

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA GONÇALVES BASTOS SILVA

EFEITO DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Calliandra dysantha* Benth. (Fabacea)
SOBRE O BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019

BÁRBARA GONÇALVES BASTOS SILVA

**EFEITO DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Calliandra dysantha* Benth. (Fabacea)
SOBRE O BIOFILME DE *Staphylococcus aureus***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas.

Co-orientadora: Dra. Daiane Silva Resende

PATOS DE MINAS - MG

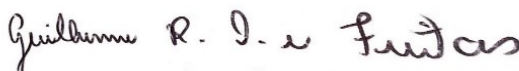
DEZEMBRO DE 2019

BÁRBARA GONÇALVES BASTOS SILVA

Efeito de extratos metanólicos de *Calliandra dysantha* Benth. (Fabacea) sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – IBTEC
Presidente



Prof. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – IBTEC
Membro



Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes – IQUFU
Membro

Patos De Minas - MG, 10 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele eu não estaria aqui.

Ao meu pai, a melhor pessoa que já conheci em minha vida, meu melhor amigo e a pessoa que nunca mediu esforços no apoio e incentivo aos meus estudos assim como em todos os meus sonhos.

A minha mãe Mariusa, por me dar forças nos momentos mais difíceis da minha vida e ser sempre o combustível para que eu não desista.

A minha mãe Deborah, por todo suporte e amor que sempre me deu em busca das minhas realizações.

A minha família, em especial minha avó Beta e meu primo João Neto, que são a imagem e concretização de o que uma família representa para mim.

Ao meu querido orientador professor Doutor Guilherme Freitas, por todo ensinamento que gentilmente me foi passado além de todo suporte, apoio e paciência para que esse trabalho fosse concluído.

A minha prezada co-orientadora Doutora Daiane Resende, por toda paciência que teve comigo no laboratório, por todo conhecimento passado e principalmente pelas palavras amigas em momento conturbados que sempre guardarei comigo.

Aos professores Doutora Terezinha Teixeira e Doutor Marcos Gomes por gentilmente aceitarem fazer parte desta banca e pelo ensinamentos passados.

A técnica de laboratório Carla e minha colega Thalia por toda ajuda e prestatividade, além do meu inicialmente colega de laboratório e hoje amigo, Éric por toda ajuda e apoio sem os quais esse trabalho não aconteceria.

Ao Lucas e a Laura, por toda compreensão, amor, carinho e apoio em casa durante a elaboração dessa monografia.

Aos meus amigos construídos ao longo da graduação Fernanda, Matheus, Aron, Bia, Kemilly, Pedro e Flávia, pela amizade e por terem tornado meus dias melhores.

A todos os professores, que foram tão importantes na minha vida acadêmica.

Muito obrigada, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a finalização deste projeto.

RESUMO

Os biofilmes bacterianos são comunidades de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular, produzida por eles próprios, conferindo proteção contra o meio externo e resistência a compostos antimicrobianos. Apesar dos biofilmes serem encontrados na natureza, atuando de forma benéfica como agentes descontaminantes de ambientes aquáticos, estes podem trazer prejuízos ao homem, quando são formados em superfícies de equipamentos industriais e de dispositivos médicos. Dentre as bactérias patogênicas produtoras de biofilme, destaca-se *Staphylococcus aureus*, um dos principais microrganismos relacionados a infecções provocadas por bactérias resistentes a antimicrobianos. Dessa forma, a busca por novos compostos ativos capazes de tratar infecções provocadas por *S. aureus*, bem como combater o seu biofilme se faz necessária. Trabalhos anteriores, realizados no Laboratório de Microbiologia da UFU, campus Patos de Minas, demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos preparados a partir de diferentes órgãos de *Calliandra dysantha* Benth. contra *S. aureus*. Entretanto, não existe na literatura nenhum estudo que demonstre o efeito dessa planta sobre o biofilme de *S. aureus*. Assim, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de extratos metanólicos preparados de caule, folha e flor de *C. dysantha* Benth contra o biofilme de *S. aureus*. Os extratos de flor e caule apresentaram atividade antibiofilme com menor viabilidade celular de 63,1% e maior viabilidade de 86,4% para a flor e para o caule de 69,3% e 90,4% respectivamente, enquanto o extrato de folha apresentou atividade pró biofilme com viabilidades celulares mínima e máxima de 188,0% e 249,6%. Esses efeitos podem estar relacionados à presença de diferentes compostos como uma lectina CasuL e do ácido elágico, respectivamente.

Palavras-chave: Cerrado. Compostos bioativos. Bactérias resistentes. Atividade antibiofilme. Atividade pró-biofilme.

ABSTRACT

*Bacterial biofilms are communities of microorganisms surrounded by an extracellular matrix, produced by themselves, conferring protection against the external environment and resistance to antimicrobial compounds. Although biofilms are found in nature, acting beneficially as decontaminating agents of aquatic environments, they can cause damage to humans when they are formed on surfaces of industrial equipment and medical devices. Among the pathogenic bacteria that produce biofilm, *Staphylococcus aureus* is one of the main microorganisms related to infections caused by antimicrobial resistant bacteria. Thus, the search for new active compounds capable of treating infections caused by *S. aureus*, as well as fighting its biofilm is necessary. Previous work, carried out at the UFU Microbiology Laboratory, Patos de Minas campus, demonstrated the antimicrobial activity of methanolic extracts prepared from different organs of *Calliandra dysantha* Benth. against *S. aureus*. However, there are no studies in the literature demonstrating the effect of this plant on *S. aureus* biofilm. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of different concentrations of methanolic extracts prepared from *C. dysantha* Benth stem, leaf and flower against *S. aureus* biofilm. Flower and stem extracts showed antibiofilm activity with lower cell viability of 63.1% and higher viability of 86.4% for flower and stem of 69.3% and 90.4% respectively, while leaf extract presented pro biofilm activity with minimum and maximum cell viability of 188.0% and 249.6%. These effects may be related to the presence of different compounds such as a CasuL lectin and ellagic acid, respectively.*

Key-words: Cerrado. Bacterial biofilm. *Staphylococcus aureus*. Antibiofilm activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: microlitro

°C: graus Celsius

ATCC: do inglês *American type culture collection*

CIM: concentração inibitória mínima

CH₃OH: metanol

DMSO: dimetilsulfóxido

EMT: extrato metanólico total

g: grama

IBTEC: Instituto de Biotecnologia

ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas

IRAS: infecção relacionada a assistência à saúde

mg: miligrama

MG: Minas Gerais

mL: mililitro

TSA: Agar Triptona de Soja

TSB: Caldo Triptona de Soja

UFC: unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Biofilme bacteriano.....	9
2.2 Biofilme na microbiologia clínica	14
2.3 Atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de <i>Calliandra dysantha</i> Benth.....	15
3 OBJETIVO	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local de desenvolvimento do trabalho	19
4.2 Extratos metanólicos de <i>Calliandra dysantha</i> Benth.	19
4.3 Cepa bacteriana, condições de crescimento e cultivo.....	19
4.4 Avaliação do efeito dos extratos sobre o biofilme de <i>S. aureus</i>	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Algumas células bacterianas são capazes de produzir uma matriz de polímero extracelular composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, denominada biofilme, o que lhes conferem vantagem adaptativa, uma vez que fornece proteção contra o meio externo e proporciona melhor adesão às superfícies. Durante seu desenvolvimento, o biofilme passa por três estágios de formação: a adesão, que consiste na fixação das células livres à uma superfície sólida; a proliferação e maturação, quando outras células aderem à camada inicial já formada e posteriormente secretam moléculas poliméricas para formação da matriz; e, por último, o descolamento, quando ocorre o desprendimento das células do biofilme, causado principalmente por enzimas que quebram as ligações da matriz polimérica e sua consequente liberação para o meio aquoso.

