



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JONATHAN MANDÚ DE ARAÚJO

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DE
ANACARDIUM MICROCARPUM* CONTRA *ENTEROCOCCUS
***FAECALIS* E *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VANCOMICINA**
RESISTENTES

RECIFE

2023

JONATHAN MANDÚ DE ARAÚJO

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DE
ANACARDIUM MICROCARPUM CONTRA *ENTEROCOCCUS*
FAECALIS E *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VANCOMICINA
RESISTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Farmacêuticas,
da Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Dra. Bárbara de Azevedo Ramos.

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Araújo, Jonathan Mandú de .

Potencial antibacteriano e antibiofilme de *Anacardium microcarpum* contra
Enterococcus faecalis e *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes /
Jonathan Mandú de Araújo. - Recife, 2023.

39 p, tab.

Orientador(a): Maria Tereza dos Santos Correia

Cooorientador(a): Bárbara de Azevedo Ramos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. IRAS. 2. Antimicrobiano. 3. Antibiofilme. 4. Anacardiaceae. I. Correia,
Maria Tereza dos Santos. (Orientação). II. Ramos, Bárbara de Azevedo.
(Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 03 /04 /2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Data: 05/04/2023 14:30:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE PATRICIA CERQUEIRA MACEDO
Data: 08/04/2023 17:29:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
(Presidente e Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br AMANDA VIRGINIA BARBOSA
Data: 08/04/2023 12:42:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Amanda Virgínia Barbosa
(Examinadora)
Escola Débora Feijó

Documento assinado digitalmente
gov.br SIVONEIDE MARIA DA SILVA
Data: 08/04/2023 16:36:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Sivoneide Maria da Silva
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por sonharem este sonho junto comigo, por toda força, dedicação, amor e carinho que me foram depositados para superar cada obstáculo enfrentado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvidas, a graduação não é uma etapa fácil de atravessar. Ela exige tempo, muito tempo, dedicação, paciência, ânimo, foco e força de vontade. Sem amor por aquilo que você está batalhando diariamente para conquistar, a jornada fica cada dia mais árdua. Porém, tive a sorte de amar o que estava fazendo, apesar dos pesares.

Primeiramente, não poderia deixar de agradecer a pessoa que não desistiu de tudo, que apesar de todos os desafios, se manteve focado, esperançoso, mantendo seus valores e sempre buscou manter a cabeça no lugar para tentar atravessar a maré da forma mais cautelosa possível: eu. A mim, o meu muito obrigado.

A meu pai, Júnior, por trabalhar dia, noite e madrugada e muitas vezes abdicar de viver para prover uma vida melhor para minha mãe e eu. Por enfrentar condições de trabalho desonestas com muita fé e força para cuidar da nossa família. Pelos poucos, mas certos, puxões de orelha que levei quando foram necessários. Minha mãe não poderia ter encontrado um pai melhor para mim.

À minha mãe, Célia, pela vida e por ser meu guia até os dias de hoje. Sei que não é uma tarefa fácil criar um filho principalmente quando ele, parafraseando Zezé di Camargo e Luciano, “vira passarinho e quer voar”, mas como ela sempre diz: “Eu criei você para o mundo”. Muito obrigado pelo carinho, afeto, pela atenção e extrema dedicação. Cada passo que dei até aqui foi sob seus cuidados.

Agradeço também ao Programa de Assistência Estudantil, que por meio do programa de Moradia Estudantil, pude custear meus gastos com moradia, alimentação, locomoção, lazer e demais condições de permanência durante minha formação acadêmica. Agradeço também ao Programa Bolsa Família, que tem potencializado e melhorado a qualidade de vida de inúmeras famílias, assim como contribuiu com a minha. Ao Sistema Único de Saúde (SUS), que sempre esteve ali, apesar das falhas, contribuindo com condições de vida saudável, prevenindo riscos, e doenças à saúde da população.

A todos os laços de amizade que criei quando embarquei nessa jornada, especialmente à “quinzenal”. A todos os amigos que estão comigo desde os tempos de ensino médio-técnico no

Instituto Federal de Pernambuco. Obrigado por toda diversão, companheirismo, risadas, brincadeiras, abraços e por compartilharem a vida comigo.

À minha orientadora, Tereza Correia, pelo caminho trilhado desde a Iniciação Científica, por todo carinho, paciência e acolhimento. À minha coorientadora, Bárbara Ramos, pela atenção sem igual, dedicação e companheirismo. Que sorte poder conhece-la além do laboratório, da vida acadêmica e dos títulos. Muito obrigado pelas mensagens tarde da noite, pelo conforto dado quando achei que nada ia dar certo e por trilhar essa jornada acadêmica ao meu lado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e ao Departamento de Bioquímica, que durante os três anos de Iniciação Científica foi meu lar, ao lado de cientistas maravilhosas, onde não poderia deixar de citar Amanda, Vitória e Sivó. Obrigado por cada ensinamento e por me inspirar a ser uma pessoa profissional, ética e responsável. Sou sortudo por ter conhecido vocês.

À Jonathan, por compartilhar juntinho de mim esta imensa jornada que é viver. Obrigado por ser meu porto seguro, por me incentivar e me inspirar a lutar cada vez mais por aquilo que acredito ser certo. Estar com você em qualquer lugar é estar em casa.

Aos membros da banca, Dani, Amanda, e Sivó, não poderia ter escolhido melhor minha banca senão estas doutoras maravilhosas e competentes.

