolysin expression. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 596-602.
- Klein, R.C., Fabres-klein, M.H., De Oliveira, L.L., Feio, R.N., Malouin, F., Ribon, A.D.O.B., 2015. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms. *PLoS One* 10, 1-16.
- Kong, C., Neoh, H.M., Nathan, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins* 8, 72-93.
- Liu, S., Zhou, X., Li, W., Zhang, H., Zhang, B., Li, G., Liu, B., Deng, X., Peng, L., 2015. Diosmetin inhibits the expression of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 383-389.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Mahady, G.B., Huang, Y., Doyle, B.J., Locklear, T., 2008. Natural products as antibacterial agents. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 35, 423-444.
- Ouyang, P., Chen, J., Sun, M., Yin, Z., Lin, J., Fu, H., Shu, G., He, C., Lv, C., Deng, X., Wang, K., Geng, Y., Yin, L., 2016. Imperatorin inhibits the expression of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus* strain BAA-1717 (USA300). *Antonie van Leeuwenhoek* 109, 915-922.

- Qiu, J., Feng, H., Lu, J., Xiang, H., Wang, D., Dong, J., Wang, J., Wang, X., Liu, J., Deng, X., 2010a. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoprotein in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5846–5851.
- Qiu, J., Niu, X., Dong, J., Wang, D., Wang, J., Li, H., Luo, M., Li, S., Feng, H., Deng, X., 2012. Baicalin protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia via inhibiting the cytolytic activity of  $\alpha$ -hemolysin. *J. Infect. Dis.* 206, 292-301.
- Qiu, J., Wang, D., Xiang, H., Feng, H., Jiang, Y., Xia, L., Dong, J., Lu, J., Yu, L., Deng, X., 2010b. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and  $\alpha$ -hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One* 5, e9736.
- Rasko, D.A., Sperandio, V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117-128.
- Rehman, S., Ghauri, S.M., Sabri, A. N., 2016. Impact of plant extracts and antibiotics on biofilm formation of clinical isolates from otitis media. *Jundishapur J. Microbiol.* 9, e29483.
- Rovedder, A.P.M., Piazza, E.M., Thomas, P.A., Felker, R.M.; Hummel, R.B.; Farias, J. A.D., 2016. Potential medicinal use of forest species of the deciduous seasonal forest from atlantic forest biome, South Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59, 1-11.
- Tong, S.Y., Davis, J.S.; Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603-661.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer Verlag.
- Wang, J., Zhou, X., Liu, S., Li, G., Shi, L., Dong, J., Li, W., Deng, X., Niu, X., 2015. Morin hydrate attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by inhibiting the self-assembly of  $\alpha$ -hemolysin. *J. Appl. Microbiol.* 118, 753-763.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Dentre os 99 extratos vegetais testados sobre *S. aureus* ATCC 29213, 29 produziram halos de inibição do crescimento bacteriano que variaram entre 6 e 19 mm. Para esses, a CIM sobre *S. aureus* variou entre 0,08-10 mg/mL.
- O extrato bruto orgânico de folhas da espécie *Maclura tinctoria* (11FO) foi o que exibiu a menor CIM (0,08 mg/mL). A fração desse extrato com o solvente diclorometano apresentou CIM de 0,04 mg/mL.
- A fração diclorometano (11FO d) exibiu atividade antimicrobiana *in vitro* sobre diferentes estirpes de *S. aureus* isoladas de animais com mastite bovina, e aumentou a sobrevivência de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com a bactéria. A fração não teve efeito sobre a superfície bacteriana, nem levou ao extravasamento de proteínas intracelulares, embora o perfil de proteínas secretadas tenha alterado.
- Pela impressão digital obtida para a fração 11FO d por HPCL/UV pode-se observar a presença majoritária de quatro compostos. Todos apresentaram perfis espectrais no UV característicos de xantonas.
- Dentre os 70 extratos que não apresentaram halo no teste de difusão em ágar, 25 apresentaram inibição maior que 50% na hemólise de *S. aureus* ATCC 29213 e somente dois inibiram a formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* NRS 101 em mais de 30%, que foram os extratos orgânicos de galhos das espécies *Siparuna guianensis* (6GO) e *Casearia sylvestris* (9GO).
- Concentrações subinibitórias de 6GO e 9GO interferiram na hemólise e na formação do biofilme de isolados veterinários de *S. aureus*. A expressão da  $\alpha$ -hemolisina (*hla*) e do gene *RNAIII*, regulador da expressão de fatores de virulência de *S. aureus*, também foi reduzida.