Os biofilmes são encontrados na natureza em sedimentos de rios, lagos e oceanos, onde contribuem para a extração de possíveis contaminantes da água. Nesse sentido, o homem se espelha no que acontece na natureza e utiliza os biofilmes em processos que visam tratar efluentes em águas contaminadas. Ademais, os biofilmes também podem ser utilizados de forma benéfica para a produção de vinagre e ácido cítrico, e em biorreatores, nos quais a densidade do biofilme interfere na eficiência das reações.

Entretanto, os biofilmes estão associados, na maioria das vezes, a situações onerosas ao homem, uma vez que a presença dessas comunidades de microrganismos em materiais sólidos está associada à deterioração da superfície e /ou à proliferação de bactérias patogênicas. Nas indústrias, onde facilmente são encontrados em equipamentos, geram prejuízos recorrentes, e na saúde estão associados ao aumento da taxa de mortalidade decorrente de doenças causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos.

Dentre as bactérias produtores de biofilme, podemos destacar *Staphylococcus aureus*, considerada uma das principais espécies causadoras de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS), destacando-se por seu rápido desenvolvimento, aptidão em progredir de uma infecção aguda para crônica, e quando se encontra na forma de biofilme é capaz de suportar concentrações de antibióticos excessivamente superiores à concentração inibitória mínima (CIM). O biofilme produzido por algumas cepas de *S. aureus*, tem tendência de se formar em dispositivos como as valvas cardíacas. Tendo em

vista que a maioria dos antimicrobianos não tem efeito em células de biofilme, estratégias vêm sendo estudadas para combater essas estruturas, uma vez que os testes de susceptibilidade de microrganismos em sua forma planctônica não têm sido eficientes na síntese de novos fármacos.

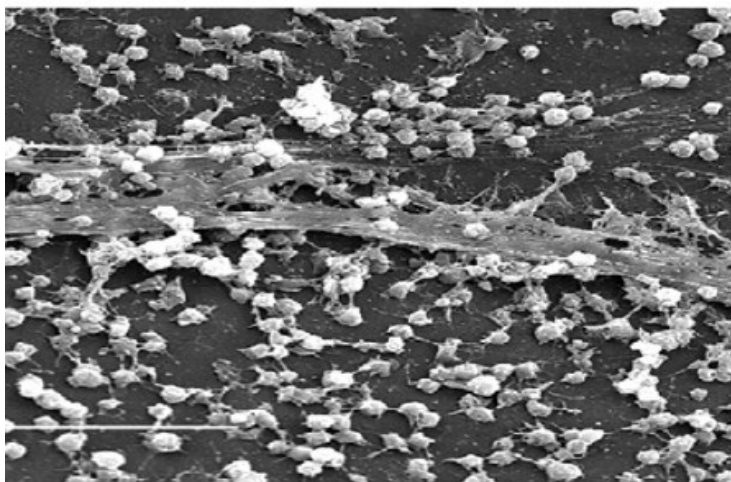
O Cerrado compreende uma vasta biodiversidade de plantas dentre as quais muitas são conhecidas pelo seu uso medicinal popular. Dentre estas, ressalta-se a *Calliandra Dysantha Benth*, que em razão de outras espécies de plantas do mesmo gênero já terem demonstrado capacidade antimicrobiana anteriormente, foi submetida à avaliação antimicrobiana no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia e apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas, dentre elas *S. aureus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilme bacteriano

Ao colonizarem uma nova superfície, as bactérias podem se encontrar em duas formas: na forma planctônica, quando se fixam isoladamente uma das outras; e na forma de biofilme, quando as comunidades bacterianas são envoltas por uma matriz polimérica extracelular, produzida pelos próprios microrganismos (PASTERNAK, 2009). A produção de biofilme causa alterações fenotípicas nas células, e é considerada excepcionalmente vantajosa a todas as espécies que são capazes de sintetizá-lo, pois confere melhor adesão das células às superfícies (OLIVEIRA, BRUGNETRA, PICOLLI, 2010; FROZI, ESPER, FRANCO, 2017). Os biofilmes podem se formar em uma vasta variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos residentes, tubulação de sistema de água industrial ou de água potável (**Figura 1**). Além disso, podem ser consideradas como uma estratégia de sobrevivência a ambientes desfavoráveis uma vez que a matriz extracelular fornece proteção contra agressões do meio externo, como desidratação, infecção por bacteriófagos, destruição por células do sistema imunológico do hospedeiro, e também resistência a compostos desinfetantes e aos antimicrobianos (FLACH et al., 2005).

Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura de um biofilme estafilocócico na superfície interna de um dispositivo médico de residência. Adaptado de Arampatzi et al 2011.

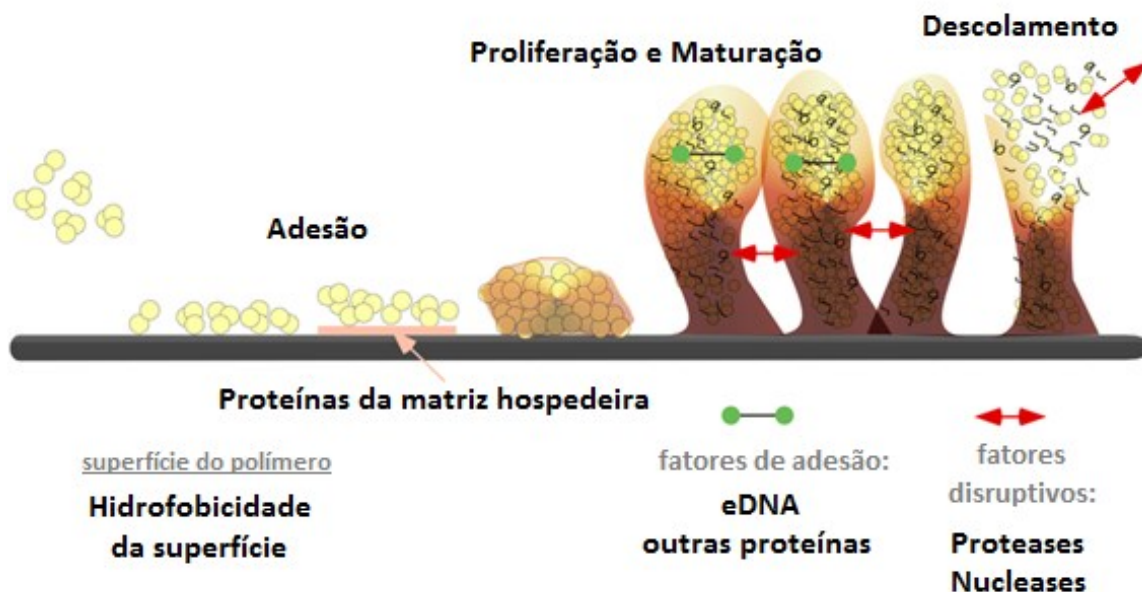


Fonte: Adaptado de Arampatzi et al (2011).

Com a formação dos biofilmes os microrganismos são fortemente aglutinados à superfície através de apêndices de natureza proteica ou polissacarídica, denominado glicocálice (MARQUES, 2007). Além disso, formam uma estrutura porosa e demasiadamente hidratada, que contém exopolissacarídeos e pequenos canais abertos entre as microcolônias, permitindo que espécies produtoras de biofilme tenham maior capacidade de colonização quando comparadas às não produtoras (MELO, 2008). Em relação à composição, a água é a parcela mais expressiva, e pode chegar a 97% da matriz do biofilme, enquanto os microrganismos representam apenas de 2 a 5% da matriz, apesar de excretarem substâncias poliméricas que prevalecem na matéria orgânica da massa seca do biofilme. Eles possuem partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que constituem um modelo de crosta, onde abaixo os microrganismos se multiplicam, seja em espécies isoladas ou em associação com outras espécies (OLIVEIRA; BRUGNETRA; PICOLLI, 2010).