“Escrever é talvez a maior das invenções humanas, unindo pessoas, cidadãos de épocas distantes que nunca se conheceram. Os livros quebram os grilhões do tempo. Um livro é a prova de que os humanos são capazes de fazer magia”. – Carl Sagan - Cosmos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. Metabolismo secundário.....	11
2.2. Compostos fenólicos.....	14
2.3. Família <i>Anarcardiaceae</i>	14
2.4. <i>Anacardium microcarpum</i>	15
2.5. Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS)	16
2.6. Resistência bacteriana	16
2.7. <i>Enterococcus</i> spp.	18
2.8. Importância clínica de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. Material vegetal.....	22
4.2. Extração do material	22
4.3. Quantificação de compostos fenólicos.....	22
4.4. Atividade antimicrobiana.....	22
4.4.1. Microrganismos	22
4.4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	23
4.4.3. Atividade Antibiofilme	23
4.4.4. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	31
8. ANEXOS	37

RESUMO

As infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Dentre os principais microrganismos envolvidos nas IRAS, as bactérias Gram-positivas destacam-se como o segundo grande grupo onde os gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* são os representantes mais relacionados. O gênero *Enterococcus* têm sido descrito como a principal causa de infecções nosocomiais, principalmente por sua alta resistência multirresistência intrínseca aos antibióticos, sendo as espécies *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as mais prevalentes em infecções de feridas cirúrgicas, do trato urinário e associadas às Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCS). Com isso, a busca por plantas com potenciais bioativos tem crescido cada vez mais, como no caso da família *Anacardiaceae* que tem se destacado por possuir espécies com diversas atividades biológicas. Extratos de *Anacardium microcarpum*, uma das espécies representantes da família, têm sido descritas por possuir bioatividade como antioxidante, bactericida e fungicida. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a concentração total de fenóis, o potencial antimicrobiano e antibiofilme do extrato hidroalcolico das folhas de *A. microcarpum* contra isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* vancomicina resistentes. A concentração de fenóis foi avaliada pelo método do Folin-Ciocalteu e expresso em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g extrato). Para avaliação antimicrobiana foram utilizados os métodos de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), para a avaliação da atividade antibiofilme o extrato foi introduzido junto aos microrganismos para verificar a anti formação do biofilme. O extrato possui 405,47 mg EAG/g extrato e não teve atividade inibitória contra a maioria dos isolados clínicos testados. No entanto, o extrato teve a capacidade de inibir 100% do biofilme de seis microrganismos, três *E. faecalis* e três *E. faecium*, o que demonstra que os compostos podem não ser capazes de inibir o crescimento microbiano, mas podem ser capazes de inibir algum componente que seja importante para formar a matriz do biofilme. Assim, é válido ressaltar que todos os tipos de variações extrativas, bem como outras partes da planta devem ser examinados em estudos antimicrobianos uma vez que fatores como sazonalidade e métodos de extração, podem implicar na atividade biológica.

Palavras-chave: IRAS; Antimicrobiano; Antibiofilme; *Anacardiaceae*.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are a major public health problem in Brazil and worldwide. Among the main microorganisms involved in HAIs, Gram-positive bacteria stand out as the second major group where the *Staphylococcus* and *Enterococcus* genera are the most closely related representatives. The genus *Enterococcus* has been described as the main cause of nosocomial infections, mainly due to its high intrinsic multidrug resistance to antibiotics, with the species *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* being the most prevalent in infections of surgical wounds, urinary tract and associated with Primary Infections of Blood Current (IPCS). As a result, the search for plants with bioactive potential has grown more and more, as in the case of the *Anacardiaceae* family, which has stood out for having species with diverse biological activities. Extracts of *Anacardium microcarpum*, one of the representative species of the family, have been described for having bioactivity as an antioxidant, bactericide and fungicide. Thus, this work aimed to evaluate the total concentration of phenols, the antimicrobial and antibiofilm potential of the hydroalcoholic extract of the leaves of *A. microcarpum* against clinical isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* vancomycin resistant. The concentration of phenols was evaluated by the Folin-Ciocalteu method and expressed in milligram equivalent of gallic acid per gram of extract (mg EAG/g extract). For antimicrobial evaluation, the methods of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) were used. The extract has 405.47 mg EAG/g extract and had no inhibitory activity against most clinical isolates tested. However, the extract was able to inhibit 100% of the biofilm of six microorganisms, three *E. faecalis* and three *E. faecium*, which demonstrates that the compounds may not be able to inhibit microbial growth, but may be able to inhibit some component that is important to form the biofilm matrix. Thus, it is worth emphasizing that all types of extractive variations, as well as other parts of the plant, should be examined in antimicrobial studies, since factors such as seasonality and extraction methods may imply biological activity.

Keywords: IRAS ; Antimicrobial; Antibiofilm ; *Anacardiaceae*.

1. INTRODUÇÃO

As infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo e estão associadas a qualquer infecção que acomete o paciente durante ou após o tratamento a qual foi submetido, seja ele por internação hospitalar ou estabelecimentos de saúde (WHO, 2020). Embora muitas vezes ocultas da atenção do público, alguns estudos têm demonstrado sua crescente taxa de prevalência em diversos países da Europa, 7,1%, Estados Unidos da América (EUA), 4%, e China, 3,6% (ZARB et al., 2012; LI et al., 2014; MAGIL et al., 2014).

No Brasil, segundo Fortaleza e seus colaboradores (2017), através de um estudo multicêntrico, multisetorial e multietário, abrangendo 152 hospitais das cinco macrorregiões do Brasil, incluindo 6520 pacientes de múltiplos setores e idades (adulto, pediátrica e neonatal) no período de 18 meses (2011-2013), a taxa de prevalência foi de 10,8%, sendo superior aos relatados no seu estudo, como China, Estados Unidos da América (EUA) e Europa. No ambiente hospitalar, o aumento das bactérias multirresistentes a antibióticos tem se tornado algo cada vez mais preocupante visto que essas oferecem um enorme risco à saúde dos pacientes. Uma bactéria adquire resistência quando exposta à uma droga antimicrobiana e naturalmente o microrganismo se adapta geneticamente ao seu ambiente. Diversos fatores podem estar associados à resistência, como utilização de antibióticos de amplo espectro, internação prolongada e má higienização das mãos (GARCIA, SILVA; OLIVEIRA, 2019).