O acúmulo de biofilme em superfícies é um processo natural que resulta de processos químicos, físicos e biológicos e ocorre em meio aquoso. Na **Figura 2** estão representadas as diferentes etapas da formação de um biofilme produzido por uma cepa de *Staphylococcus aureus*.

Figura 2: Desenvolvimento de um biofilme estafilocócico.



Fonte: Adaptado de Otto (2018).

A base do desenvolvimento de um biofilme é o transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua consequente fixação, etapa conhecida por adesão. Os fatores que influenciam na velocidade de formação inicial do biofilme são a concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso que entram em contato com a superfície sólida, a afinidade das moléculas com o suporte e as condições hidrodinâmicas do meio líquido, em que o caráter hidrofóbico é o fator principal que permite a fixação à superfície do material que geralmente também hidrofóbico (OTTO, 2018). Dessa forma, é de suma importância as características da superfície de suporte (MACHADO, 2007). Células bacterianas desenvolveram diversas maneiras para usar o efeito hidrofóbico com o objetivo de aderir a um substrato. Por exemplo, em espécies de *Staphylococcus*, as áreas hidrofóbicas são formadas por proteínas ligadas covalentemente a parede celular (HOGT; DANKERT; FEIJENMEYER, 1983; MEYER; GATERMANN, 1994; FOSTER et al., 2014).

Após a formação inicial do biofilme, ocorre o deslocamento de células microbianas do meio aquoso até a superfície sólida. O transporte de células ocorre em função do gradiente de concentração de microrganismos entre a superfície e o meio aquoso, onde as moléculas sintetizadas no desenvolvimento inicial do biofilme podem constituir ligações para uma forte e estável adesão através da produção de cadeias poliméricas com os microrganismos existentes na superfície, ora em razão da mobilidade que os microrganismos possuem em função da presença de apêndices externos, como

flagelos, pili e fimbrias (CHARACKLIS, 1990). Já estabelecida a primeira camada de microrganismos, a adesão de outros microrganismos é favorecida, tendo em vista que o desenvolvimento e reprodução dos primeiros colonizadores cria um ambiente favorável nas propriedades superficiais para a consecutiva colonização de microrganismos secundários, contribuindo para o acúmulo do biofilme (OTTO, 2008; 2009; 2013). Ademais, as células secretam moléculas poliméricas para formar a matriz de biofilme, em que os polímeros têm natureza polissacarídica e ácidos teicóicos, e acredita-se que substâncias poliméricas de células mortas também contribuem para a formação da matriz de biofilme, em que o DNA destas é conhecido como DNA extracelular (eDNA) (OTTO, 2018).

O processo de liberação de células para o meio aquoso pode ter origem em fenômenos de erosão superficial, descolamento, abrasão e ataque por predadores (MACHADO, 2007). A erosão representa a perda constante de porções de biofilme em decorrência de alterações ambientais, especificamente, alterações no fluxo, onde a taxa de remoção do biofilme aumenta conforme o biofilme vai se desenvolvendo. O descolamento ou *sloughing off*, ocorre quando há separação de grandes porções de biofilme em consequência da modificação de certas condições dentro do próprio biofilme, o qual está associado a biofilmes espessos, desenvolvidos em ambientes ricos em nutrientes. A abrasão equivale à perda de biofilme devido a sucessivas colisões entre a superfície em que se encontra o biofilme e as partículas existentes no fluido. O ataque por predadores pode limitar notavelmente o acúmulo de biofilme, em razão dos protozoários se alimentarem na superfície dos biofilmes bacterianos (MACHADO, 2005; OTTO, 2013).

Por fim, as próprias células envoltas no biofilme podem causar o seu desprendimento pela segregação e excreção de enzimas que podem quebrar as ligações da matriz polimérica (MACHADO, 2005), como nucleases e proteases, que são as mais importantes entre as enzimas degradadoras de biofilme (OTTO, 2018).

Na natureza, os biofilmes sempre existiram e se concentram nos sedimentos dos lagos, rios e mares, colaborando com a extração de contaminantes da água. Com isso, o homem vem utilizando os biofilmes em processos biotecnológicos para o tratamento de efluentes e extração de poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas, empregados em sistemas de filtros de areia, leitos percoladores e biodiscos aplicados à purificação de água (MACHADO, 2005). Um exemplo de biorreator para tratamento de efluentes que se utiliza da formação de biofilmes é o “Reator de Leito Móvel com

Biofilme (MBBR)”, em que dentre as inúmeras vantagens quando comparado a outros tipos de biorreatores, destacam-se: a grande área superficial entre o biofilme e o substrato; menor perda de carga; o excelente grau de mistura que resulta em uma apropriada transferência de massa; e que todo o volume útil do reator é ativamente utilizado para o crescimento da associação microbiana (NOGUEIRA, 2013). Ademais, estudos recentes também mostram a eficiência do uso de biofilmes de leito móvel em reatores de batelada na remoção simultânea de material orgânico, nitrogênio e fósforo (BUENO et al., 2019). Além disso, o biofilme bacteriano está sendo utilizado em outras atividades humanas, como na produção de vinagre, na produção de ácido cítrico e na extração de metais (XAVIER et al., 2003). Em processos industriais, a estrutura dos biofilmes tem papel de suma importância na operação de biorreatores, como por exemplo no *Airlift*, uma vez que a densidade do biofilme afeta a eficiência das reações, pois tem efeito direto na quantidade de biomassa alcançável no reator (XAVIER et al., 2003).

Entretanto, nem sempre a capacidade de produção de biofilme por bactérias confere ao homem situações benéficas. De uma maneira geral, a síntese de biofilmes em componentes sólidos, na maioria das vezes, está associada a danificação da superfície (CHAVES, 2004). Um dos materiais que mais atende às necessidades com relação ao espaço físico e ao volume de produção de bens alimentícios é o aço inoxidável. Contudo, os métodos de manutenção desses equipamentos acarretam a formação de ranhuras e rachaduras que são propícias para o alojamento de microrganismos provenientes dos alimentos, e uma vez alojados encontram condições ideais para formação de biofilmes (OLIVEIRA, 2005). Na indústria de alimentos, a contaminação biológica provoca aumento expressivo nos custos de produção, decorrentes de perdas de produtos que não podem ser comercializados por possuírem uma quantidade inaceitável de microrganismos potencialmente patogênicos (FLINT; BROOKS, 2008; OLIVEIRA, 2009). Soma-se a isto, no que diz respeito ao próprio equipamento, os biofilmes quando aderidos em uma superfície sólida atuam como camadas isolantes e causam o processo designado corrosão microbiologicamente induzida, em que a vida útil dos equipamentos é decaída em razão da transferência de calor e da superfície ser reduzida (OLIVEIRA; BRUGNETRA; PICOLLI, 2010).

Além da indústria alimentícia, pode-se citar a indústria do petróleo como outro pólo em que os agregados de biofilme causam efeitos nocivos, uma vez que a integridade de materiais metálicos submetidos a determinadas condições físico-químicas que beneficiam o crescimento de microrganismos pode ser danificada pela presença de

biofilmes em sua superfície (ALBUQUERQUE, ANDRADE, NEVES, 2014). Sendo assim, é importante salientar que os desinfetantes não penetram facilmente na matriz dos biofilmes após um ineficiente processo de limpeza. (FROZI; ESPER; FRANCO, 2017).