Dentre os principais microrganismos multirresistentes envolvidos nas IRAS, as bactérias Gram-negativas têm três principais gêneros envolvidos: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Escherichia*. Quando se trata das Gram-positivas destacam-se os gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* (ANVISA, 2018). Dessa forma, o grupo *Enterococcus* representa o segundo gênero que causa infecções hospitalares, principalmente em pacientes em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) no Brasil, podendo chegar a segunda maior causa de tais infecções em todo o mundo (RAZA et al., 2018).

Os enterococos são bactérias Gram-positivas presentes em diversos ambientes como solo, água do mar, alimentos, microbiota intestinal de vertebrados e invertebrados, e podem ser agentes causadores de doenças. São ovóides, não formadoras de esporos e podem existir individualmente,

em pares, cadeias ou grupos. É anaeróbia facultativa, tendo como produto final da fermentação o ácido láctico (ŠVEC et al. 2014; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

A importância clínica dos enterococos está relacionada à sua resistência a diversos antimicrobianos uma vez que limita a escolha terapêutica. Dentre as espécies clinicamente relevantes, *E. faecium* e *E. faecalis* são as duas espécies Gram-positivas comumente isoladas em ambientes hospitalares desde a década de 80. A resistência intrínseca dos enterococos tem aumentado a sobrevivência dessas espécies em comparação com os membros existentes do mesmo gênero (GAO et al. 2018; LIMA, AMEIDA; OLIVEIRA, 2020).

Para aumentar o arsenal terapêutico, extratos de plantas têm sido cada vez mais estudados a fim de mitigar tais infecções. O uso de moléculas bioativas tem mostrado resultados positivos quanto a diminuição da CMI através da própria aplicação do extrato ou do composto fenólico e do sinergismo com os antibióticos já utilizados (JUTEEAU et al., 2002; MACHADO et al., 2003).

Dentre as plantas utilizadas na medicina natural e na pesquisa de novos compostos bioativos, a família Anacardiaceae tem apresentado espécies com potenciais ativos de interesse clínico, como o gênero *Anacardium*, que envolve espécies popularmente conhecidas como Cajú e Cajuí (SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Uma das espécies representantes, a *A. microcarpum*, tem mostrado propriedades biológicas ativas como antioxidante, citotóxica, neuroprotetor e efeitos modulatórios de antibióticos (BARBOSA-FILHO et al., 2014 e 2015; MARTINS et al., 2018).

Tendo em vista que a resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública mundial que tem colocado os avanços da medicina moderna e procedimentos como transplantes de órgãos, quimioterapia e cirurgias em perigo por causa da falta de tratamento eficaz para as infecções resistentes aos antibióticos, a pesquisa e desenvolvimento de compostos bioativos que tenham um potencial antimicrobiano sozinhos ou em conjunto com antimicrobianos já utilizados na clínica tem aumentado cada vez mais a fim de mitigar tais infecções.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Metabolismo secundário

Dentre as diversas características dos seres vivos, apresentar atividade metabólica é uma delas. Ela é mais do que um conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células e, no caso das células vegetais, esse metabolismo pode ser usado também para proteção. Podemos dividir o metabolismo das plantas em primário e secundário, onde o primário é destinado

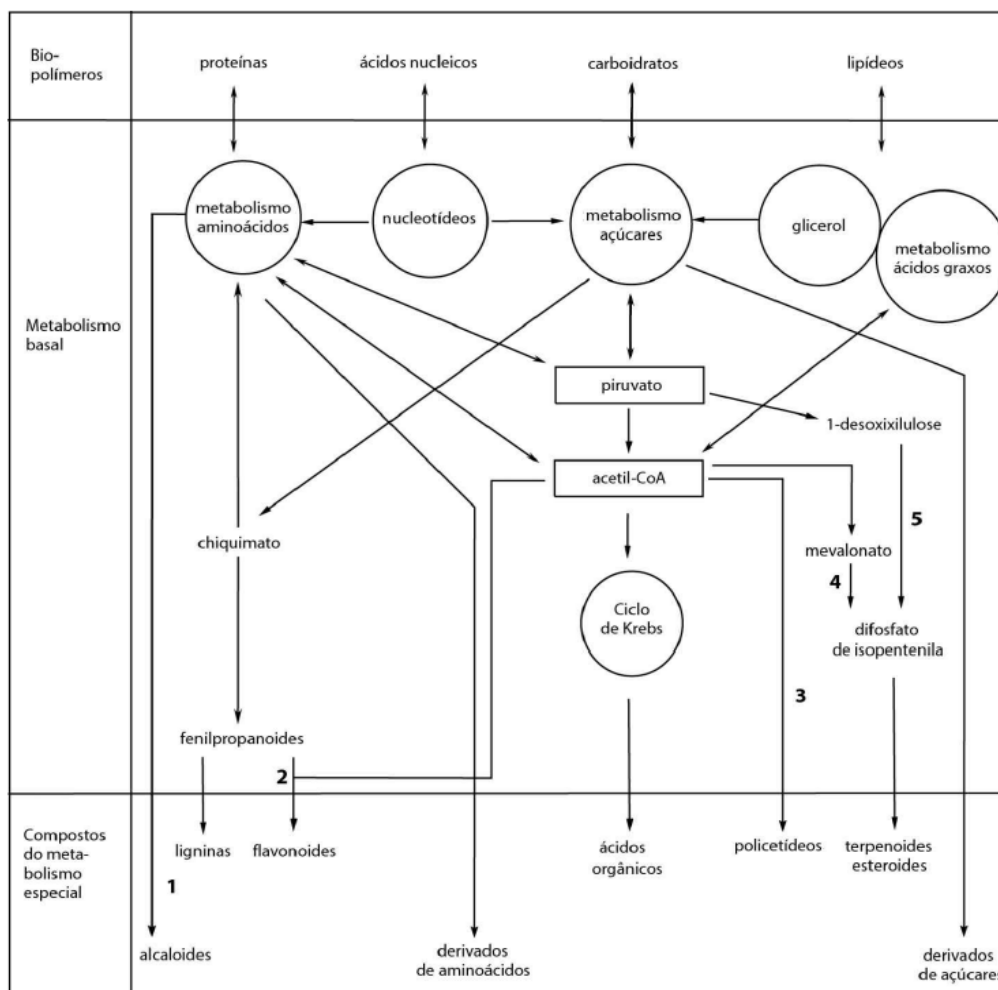
majoritariamente para os processos fisiológicos essenciais como por exemplo respiração e absorção de nutrientes, e o secundário para funções específicas como ser repelente ou atrativo, através da produção de pigmentos ou compostos fenólicos (GARCÍA; CARRIL, 2009).

O metabolismo secundário apresenta altíssima complexidade e não apresentam funções bem definidas para os organismos produtores, uma vez que não cumprem um determinado papel no metabolismo, no crescimento e na divisão celular. Esses metabólitos de baixo peso molecular podem apresentar potencial relevância terapêutica. Adicionalmente, esses compostos podem ser contrapostos aos produtos do metabolismo primário: aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, vitaminas e ácidos graxos.

Enquanto as rotas biossintéticas dos metabólitos primários se assemelham as rotas dos diversos organismos, as rotas biossintéticas dos metabólitos secundários são restritos, na maioria das vezes, a espécies específicas. De maneira geral, apresentam rotas biossintéticas de

aminoácidos, do ácido chiquimato, dos policetídeos, do ácido mevalônico e do metileritritol fosfato, conforme demonstra a figura 1 (KREIS et al. 2017).

Figura 1. Relações biossintéticas entre o metabolismo basal e secundário/especial. As rotas biossintéticas para a síntese de metabólitos especiais ocorrem pelas seguintes vias: 1 via dos aminoácidos; 2 - via do chiquimato; 3 - via dos policetídeos; 4 - via do mevalônico; e 5 - via do metileritritol fosfato (MEP).



FONTE: KREIS et al. 2017.

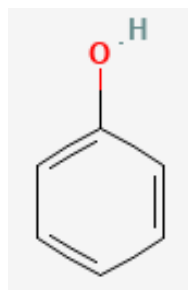
Alguns metabólitos possuem funções específicas, como atrair e repelir predadores, pigmentos que atraem insetos polinizadores, repelentes e inseticidas naturais. Uma classificação simples de metabólitos secundários, incluindo os principais grupos, são: terpenos (óleos vegetais essenciais, glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), compostos fenólicos (por exemplo, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e lignina) e compostos de nitrogênio como alcalóides e glucosinolatos. (AGOSTINI-COSTA et al, 2012).

2.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, nas plantas, são necessários para o crescimento, reprodução, combate a patógenos, e alguns são característicos da pigmentação vegetal e estão amplamente distribuídos na natureza. São definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila, incluindo seus grupos funcionais (Figura 2). (LEE et al, 2005).

As suas estruturas químicas podem variar desde fenóis simples (C6) (Figura 2) como, por exemplo, os derivados de ácido hidroxibenzóico, até mesmo como polímeros de cadeia longa, como exemplo, as ligninas (C6-C3)_n e taninos condensados (C6-C3-C6)_n. Compostos como os estilbenos (C6-C2-C6) e os flavonóides (C6-C3-C6) são de peso molecular intermédio e apresentam muitas atividades farmacológicas e biológicas (AGOSTINI-COSTA et al, 2012).

Figura 2. Estrutura 2D do fenol simples.



FONTE: PUBCHEM (2004).

Os compostos fenólicos possuem uma variada diversidade química, e podem se apresentar, por exemplo, como taninos, ligninas e flavonóides (BORGES; AMORIM, 2020). Esses compostos têm sido descritos na literatura por suas atividades terapêuticas como antimicrobiano, antiinflamatório, antifúngico e cardioprotetor (NEVES et al., 2021).

2.3. Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae, no Brasil, é representada por 15 gêneros e 64 espécies caracterizadas por árvores, arbustos, inermes ou raramente armados, aromáticos, com presença de flores e frutos. Representam uma grande importância econômica por fornecerem frutos comestíveis, madeiras úteis ou espécies ornamentais. A exemplo, a castanha de caju, obtida do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), é bastante conhecida no Brasil, sendo produtos de exportação tanto a amêndoa

quanto o líquido extraído da casca da castanha do caju (CNSL ou LCC) assim como o pedicelo frutífero (hipocarpo), que é comercializado *in natura* (CORREIA, DAVID, DAVID, 2006; COSTA et al., 2021; FLORA DO BRASIL, 2023).

Além da importância econômica devido aos frutos, sementes e madeiras úteis, a família Anacardiaceae também se destaca por possuir espécies com diversas atividades biológicas. Por exemplo, extrato da casca de *Mangifera Indica* L., é descrito na literatura por possuir atividade antiviral, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória, imunomoduladora (MAKARE, BODHANKAR; RANGARI, 2001). Outros trabalhos descrevem a atividade biológica de *A. occidentale*, como antifúngicas, antibacteriana, antiviral, antiinflamatória (MOTA; THOMAS; BARBOSA FILHO, 1985; AKINPELU, 2001; GONÇALVES et al. 2005; SCHMOURLO et al. 2005).

2.4. *Anacardium microcarpum*

Conhecida como Cajuí, *Anacardium microcarpum* é uma árvore encontrada no Nordeste, principalmente em áreas de cerrado. Designada como uma variedade de *A. occidentale*, diferindo apenas em tamanho do fruto, possui potencial de uso econômico através do consumo da amêndoa e do pedúnculo *in natura* ou mesmo sob a forma de sucos, doces e geleias (RUFINO, 2007). Segundo Vieira e colaboradores (2014), *A. microcarpum* difere taxonomicamente de *A. occidentale*, ainda que haja distinção quantitativa e não qualitativa, assim, esse quadro taxonômico ainda permanece não resolvido.