2.2 Biofilme na microbiologia clínica

Com o passar dos anos, o estudo de biofilmes bacterianos produzidos por patógenos humanos tornou-se particularmente importante em decorrência de sua resistência não apenas ao sistema imunológico do hospedeiro, como também aos antibióticos (MOORMEIER; BAYLES, 2017). A fisiologia característica dos biofilmes e a função de barreira adquirida pela matriz extracelular estabelecem resistência aos antimicrobianos, especialmente os antimicrobianos direcionados à parede celular (OTTO, 2006). Os biofilmes apresentam células chamadas “persistentes”, que são células dormentes indiferentes aos antibióticos quando comparadas com a maioria da população bacteriana, que permitem suportar concentrações de antibióticos muito acima do CIM (OTTO, 2018). Em infecções crônicas, os biofilmes executam um importante papel, uma vez que após sua formação as células individuais possuem a capacidade de se isolar e se dispersar do biofilme original podendo gerar sepse (LISTER; HORSWILL, 2017). Em relação as bactérias patogênicas produtoras de biofilme, destacam-se as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e as Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus* merece atenção especial pelo seu rápido desenvolvimento e capacidade de evoluir de infecção aguda para persistente (SILVA, 2015).

O gênero *Staphylococcus* compreende 38 espécies, dentre as quais 16 podem ser encontradas nas mucosas e na pele do ser humano, fazendo parte de sua microbiota. Somente *S. aureus* é capaz de coagular o plasma (coagulase positivo) de importância médica, sendo considerado um patógeno oportunista e o mais virulento dentre as espécies do gênero. Tal colonização aumenta de modo significativo as chances de infecção, pois fornecem um reservatório do patógeno, e quando barreiras fisiológicas são rompidas podem causar infecções cutâneas, pneumonia, osteomielite, dentre outras (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). O *S. aureus* pode adquirir resistência a todos antibióticos e por isso a Organização Mundial da Saúde o definiu como um patógeno de extrema prioridade na pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (MANARA et al., 2018).

Além disso, *S. aureus* é uma das principais causas de infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS) (SHUKLA; RAO, 2017), tendo um aumento considerável na mortalidade de pacientes que fazem uso de dispositivos médicos (MOORMEIER; BAYLES, 2017). A capacidade de formação de biofilme do *S. aureus* exerce uma função fundamental no desenvolvimento a resistência aos antimicrobianos (VALLIAMMAI, 2019). Quando aderidas aos dispositivos, as comunidades bacterianas formam um depósito de bactérias que podem ser liberadas no corpo, gerando uma infecção crônica, e uma vez que podem ser resistentes ao tratamento com antimicrobianos, são extremamente difíceis de se combater (RIBEIRO et al., 2012). Dentre os dispositivos que os biofilmes podem se formar, destacam-se as válvulas cardíacas, e a formação deste pode resultar em danos nos tecidos valvares ou na síntese de êmbolos (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Acredita-se que um dos motivos que pode levar à ineficácia dos tratamentos de infecções bacterianas provocadas por patógenos produtores de biofilmes em dispositivos médicos, esteja associada ao fato dos testes de susceptibilidade serem feitos em microrganismos na sua forma planctônica, a qual possui características e comportamento diferentes dos microrganismos que formam o biofilme (SILVA, 2013). Portanto, faz-se necessária a execução do diagnóstico de biofilmes e a prática terapêutica que vise minimizar estas infecções para que não sejam tão recorrentes (HØYBE, 2015).

Uma vez que a maioria dos antimicrobianos não se mostra eficaz contra células de biofilme, em função do seu modo de ação visar apenas processos celulares ativos, algumas estratégias vem sendo estudadas para desenvolver terapias alternativas no controle de biofilmes bacterianos, dentre as quais destacam-se os peptídeos antimicrobianos, terapia com bacteriófagos, uso de enzimas degradantes de biofilme e bloqueadores com detecção de quórum sensing (OTTO, 2018).

2.3 Atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Calliandra dysantha* Benth

O emprego de plantas medicinais é alicerçado na tradição familiar e se tornou prática comum na medicina popular (BRASILEIRO, 2008). Nos dias de hoje, é comum o uso destas em razão do alto custo de medicamentos industrializados e do difícil acesso da população à assistência médica. Grupos de pesquisa têm utilizado os conhecimentos da medicina popular para identificar novas alternativas para o combate à microrganismos

resistentes aos antimicrobianos (BRASILEIRO, 2008 e FERREIRA; DANTAS; CATÃO et al., 2014).

A capacidade de fornecimento de novas substâncias pelas plantas se dá em razão da capacidade destes seres conseguirem biossintetizar diferentes tipos de estruturas moleculares, em que as propriedades terapêuticas estão relacionadas principalmente aos metabólitos secundários, compostos que conferem vantagem adaptativa às plantas (NADER et al., 2010). Várias classes de compostos têm origem nas vias metabólicas secundárias, tais como os alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, dentre outros (MACEDO, 2018).

O bioma Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e ocupa aproximadamente 24% do território do país, abrigando parte expressiva da biodiversidade vegetal do país (SANTOS et al., 2010; KLINK; MACHADO, 2005). Em decorrência de sua grande biodiversidade, a maioria das espécies tem inúmeros usos para o homem, como condimentar, alimentício, têxtil, produtor de látex, entre outros (MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006), incluindo espécies de plantas de uso medicinal (PEREIRA et al., 2012). Entretanto, ainda há necessidade de estudos voltados para identificação de plantas com potencial farmacológico de plantas do Cerrado (GUARIM; MORAIS, 2003).

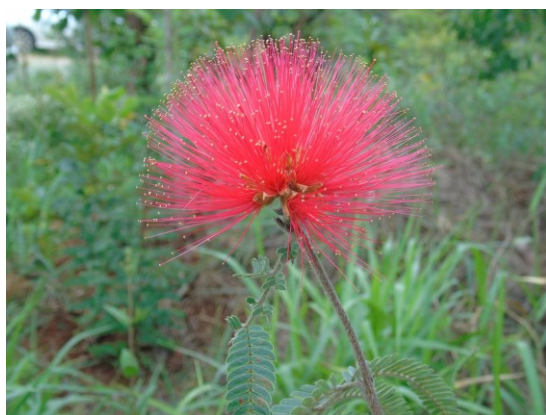
Dentre as espécies com uso medicinal do Cerrado, destaca-se o barbatimão (*Strhyphnodendron adstringens*) da família Fabaceae, que na medicina popular, o extrato da casca é largamente utilizado para o tratamento de leucorréia, diarreia, hemorragia, hemorroida, feridas, conjuntivite, corrimento vaginal, úlcera gástrica e inflamação da garganta (RODRIGUES et al., 2013). Por esses motivos, fármacos, como pomadas cicatrizantes que contém extrato do barbatimão já foram sintetizadas e podem ser comercializadas (SANTOS et al., 2017). No que se diz respeito a atividade antibiofilme, estudos já demonstraram que extratos obtidos de espécies nativas do Cerrado, como o extrato clorofórmico de raiz de *Croton antisiphiliticus*, apresentaram atividade antibiofilme significativa contra *S. aureus* (NADER et al., 2014).

A família Fabaceae compreende uma vasta quantidade de exemplares conhecidos pelo seu potencial medicinal (FAGUNDES et al., 2017). Dentre eles, destacam-se os pertencentes ao gênero *Calliandra*, como por exemplo a *C. surinamensis* que apresenta citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano e nas linhas celulares de câncer K562 (leucemia mielóide crônica) e T47D (câncer de mama), atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *S. saprophyticus* e *S. aureus*, assim como atividade antibiofilme nestas e na *E. coli*. As propriedades medicinais dessa

espécie estão relacionadas ao CasuL, uma lectina presente em seus pináculos foliares (PROCÓPIO et al., 2017).

A *Calliandra dysantha* Benth, conhecida popularmente como ciganinha, treme-treme, flor-do-cerrado, esponjinha ou flor-de-caboclo, é comumente utilizada na medicina popular como reguladora do ciclo menstrual (ALMEIDA et al., 1998; VILA VERDE; PAULA; CARNEIRO, 2003). Por existirem outras espécies do mesmo gênero que são popularmente utilizadas no tratamento de infecções microbianas, cuja literatura científica demonstrou sua atividade antimicrobiana (AGRA et al., 2008; ORISHADIPE; OKOGUN; MISHEULIA., 2010; SILVA, 2013), e por esta espécie ser facilmente encontrada em nossa região, em 2017, o grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia da UFU, campus Patos de Minas iniciou seus trabalhos com a *Calliandra dysantha* Benth (BRASIL, 2017; SILVA, 2018). Extratos metanólicos de raiz, caule, folhas e flores foram testados em bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*) e em Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), sendo que os três últimos extratos obtiveram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas. Dentre os três extratos, o de flor apresentou o melhor resultado com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 50 µg/mL para *S. aureus* e *S. epidermidis* (SILVA, 2018). Sabe-se que *S. aureus* é um importante patógeno que frequentemente apresenta resistência aos antimicrobianos, sendo que a formação de biofilmes pode ser apontada como uma das causas dessa resistência. Dessa forma, no presente trabalho foi investigado o efeito de extratos metanólicos de *C. dysantha* Benth. sobre o biofilme de *S. aureus* uma vez que nunca antes foi investigado seu efeito sobre o biofilme deste microrganismo.

Figura 3: *Calliandra dysantha* Benth



Fonte: A Planta da vez, 2019.

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito de extratos metanólicos (EMs) de *Calliandra dysantha* Benth. produzidos a partir do caule, folhas e flores, no biofilme de *Staphylococcus aureus* (ATCC29523).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas.

4.2 Extratos metanólicos de *Calliandra dysantha* Benth.

Os extratos metanólicos de *C. dysantha* Benth. foram preparados com amostras vegetais coletadas na zona rural do município de Coromandel - MG, por Brasil (2017) e por Silva (2018).

Resumidamente, os diferentes órgãos vegetais (caule, folha e flor) foram liofilizados durante 48 h e, as partes secas foram pulverizadas em moinhos de facas. Para o processo de extração foi utilizado o metanol (CH₃OH, 99 % de pureza) como solvente, e o volume usado, em mililitro (mL), foi de 0,1g / mL de pó do órgão da planta. As misturas formadas pelo pó e o solvente foram armazenadas em um béquer envolto com papel alumínio, a temperatura ambiente e por 72 h, com agitação a cada 24 h. Ao final deste período, a mistura foi filtrada em papel filtro com o auxílio de uma bomba a vácuo, sendo a porção líquida armazenada em um frasco tipo âmbar e, a sólida novamente ressuspendida em metanol. Este procedimento foi repetido por cinco vezes para a maceração exaustiva de todos os compostos presentes nos órgãos da planta. As porções líquidas obtidas foram submetidas a evaporação rotativa, a 55 °C, com pressão constante e reduzida de 500 pascal (Pa) e, os extratos finais de cada órgão foram armazenados em frascos de vidro, envoltos em papel alumínio e estocados em ultrafreezer a -80 °C.

4.3 Cepa bacteriana, condições de crescimento e cultivo

Os experimentos foram realizados com a cepa padrão *S. aureus* ATCC25923 produtora de biofilme, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Rosineide Ribas, coordenadora do Laboratório de Microbiologia Molecular, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), UFU. O microrganismo encontrava-se estocado a -20 °C em caldo

triptona de soja (TSB) acrescido de glicerol a 20%, e foi recuperado inoculando uma alçada do estoque, com auxílio da alça de platina, em uma placa contendo agar triptona de soja (TSA), seguida de incubação por 24 h, a 37 °C. Posteriormente, foi avaliada a pureza do crescimento bacteriano, e colônias isoladas foram utilizadas nos ensaios seguintes.

4.4 Avaliação do efeito dos extratos sobre o biofilme de *S. aureus*.

Para a preparação do biofilme de *S. aureus* foi utilizado o protocolo proposto por Batistão et al (2014), com modificações. Resumidamente, 3 colônias de *S. aureus* foram inoculadas em 20 mL de TSB e incubadas por 18h, a 37 °C e 120 rpm, para a obtenção de um crescimento microbiano com aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Em seguida, essa suspensão bacteriana foi lavada duas vezes em 20 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), a 12000 rpm, por 15 minutos. A suspensão bacteriana foi então diluída para 10^7 UFC/mL em um tubo contendo meio TSB e, 200 µL dessa suspensão foram inoculadas, em microplacas de poliestireno de 96 poços, incubadas por 24 h, a 37 °C, a 75 rpm para os ensaios com os extratos. Em paralelo, a suspensão bacteriana foi diluída seriadamente (1:10) e, 10 µL de cada diluição foram inoculados, em quadruplicata, em placas de TSA, pela técnica de gota e incubadas a 37 °C por 24 h, para posterior contagem das colônias e controle da concentração bacteriana inoculada.

Os extratos dos diferentes órgãos de *C. dysantha* Benth foram diluídos em DMSO (5%) e caldo TSB a uma concentração de 1000 µg/mL e então esterilizados utilizando filtros de 22 µm de porosidade. Os extratos foram então seriadamente diluídos (1:2) de 800 µg/mL à 50 µg/mL, e utilizados nos ensaios posteriores.

Para os ensaios de avaliação do efeito dos extratos vegetais sobre o biofilme de *S. aureus* foi utilizado o protocolo descrito por Brambilla et al. (2017), com modificações, que utiliza o brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas presentes no biofilme, de reduzir o MTT, convertendo os sais de amarelo de tetrazólio em cristais de formazana púrpura, e assim obter um valor de absorbância diretamente proporcional à viabilidade celular. Primeiramente, poços das placas contendo o biofilme de *S. aureus* cultivado por 24h, foram lavados duas vezes com solução salina (0,9%). Em seguida, 200 µL das concentrações mencionadas anteriormente dos extratos vegetais foram inoculados, em

triplicata, aos poços das placas, seguida de uma nova incubação (24 h, a 37 °C e 75 rpm). Como controle positivo foi utilizado o antimicrobiano cloranfenicol (diluição seriada 1:2, de 640 µg/mL a 80 µg/mL), como controle de tratamento o meio TSB, como controle negativo DMSO (5%), e como controle de esterilidade o meio TSB em poços sem inóculo bacteriano.

Os poços foram então lavados e, a cada um, adicionados 200 µL de MTT (0,5 mg/mL) seguido de uma nova incubação por 2 h, a 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi descartado, foram adicionados 200 µL de DMSO (5%), e a placa foi incubada por 10 minutos, à 37°C para a dissolução dos sais de formazana. Por fim, 100 µL da solução de cada poço, foram transferidos para uma nova placa e foi realizada a leitura da absorbância de cada poço em um espectrofotômetro, a 560 nm de comprimento de onda. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular das células do biofilme, a qual foi calculada utilizando-se os valores dos poços tratados com as diferentes concentrações dos extratos, e os valores dos poços aos quais foi adicionado apenas o meio TSB (controle de tratamento), utilizando a seguinte fórmula:

$$V (\%) = \frac{DO_{ext}}{DO_{ct}} \times 100$$

Onde:

V (%) = Viabilidade celular do biofilme em porcentagem;

DO_{ext} = Densidade óptica média do tratamento com as diferentes concentrações dos extratos;

DO_{ct} = Densidade óptica média do controle negativo.