Ainda que haja dificuldades de diferenciar tais espécies, poucos trabalhos na literatura avaliando propriedades bioativas dos extratos de *A. microcarpum* têm sido descritos, como antioxidante, bactericida, fungicida e neuroprotetor (BARBOSA-FILHO, 2014; BARBOSA-FILHO, 2015; BAPTISTA, 2018; SHARMA, 2022), sendo uma espécie em potencial para o uso na indústria de alimentos e farmacêutica.

Portanto, mesmo que escassas quando comparados com os relatos de outras espécies da família *Anacardiaceae*, pesquisas sobre as ações de extratos de *A. microcarpum* são importantes para o tratamento de infecções, principalmente por reduzir custos e aumentar o arsenal terapêutico. Além disso, o uso de fitoterápicos também pode despertar o interesse da indústria, agregando novo valor ao mercado farmacêutico e de alimentos.

2.5. Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS)

O termo Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) surgiu por volta da década de 90 e engloba infecções adquiridas e relacionadas à assistência e prestação de serviços em qualquer ambiente de saúde, e não está mais restrito ao ambiente hospitalar, como era designada antes de “infecções hospitalares” (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014). Elas têm causado aumento da morbimortalidade, problemas econômicos e sociais para a população e os sistemas de saúde de todos os países (ARAÚJO; PEREIRA, 2017).

No Brasil, desde a década de 90 a preocupação com as infecções hospitalares vem crescendo, a partir de 1997 quando foi criado o Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH) através da lei nº 9.431, que tratava de um conjunto de ações com o objetivo de reduzir a incidência e a gravidade das infecções hospitalares. Desde então, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), bem como secretarias municipais e estaduais de vários estados têm publicado relatórios, boletins e outros documentos visando o monitoramento e aprimoramento do sistema de vigilância (ARAÚJO; PEREIRA, 2017).

Ainda assim, não há um recurso financeiro específico para o Programa Nacional de Prevenção e Controle de IRAS, e a presença do sistema dual de saúde (público e privado) implica num grande número de interlocutores para o diálogo relativo às estratégias de prevenção (PADOVEZE, 2014). Ainda que poucas, iniciativas relacionadas ao aprimoramento do sistema de vigilância, estímulos em pesquisas e controle dessas infecções têm sido desenvolvidas, todavia, devem traduzir ações concretas pois somente o arcabouço teórico não é eficaz para o controle dessas infecções (ARAÚJO; PEREIRA, 2017).

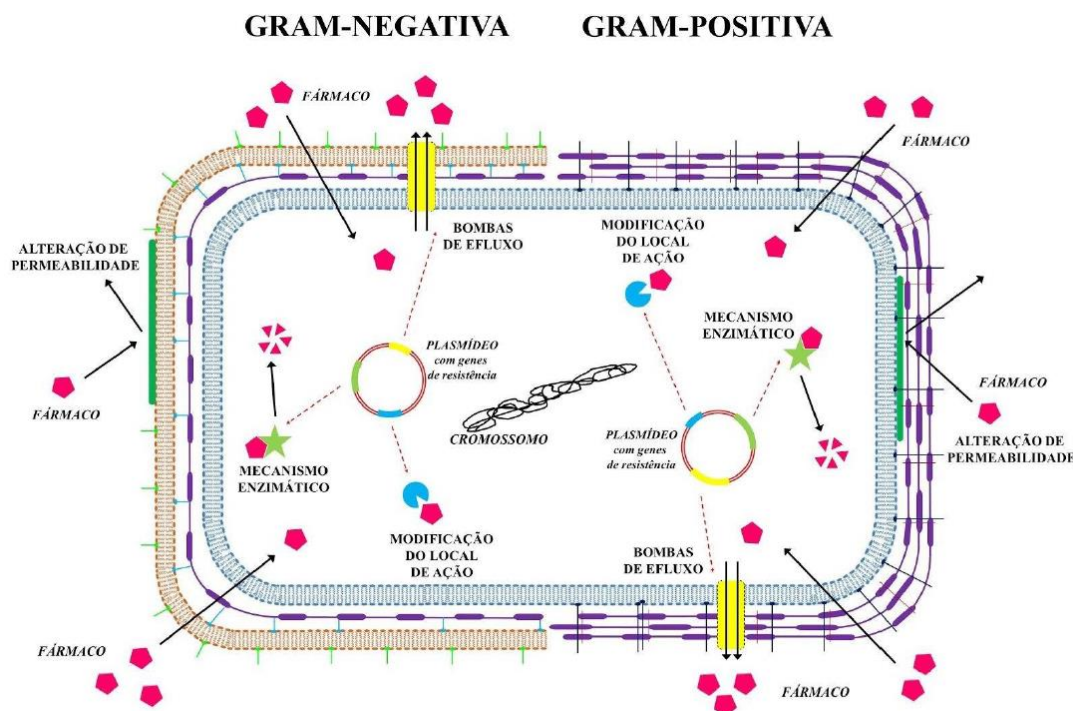
2.6. Resistência bacteriana

Um problema no Brasil e no mundo, a resistência bacteriana tem chamado a atenção dos órgãos governamentais nacionais e internacionais, como a ANVISA e a Organização Mundial de Saúde (OMS), além dos demais órgãos relacionados como hospitais e associações controladoras de infecção (BECKER, 2006). Além do problema de saúde pública devido aos agravos que elas trazem, há também o problema socioeconômico para as instituições em decorrência dos custos hospitalares (RHABAE et al., 2000).

As bactérias podem desenvolver resistência por diversos mecanismos, seja através da inativação do fármaco por enzimas, como as β -lactamases que clivam anéis β -lactâmicos de

penicilinas e cefalosporinas, desencadeando a perda da função antimicrobiana, ou até mesmo pela modificação do sítio alvo e bombas de efluxo (Figura 3). (WRIGHT, 2005).

Figura 3. Representação dos mecanismos de resistência em bactérias.