4.5 Análise estatística

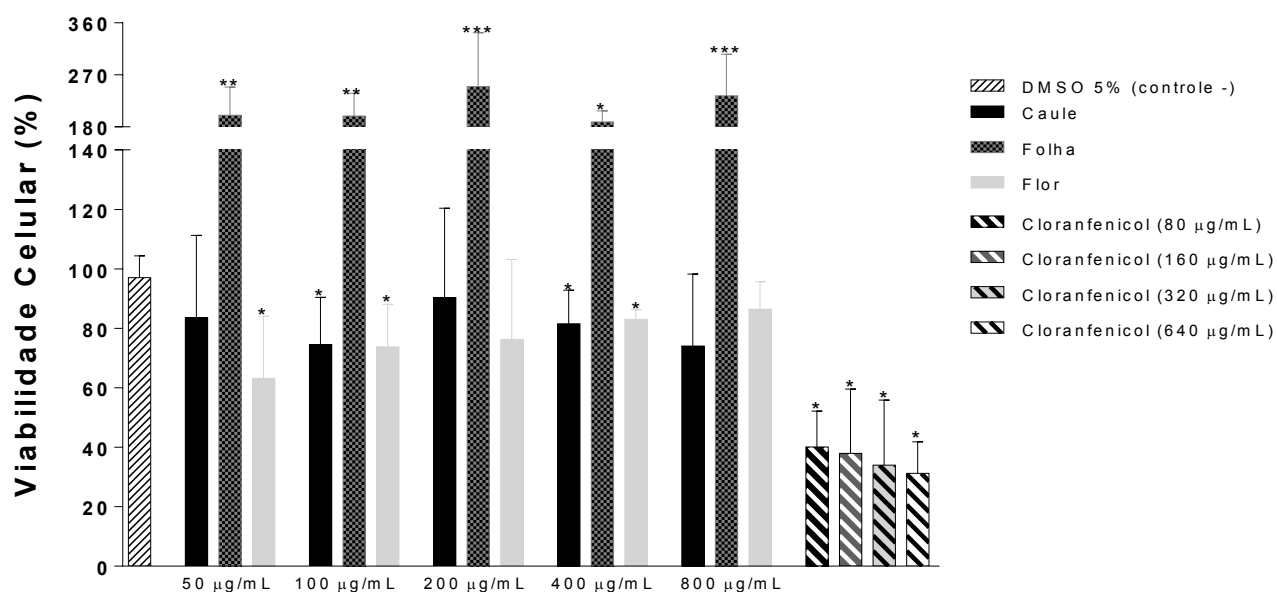
Foi utilizado o software Graph Pad Prism (v.6) para a análise dos resultados. As médias e os desvios-padrão foram calculados para cada um dos tratamentos e feita a comparação com os resultados encontrados para o grupo tratado com DMSO 5% (controle negativo). A distribuição dos dados foi avaliada, a análise de variância aplicada pelo teste de ANOVA e as médias dos grupos foram analisadas pelo pós-teste de TUKEY para múltiplas comparações. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes concentrações dos extratos metanólicos preparados a partir do caule, folha e flores, que variam de 800 µg/mL à 50 µg/mL, foram inoculadas em biofilmes de *S. aureus*, e o seu efeito avaliado através do ensaio colorimétrico de MTT. Esse método é comumente utilizado para avaliação de viabilidade celular, uma vez que após o reagente ser incubado com células viáveis, este é quebrado por enzimas mitocondriais, e se transforma de um composto amarelo para um composto azul escuro, a formazana (PERES et al., 2008). Uma vez que no ensaio a absorbância obtida é diretamente proporcional à viabilidade celular, a porcentagem da viabilidade celular foi calculada por comparação das absorbâncias das células tratadas com as diferentes concentrações de extratos, com as células não tratadas (controle de tratamento).

Além dos extratos, também foram testados nos ensaios de biofilme os reagentes cloranfenicol, como controle positivo, e o dimetilsulfoxido (DMSO), como controle negativo. O cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro, usado principalmente contra bactérias anaeróbias e Gram-positivas, inibidor da síntese proteica bacteriana e com efeito bacteriostático (MOURA, 2018). Esse antimicrobiano é amplamente utilizado como controle em metodologias de avaliação de sensibilidade de microrganismos a diferentes compostos, seja de células planctônicas como também de biofilmes (EPOSITO, 2018). O DMSO é um composto anfipático com uma região altamente polar e dois grupos metila apolar, o que o torna solúvel tanto em meios aquosos quanto em meios orgânicos, e por isso, é um dos solventes mais utilizados na preparação de extratos que podem conter substâncias insolúveis em água (SANTOS et al., 2003). Além disso, sabe-se que o DMSO não possui efeito antimicrobiano, tanto em células planctônicas quanto em células de biofilme, e por isso é largamente utilizado como controle negativo nesse tipo de investigação (SOUSA, 2014). Assim, os resultados obtidos no estudo foram apresentados na **Figura 3**.

Figura 3: Viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* (ATCC25923), frente ao tratamento com diferentes concentrações dos extratos metanólicos de *C. dysantha* Benth. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, por comparação dos resultados da absorbância (A560) das células tratadas com as células não tratadas. Os valores médios da viabilidade celular para cada um dos tratamentos foram comparados ao valor médio do tratamento com DMSO 5% (controle negativo). Os asteriscos significam diferença estatística (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



Fonte: Próprio autor.

Em relação ao extrato metanólico preparado a partir das flores, pode-se perceber uma diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 400 µg/mL quando comparado ao controle negativo (DMSO) apresentando, portanto, atividade antibiofilme para algumas das concentrações testadas ($p < 0,05$). Dentre as diferentes concentrações testadas, 50 µg/mL foi a que apresentou menor viabilidade celular (63,1%) e 800 µg/mL a que apresentou maior viabilidade celular (86,4%). Efeito semelhante foi observado para os extratos preparados a partir do caule, demonstrando novamente uma atividade antibiofilme nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, sendo a de 100 µg/mL a que apresentou maior atividade antibiofilme (69,3%) de viabilidade celular e a de 200 µg/mL a menor atividade (90,4%) de viabilidade.

Plantas da família Fabacea, a qual pertence o gênero *Calliandra*, são portadoras de lectinas, proteínas envolvidas na defesa contra patógenos, herbívoros e predadores, que apresentam propriedades bacteriostáticas e antibiofilme contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (FERNANDES, 2012). Estudos recentes demonstraram que a espécie *Calliandra surinamensis* contém em seus órgãos uma lectina termoestável e ácida, com atividade citotóxica contra células cancerígenas e atividade antibiofilme em bactérias patogênicas humanas. A lectina CasuL reduziu consideravelmente a formação

de biofilme nas bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à oxacilina e *Staphylococcus saprophyticus*. Contra o biofilme de *S. aureus* o efeito inibitório foi superior a 50% a partir de 100 µg/mL, já contra a cepa resistente à oxacilina, somente a partir de 400 µg/mL. Dentre os ensaios realizados, apenas contra *S. saprophyticus* apresentou efeito dose dependente, ou seja, o aumento da concentração de CasuL também aumentou a atividade antibiofilme (PROCÓPIO et al., 2017).

As lectinas são glicoproteínas que possuem capacidade de se ligar a açúcares simples ou complexos, aglutinar células sanguíneas e podem ser encontradas em tecidos de microrganismos, animais e plantas. Nas plantas, se encontram em órgãos de reserva, um indicativo indireto de seu papel como proteína de defesa, pois interagem com glicoconjugados de outras espécies (CÁCERES-HUAMBO, 2016). Já foi comprovado o uso de lectinas como terapia anti-adesão bacteriana, o qual pode ser explicado pela sua ligação aos carboidratos bacterianos, o que impossibilita a adesão bacteriana à superfície, etapa inicial para o desenvolvimento do biofilme (FAZANARO, 2010). Nesse sentido, estudos *in vitro* foram feitos e demonstraram potencialidade das lectinas, no desenvolvimento de biofilmes orais, como meio profilático de processos cariosos (CARNEIRO, 2007).