FONTE: COUTO et al. (2020).

Organizações mundiais estão sempre informando sobre incidência e prevalência de infecções no ambiente hospitalar, como o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Institutes of Health (NIH), World Health Organization (WHO), Rede Latino-americana de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos (ReLAVRA), e no Brasil, o principal é a ANVISA.

Assim, de acordo com o boletim nº 21 sobre Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde (2018), dentre os microrganismos gram-positivos, os perfis fenotípicos de resistência mais identificados nas Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCS) nas UTIs adulto, neonatal e pediátrica, associados a Cateter Venoso Central (CVC), *E. faecium*, *Enterococcus* spp. e *E. faecalis*, resistentes a vancomicina, aparecem em 3º, 4º e 5º lugar, respectivamente, num total de 8 perfis analisados.

Já nos perfis fenotípicos de resistência entre os cocos Gram-positivos notificados como agentes etiológicos de Infecção do Trato Urinário (ITU) associado a Cateter Vesical de Demora CVD em pacientes de UTI adulto e pediátrica, *Enterococcus* spp., *E. faecium* e *E. faecalis* representam o 1º, 2º e 3º lugar, respectivamente (Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, nº 21. 2020).

Os *Enterococcus* possuem uma característica que propicia o aumento da sua resistência: a capacidade de formar biofilme. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), o biofilme pode ser definido como “Agrupados de microrganismos nos quais as células estão incorporadas em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que são aderentes entre si/ou a uma superfície” (VERT et al, 2012).

Infecções associadas à biofilme causam substancial morbidade e sua prevalência continuará aumentando à medida que a população envelhece, as internações aumentam e as comorbidades tornam-se mais prevalentes. Esses biofilmes, quando observados nessas infecções, além de serem mais difíceis de tratar, também funcionam como um nicho para a disseminação de bactérias e como reservatório para genes de resistência. Assim, múltiplas propriedades dos biofilmes, que incluem tolerância aos antibióticos e sinergismo de comunidade de espécies bacterianas mistas tornam os biofilmes mais resistentes às terapias antibacterianas padrão (CH’NG et al., 2019).

2.7. *Enterococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp. são um grupo de bactérias Gram-positivas caracterizado bioquimicamente por ter a capacidade de crescer em concentrações de 6,5% de NaCl e em pH alto e de hidrolisar bile-esculina e L-pirrolidonil-B-naftilamida (PYR). Era classificado como *Streptococcus* do grupo D pelo sistema de triagem sorológica de Lancefield mas através das análises genéticas diferenciais, o grupo foi retirado do gênero *Streptococcus* e passou a ser um gênero distinto (HOLLENBECK; RICE, 2012).

O grupo pertence ao filo Firmicutes da família Enterococcaceae. Eles podem ser encontrados nos humanos, animais e insetos, mas também podem estar presentes no esgoto, solo e até em algumas frutas e plantas como azeitonas e plantas selvagens. Os enterococcus podem ser utilizados na fermentação de carnes e queijos, como probiótico e algumas espécies podem participar na manutenção da homeostase intestinal, modulando positivamente o sistema imunológico. Todavia, também podem atuar como patógenos, contaminar alimentos e,

dependendo da sua virulência, representam uma ameaça no ambiente hospitalar (KRAWCZYK et al. 2021).

No corpo humano, devido a sua adaptabilidade a áreas ricas em nutrientes e pobres em oxigênio, podem ser encontrados no trato gastrointestinal (TGI), vagina e cavidade oral, assim como nas fezes. Recentemente, foram designados como a principal causa de infecções nosocomiais, principalmente por sua alta resistência aos antibióticos e as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais prevalentes em infecções de feridas cirúrgicas, do trato urinário e associadas IPCS (TORTORA, 2017).

Essas espécies, quando fora do seu habitat comensal típico, podem causar ITU, sepse, bacteremia e endocardite (TENDOLKAR et al. 2003; KAO et al. 2019; KRAWCZYK et al. 2020). Estão frequentemente associadas a complicações muito graves em infecções hospitalares, chegando a representar, a *E. faecalis* (80-90%) e *E. faecium* (5-15%), dentro das espécies de *Enterococcus* identificadas (GUZMAN, et al. 2016 *apud* KRAWCZYK, et al. 2021).

2.8. Importância clínica de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*

De modo geral, os enterococos possuem multirresistência intrínseca a agentes antimicrobianos como beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, resistência adquirida por meio de elementos móveis contra glicopeptídeos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos e estreptomicina e através da transferência horizontal de genes de resistência (RAZA, 2018). O termo resistência intrínseca é geralmente utilizado para indicar resistência presente em todas ou na maioria das cepas dessa espécie em seu DNA genômico. A resistência adquirida resulta de uma mutação no DNA existente ou da aquisição de um novo DNA (MURRAY, 1990).

Desde a década de 80, *E. faecalis* e *E. faecium* estão entre os mais comuns patógenos nosocomiais Gram-positivos isolados em todo o mundo (GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018). Esses microrganismos garantem seu sucesso nas IRAS devido, em parte, a sua resistência intrínseca a muitos antimicrobianos e a sua capacidade de adquirir novos traços de resistência. Assim, juntos, eles são responsáveis por cerca de 75% de todas as infecções enterocócicas tipadas (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Características como a capacidade de escapar do sistema imunológico; a capacidade de se ligar às células hospedeiras, à matriz extracelular (ME) e a materiais inertes, como uma variedade de dispositivos médicos; e a capacidade de formar biofilmes que os tornam mais resistentes à morte

por antibióticos e ao ataque fagocítico têm sido associadas ao seu elevado potencial patogênico (MOHAMED, 2007).

E. faecalis e *E. faecium* possuem baixa suscetibilidade a vários agentes ativos contra estreptococos e estafilococos, como demonstrado na tabela 1. A exemplo, entre os β -lactâmicos, eles são intrinsecamente resistentes a praticamente todas as cefalosporinas, penicilinas antiestafilocócicas e aztreonam, sendo tal resistência atribuída a expressão de uma proteína de ligação à penicilina (PBP) de baixa afinidade designada PBP4 em *E. faecalis* e PBP5 em *E. faecium* (DUEZ, 2001; INFANTE, 2016).

Tabela 1. Resistência antimicrobiana em enterococcus spp.

Classe antimicrobiana	Gene(s) de resistência envolvido(s)	Mecanismo de resistência
Aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina)	<i>aac-2</i> ' - <i>aph-2</i> " - <i>le</i> , <i>aph-3</i> ' - <i>IIIa</i>	Modificação do aminoglicosídeo
β -lactâmicos	<i>pbp4</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>pbp5</i> (<i>E. faecium</i>)	Afinidade reduzida para o antibiótico
Cloranfenicol	<i>gato</i>	Acetilação de cloranfenicol
Clindamicina	<i>lsa</i> (A)	Efluxo putativo
Daptomicina	<i>liaFSR</i>	Alteração na carga e fluidez da membrana
Eritromicina	<i>ermB</i>	Metilação ribossômica
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	Modificações na região determinante da resistência às quinolonas
Glicopeptídeos	<i>Sr. A</i> , <i>Sr. B</i> , <i>Sr. D</i> , <i>Sr. M</i>	Precusores de peptidoglicano modificados terminando em d -lactato
	<i>vanC</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i> , <i>vanL</i> , <i>vanN</i>	Precusores de peptidoglicano modificados terminando em d -serina
Oxazolidinonas	Genes de rRNA	Mutações que reduzem a afinidade
	<i>confr</i>	Metilação de 23S rRNA
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Mutações pontuais que reduzem a afinidade
Estreptomicina	<i>on-6</i>	Modificação da estreptomicina
Tetraciclina	<i>cabeça</i> (L)	Efluxo
	<i>tet</i> (M)	proteção ribossômica
Tigeciclina	<i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	Expressão aumentada

Fonte: GÁRCIA-SOLACHE; RICE (2019). Adaptado pelo autor: MANDÚ, J. A. (2023).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme das folhas de *Anacardium microcarpum* contra isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* vancomicina resistente.

3.2. Objetivos específicos

- Obter e processar as folhas de *A. microcarpum*;
- Produzir o extrato hidroalcólico;
- Quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato;
- Identificar a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do extrato contra os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* vancomicina resistente (VR);
- Avaliação da atividade antibiofilme do extrato contra os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* VR.

4. METODOLOGIA

4.1. Material vegetal

Folhas de *Anacardium microcarpum* Ducke foram coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque, Pernambuco e depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima no Instituto Agrônômico de Pernambuco (n° de tombo 93.090). O material foi seco em circulação de ar forçado (40-45 °C) e processado em moinho de bancada.

4.2. Extração do material

O extrato bruto hidroalcoólico foi preparado na proporção de 1:10 (p/v) em banho de ultrassom durante 30 minutos e após esse período o material foi filtrado. A parte etanólica foi evaporada em rotaevaporador e a parte aquosa foi liofilizada. Esse extrato foi armazenado em temperatura ambiente, dentro de um dessecador, livre de umidade, para posteriores atividades.

4.3. Quantificação de compostos fenólicos

O conteúdo fenólico total foi avaliado através do método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (HUAN-BIN, 2008). Para cada 0,01 mL da amostra, do branco (etanol) ou das concentrações de ácido gálico foram adicionados 0,1 mL da solução de Folin (1:10 v / v). Após 3 minutos no escuro, adicionou-se 0,08 mL de carbonato de sódio (7,5%), o qual foi incubado durante 120 minutos no escuro à temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas a 765 nm contra um branco. Uma curva de calibração foi preparada plotando a absorbância como uma função da concentração de ácido gálico. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

4.4. Atividade antimicrobiana

4.4.1. Microrganismos

Foi utilizada uma cepa padrão de *E. faecalis* da Coleção do Departamento de antibióticos (UFPEDA) e 8 isolados clínicos, sendo quatro *E. faecalis* e quatro *E. faecium* coletados em um

hospital da cidade do Recife, PE, Brasil (Comitê de ética nº 2581568). Os isolados foram crescidos em ágar infusão de cérebro-coração (BHI) a 37 °C por 24 horas para as análises posteriores.

4.4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A avaliação antimicrobiana foi realizada em modelo experimental de microdiluição em série (EUCAST, 2017). O extrato hidroalcoólico foi diluído com água nas concentrações 2000; 1000; 500; 125; 62,5; 31,25; 15,625 µg/mL. A suspensão bacteriana foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, ajustada com solução salina a 0,9% (DO600 nm). Foram adicionados 20 µL das concentrações do extrato na placa de microtitulação junto a 20 µL do inóculo bacteriano, e 160 µL do meio caldo infusão cérebro-coração. Para o controle de crescimento bacteriano o extrato foi substituído por água destilada e para o controle de esterilidade do experimento o inóculo e o extrato foram substituídos por água destilada. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18h. Através de um espectrofotômetro, a determinação da absorbância das microplacas de 96 poços foi realizada a 625 nm, 0h e 18h. Após este período de incubação, 5 µL de cada poço foram inoculados em placas de BHI e incubados novamente durante 18 h a 37 °C, para verificar o crescimento microbiano. A vancomicina foi usada como controle positivo.

4.4.3. Atividade Antibiofilme

Para a avaliação da anti-formação de biofilme do extrato, 20 µL das concentrações sub-inibitórias foram adicionados na placa de microtitulação junto a 20 µL do inóculo bacteriano, ajustado como anteriormente, e 160 µL do meio de crescimento caldo infusão cérebro-coração (TRENTIN et al. 2011). Para o controle de crescimento bacteriano o extrato foi substituído por água destilada e para o controle de esterilidade do experimento o inóculo e o extrato foram substituídos por água destilada.