Um outro estudo, realizado com extratos de *Zuccagnia punctata* Cav., também pertencente à família Fabaceae, demonstrou que a inibição da formação do biofilme de *S. aureus* está relacionada a presença de flavonoides (ALBERTO et al., 2018). Outros estudos já demonstraram que extratos de outras fabáceas, como a *Sesbania grandiflora*, contém metabólitos tais como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos e esteroides e que têm potencial para inibir aderências e impedir o desenvolvimento de biofilmes bacterianos sob condições de reposição de nutrientes, o que indica que algum destes atua como agente bioativo contra *S. aureus* (GANDHI et al., 2017). Nesse contexto, uma vez que o uso de produtos vegetais no combate ao biofilme pode ser uma alternativa viável, pesquisas fitoquímicas com o objetivo de descrever quais constituintes estão presentes nos extratos metanólicos de *Calliandra dysantha* Benth., e assim correlacioná-los às atividades biológicas aqui demonstradas, são de grande importância para a continuidade das pesquisas com esse espécime vegetal.

Por outro lado, o extrato metanólico preparado a partir das folhas, ocasionou o aumento da viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* para todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle negativo (DMSO), apresentando, portanto, uma atividade pró-biofilme. Dentre as diferentes concentrações testadas, 400 µg/mL foi a que

apresentou menor viabilidade celular (188,0%) e 200 µg/mL a que apresentou maior viabilidade celular (249,6%). A atividade pró-biofilme já foi demonstrada em outras pesquisas (VALLIAMMAI et al., 2019; PIRES et al., 2018) Em biorreatores, o aumento de biofilmes é desejável em processos aeróbios, como consequência da fraca penetração de oxigênio (XAVIER et al., 2003), e nesse sentido, compostos pró-biofilme poderiam ser utilizados. O aumento na taxa de produção de biofilme pode ser explicado pelo fato de alguns microrganismos se adaptarem às condições de estresse do ambiente externo, como a limitação de nutrientes, osmolaridade, pH ou composição do meio, capazes de ativar genes responsáveis pela expressão de proteínas de superfície que propiciam a adesão e produção de exopolissacarídeos envolvidos na produção de biofilme (COSTA et al., 2015).

Valliammai et al (2019), demonstraram que dentre os 20 compostos pesquisados, 4 aumentaram a viabilidade celular do biofilme de *S. aureus*, dentre eles o ácido elágico. Esse composto pertencente à família dos taninos é um composto fenólico presente nas espécies vegetais, principalmente nas frutas, que possui atividade antioxidante e/ou anticarcinogênica, e em razão de sua natureza fenólica tende a reagir formando complexos com outras moléculas como proteínas, alcaloides e polissacarídeos (ABE-MATSUMOTO, 2008; CRUZ-ANTONIO et al., 2010). Somado a isso, Silva (2013) encontrou que dentre as principais classes de metabólitos secundários presentes no gênero *Calliandra*, estão os diterpenos cassanos, saponinas, flavonoides e taninos, sendo que dentre os taninos, o ácido elágico, podendo este composto ser um dos responsáveis pela atividade pró-biofilme aqui demonstrada. Mais uma vez, estudos fitoquímicos futuros poderiam auxiliar na identificação dos compostos presentes nos extratos testados e assim correlacioná-los às atividades biológicas aqui demonstradas.

6 CONCLUSÃO

Os extratos metanólicos preparados com o caule e a flor de *Calliandra dysantha* Benth apresentam uma diminuição da viabilidade celular do biofilme de *S. aureus*, e uma consequente atividade antibiofilme nas concentrações de 100 µg/mL, 400 µg/mL e 50 µg/mL, 100 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente, aos órgãos. Por outro lado, o extrato preparado com a folha aumentou a viabilidade celular do biofilme de *S. aureus* em todas as concentrações testadas, e por isso, apresentou atividade pró-biofilme. Os resultados aqui encontrados podem estar relacionados aos metabólitos secundários presentes nos diferentes órgãos da planta, como por exemplo, as lectinas que já foram relacionadas à atividade antibiofilme e o ácido elágico, com capacidade pró-biofilme, mais estudos devem ser feitos para que corroborem com esses resultados, uma vez que é a primeira vez que se testa os extratos de *Calliandra dysantha* Benth em biofilme de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T. **Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros**. 2007. 106 p. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ABE-MATSUMOTO, L.T. **Ácido elágico em alimentos regionais brasileiros**. 2008. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. DOI: 10.11606/D.9.2017.tde-06102017-180612

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000300023.

ALBERTO, M. R. et al. Effect of *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*. Toxicity studies **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1713-1719, 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.014.

ALBUQUERQUE, A. C.; ANDRADE, C; NEVES, B. Biocorrosão – da integridade do biofilme à integridade do material. **Corrosão e Protecção de Materiais**, v. 33, n. 1-2, p. 18-23, 2014.

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. 1ª ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.

ARAMPATZI, S. I.; GIANNOGLOU, G.; DIZA, E. Biofilm formation: A complicated microbiological process. **Aristotle University Medical Journal**, v. 38, n. 2, p. 21-29, 2011.

BATISTÃO, D. W. F. **Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e sua associação com o perfil clonal** p. 87. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia aplicada) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

BRAMBILLA, L. Z. S.; ENDO, E. H; CORTEZ, D. A. G; DIAS FILHO, B. P. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Rev. bras. farmacogn.** [online]. 2017, v.27, n.1, p.112-117. ISSN 0102-695X. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.008>.

BRASIL, M. C. O. A. **Atividade antimicrobiana do extrato metanólico total e frações de *Calliandra dysantha* Benth.** 2017. 23 p. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

BRASILEIRO, B. G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 629–636, 2008.

BROOKS, J.D; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problemas and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology** 2008. v. 43, p.2163-2176, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x>.

BUENO, R. F. et al. Remoção simultânea de material orgânico, nitrogênio e fósforo em um reator em bateladas sequenciais com biofilme de leito móvel operado pelo processo anaeróbio-anóxico-óxico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, n. 4, p. 747-760, 2019. DOI: 10.1590/S1413-41522019125711.

CARNEIRO, V. A. **Atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme bacteriano através de lectinas vegetais.** 2007. 89 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CERVANTES-GARCÍA, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R; SALAZAR-SCHETTINO, P. M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica**, v. 61, n. 1, p. 28-40, 2014.

CHARACKLIS, WG . Biofilm process, p. 195-232. **In WG Characklis e KC Marshall** (ed.), *Biofilms* . John Wiley & Sons, Nova Iorque, NY, 1990.

CHAVES, L. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável**. 2012. 186 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.

CHAVES, L. C. D. **Estudo de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável**. 2004. 187 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Gualtar, 2004.

COSTA, E. et al. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 6, p. 908-917, 2015.

CRUZ, E. D. A. ***Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coccus* resistente à metilina em trabalhadores de um hospital universitário: colonização e crenças em saúde**. 2008. 189 p. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CRUZ-ANTONIO, F. V. et al. Propriedades Químicas e Industriales del Ácido Elágico. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 2, n. 3, p. 67-79, 2010.

DETTWEILER, M. et al. American Civil War plant medicines inhibit growth, biofilm formation, and quorum sensing by multidrug-resistant bacteria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 692-700, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-44242-y.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

EPOSITO, F. R. S. **Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes produzidos por clones de bactérias multirresistentes de importância clínica e epidemiológica no Brasil**. 2018. 86 p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

FAGUNDES, N. C. A; OLIVEIRA, G. L; SOUZA, B. G. Etnobotânica de plantas medicinais utilizadas no distrito de Vista Alegre, Claro dos Poções – Minas Gerais. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11(1), p. 1-118, 2017 | e-ISSN: 2446-4775

FAZANARO, F. **Avaliação *in vitro* da Interferência de Lectinas Vegetais e do Diterpeno Casbano Isolado de *Croton nepetaefolius* Sobre o Crescimento de Formas Planctônicas e Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa***. 2010. 67 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2010.

FERNANDES, A. V. **Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de Fabaceae da Amazônia**. 2012. 104 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa Multi-institucional de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, I. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 225–230, 2014.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

FROZI, J.; ESPER, L. M. R.; FRANCO, R. M. Single-and Multispecies Biofilms by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella spp.* Isolated from Raw Fish and a Fish Processing Unit. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, p. 1-6, 2017. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170011.

GANDHI, A. D. et al. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 12, n. 1, p. 193-197, 2017. DOI: doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.004.

HOGT, A. H.; DANKERT, J.; FEIJEN, J. Encapsulation, slime and production and surface hydrophobicity of coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 18, p. 211-215, 1983.

HØYBE, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 1-25, 2015. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.

CÁCERES-HUAMBO, A. Determinación de la estructura primaria de la lectina V-2 de semillas de arveja (*Pisum sativum* L.) y su efecto antibacteriano en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. **Idesia (Arica)**, v. 35, n. 1, p. 54-62, 2016. DOI: 10.4067/S0718-34292017005000006.

KIEDROWSKI, M. R. et al. *Staphylococcus aureus* Biofilm Growth on Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells Is Enhanced during Respiratory Syncytial Virus Coinfection. **mSPHERE**, v. 3, n. 4, p. 341-359, 2018. DOI: 10.1128/mSphere.00341-18.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Revista Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 20-38, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00020-18.

LISTER, J. L; HORSWILL, A. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Front Cell Infect Microbiol.** 2014, p. 4-178. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00178

MACEDO, A. R. S. **Efeitos dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* (Jucá) na inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e em conjugação de plasmídeos de resistência em *Escherichia coli*.** 2018. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis.** 2005. 129 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2005.

MANARA, S. et al. Whole-genome epidemiology, characterisation, and phylogenetic reconstruction of *Staphylococcus aureus* strains in a paediatric hospital. **Genome Medicine**, v. 10, n. 82, p. 456-474, 2018. DOI: 10.1186/s13073-018-0593-7.

MARONI, B. C.; STASI, L. C.; MACHADO, S. R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu.** 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2006.

MARQUES, S. C. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal**

of **Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538-543, 2007. DOI: 10.1590/S1517-83822007000300029.

MELO, P. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina**. 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

MEYER, H. G.; GATERMANN, S. Surface properties of *Staphylococcus saprophyticus*: hydrophobicity, haemagglutination and *Staphylococcus saprophyticus* surface-associated protein (Ssp) represent distinct entities. **APMIS**, v. 102, n. 7, p. 538-44, 1994

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, 2017.

MOURA, F. M. L. **Formação de Biofilme e Perfil de Resistência a Antimicrobianos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* Isoladas de Leite de Tanques de Expansão**. 2018. 86 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

NADER, T. T. **Potencial de Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de diterpeno isolado de *Croton antispylliticus* frente *Staphylococcus aureus*. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.30, n.1, p. 032-037, 2014. ISSN 2175-0106

GUARIM, G. N.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um Estudo Bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 4, p. 561-584, 2003.

NGYEN, T.; RODDICK, F. A.; FAN, L. Biofouling of water treatment membranes: a review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures. **Membranes (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 804-840, 2012. DOI: 10.3390/membranes2040804.

NOGUEIRA, B. L. **Modelagem matemática de reatores de leito móvel com biofilme para tratamento de efluentes**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

OLIVEIRA, D. I. A. **Formação de biofilmes em lâminas de aço inoxidável e vidro temperado por *Escherichia coli***. 2005. 32 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades, Universidade de São Paulo / Instituto Butantan / Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, M. M. M. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes***. 2009. 175 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 3, P, 277-284, 2010.

ORISHADIPE, A.; OKOGUN, J.; MISHEULIA, E. (2010). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of the hexane extract of *Calliandra portoricensis* and its antimicrobial activity. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 4, n.7, p. 131–134, 2010.

OTTO, M. Evasão bacteriana de peptídeos antimicrobianos por formação de biofilme. In: **Peptídeos antimicrobianos e doenças humanas**. Springer, Berlim, Heidelberg, p. 251-258, 2006.

OTTO, Michael. Biofilmes estafilocócicos. In: **Biofilmes bacterianos**. Springer, Berlim, Heidelberg, p. 207-228, 2008.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen. **Nat Rev Microbiol**. n. 8, p. 555- 567, 2009.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175-188, 2013.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Microbiol Spectr**. 2018, v. 6, n. 4, 2018. DOI: 10.1128 / microbiolspec.GPP3-0023-2018

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, v. 1, n. 1, p. 36-38, 2009.

PEREIRA, Z. V. et al. Usos múltiplos de espécies nativas do bioma Cerrado no Assentamento Lagoa Grande, Dourados, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 2, p. 126-136, 2012. ISSN: 1980-9735

PERES, L. A. B. et al. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 30, n. 1, p. 48-53, 2008.

PIRES, I. C. et al. Influência do polipirrol e dos níveis de salinidade na formação de biofilme em *Aeromonas* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 1528-1536, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-5374,

PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, n. 1, p. 419-449, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.019.

RODRIGUES, D. F. et al. O Extrato da Casca de Barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, na Cicatrização de Feridas em Animais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1583-1601, 2013.

SANTOS, A. et al. Pasta Cicatrizante Contendo Extrato de *Calendula officinalis* e *Stryphnodendron barbatiman martius adstringens* (Barba-Timão). **Pesquisa e Ação**, v. 3, n. 1, 2017.

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

SANTOS, F. B. **Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos do cerrado *Genipa americana* L., *Dipteryx alata* Vog. e *Vitex cymosa* Bert.** 2015. 12 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

SANTOS, L. J.; MARMONTEL C. V. F.; MARTINS, T. M.; MELO, A. G. C. Fitossociologia do cerrado *Sensu stricto* localizado no município de Carbonita-MG. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 15, n. 1, p. 77-90, 2010.

SANTOS, N. C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035-1041, 2003. DOI: 10.1016/s0006-2952(03)00002-9.

SHUKLA, K. S; RAO, T. S. *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. **Water & Steam Chemistry Division**, BARC Facilities, Kalpakkam; Homi Bhabha National Institute, Mumbai, India. 2017, v. 146, n.7, p.1-8. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_410_15

SILVA, I. B. **Investigação das Atividades Toxicológica e Antimicrobiana dos Compostos:** Indican (Sintético e Natural) e Indigóides de Folhas de *Indigofera suffruticosa* (Fabacea). 2015. 65 p. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA, J. R. F. **Importância da formação de biofilmes nas infecções associadas A biomateriais.** 2015. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

SILVA, T. S. **Constituintes químicos e atividades farmacológicas de *Calliandra umbelífera* Benth. (Fabaceae).** 2013. 160 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

E SILVA, V. N. M. **Atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima de extratos metanólicos totais de *Calliandra dysantha* Benth. (Fabacea).** 2018. 30 p. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015. DOI: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n1p27-31.

SOUZA, I. P. **Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênico.** 2014. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

VALLIAMMAI, A., Sethupathy, S., Priya, A. et al. 5-Dodecanolide interferes with biofilm formation and reduces the virulence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) through up regulation of *agr* system. **Sci Rep** 9, 13744, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-50207-y

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 64–66, 2003. DOI: 10.1590/S0102-695X2003000300024.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.