A placa foi incubada por 24 h a 37 °C, após a incubação as células planctônicas foram removidas através da lavagem da placa três vezes com solução salina a 0,9%. Para fixação do biofilme a placa foi incubada a 55 °C por 1 hora e posteriormente o biofilme corado com cristal violeta a 0,4 % por 15 min, posteriormente lavado três vezes com salina e eluído em etanol (100%)

para poder ler a densidade ótica a 570 nm. O percentual de atividade antibiofilme foi avaliado comparando com o controle de crescimento do biofilme bacteriano.

4.4.4. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Através do *GraphPad Prism* (versão 5.0) foram produzidos os gráficos em Excel e os resultados analisados por análises de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de fenóis totais no extrato das folhas de *A. microcarpum* (AM-HEtOH) foi de $405,47 \pm 20,64$ mg EAG/g extrato. Embora seja uma metodologia simples, a quantificação de fenóis totais é de grande importância uma vez que sua atividade está relacionada à atividade antioxidante, por meio da oxirredução e diminuindo os radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; NEVES et al., 2021).

Outros estudos avaliando o perfil fenólico dos extratos etanólicos das espécies *Anacardium occidentale* L., *Schinopsis brasiliensis* Engl, *Spondias mombin* L. e *Mangifera indica* L., da família Anacardiaceae demonstraram que a quantidade de fenóis totais variou entre, 227 à 493 mg EAG/g. Outros autores já relataram o potencial antioxidante de extratos de plantas do gênero *Anacardium*, e esse potencial estava relacionado com o sucesso de outras atividades biológicas, como neuroproteção, citotóxico, antiulcerogênico, anti-inflamatório, hipoglicemiante e antimicrobiano (LUIZ-FERREIRA et al., 2010; BARBOSA-FILHO et al., 2014; AJILEYE et al., 2015; VILAR et al., 2016; ENCARNAÇÃO et al., 2016; MARTINS et al., 2018; SAJJEVAN et al., 2018).

A atividade inibitória do extrato bruto sobre as cepas clínicas de *E. faecalis* e *E. faecium*, foram comparadas com o controle positivo Vancomicina. Os microrganismos utilizados são resistentes a vancomicina, exceto pela cepa padrão UFPEDA 09 que é sensível. Os resultados da CMI podem ser visualizados na tabela 2. Na tabela, também pode ser observado o percentual de inibição dos extratos contra os microrganismos testados.

Tabela 2. Atividade inibitória do extrato hidroalcólico de folhas de *A. microcarpum* e da Vancomicina contra isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Isolados Clínicos		AM-HEtOH	Vancomicina
		Percentual de inibição	CMI (µg/mL)
<i>E. faecalis</i>	UFPEDA 09	28.3 ± 3.2	7.8
	00640	28.3 ± 3.3	1000
	01014	25.9 ± 2.9	500
	06430	67.7 ± 1.8	2000
	17878	54.3 ± 4.9	1000
<i>E. faecium</i>	15088	42.0 ± 0.6	1000
	16184	12.4 ± 3.2	1000
	14872	47.1 ± 4.7	1000
	12855	75.9 ± 0.7	500

O extrato está expresso em porcentagem de inibição dos microrganismos na concentração de 2000 µg/mL. CMI – Concentração mínima do antibiótico que inibe 90% do microrganismo.

O extrato não possui CMI $\leq$ 2000 µg/mL, e por isso está representado na tabela o percentual de inibição na maior concentração testada (2000 µg/mL). O extrato inibiu acima de 50%, dois isolados de *E. faecalis* (06430, 17878) e um isolado de *E. faecium* (12855). Como pode ser visto, para a atividade antimicrobiana, o extrato não foi tão eficaz contra os isolados clínicos de *Enterococcus*, por esse método.

Esses resultados corroboram com Santos e colaboradores (2018), que utilizaram extratos irradiados (radiação gama) e não irradiados de folhas de *A. occidentale* contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. Dos 17 isolados testados, 14 obtiveram a CMI maior que 2000 µg/mL. Valores acima de 2000 µg/mL foram classificados como atividade bactericida muito baixa. Em termos de CMB, valores entre 1000 µg/mL e 2000 µg/mL foram pontuados como moderados e acima de 2000 µg/mL como baixa atividade bacteriostática.

Segundo Tan e colaboradores (2014), extratos de folhas frescas de *A. occidentale* foram capazes de inibir, através do método de difusão em disco, as bactérias gram-positivas *Brevibacillus brevis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus cohnii* e Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* sob uma concentração que variou de 0,13 a 0,5 mg/disco, que corresponde a 130-500 µg/disco. As folhas tratadas por micro-ondas apresentaram uma maior atividade, que variaram de 0,06 – 0,13 mg/disco, sugerindo que a irradiação pode ter levado à

formação de compostos fenólicos bioativos.

Amorim e colaboradores (2021) avaliaram os efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios *in vitro* de extratos da casca e da folha de *A. occidentale* e demonstraram que todas as espécies bacterianas foram sensíveis ao extrato das folhas e cascas, sendo *Streptococcus mutans* e *E. coli* as espécies mais suscetíveis, com CIM de 312 µg/mL.

Outros autores demonstram que as frações acetato de etila e metanólica do extrato etanólico da entrecasca de *A. microcarpum*, diminuíram significativamente a CIM contra *S. aureus* quando combinados com amicacina, imipenem e gentamicina. Sendo assim, podemos inferir que o extrato hidroalcólico deste trabalho, mesmo com a CIM > 2000 µg/mL, pode ser eficaz quando combinado com outros agentes antimicrobianos (BARBOSA-FILHO et al. 2015).

O sinergismo com espécies da família Anacardiaceae têm demonstrado resultados promissores quanto a atividade antibacteriana, como demonstrado no trabalho de Freitas e colaboradores (2022), que avaliou o extrato aquoso das folhas de *Spondias mombin* e obteve uma potencialização do efeito da norfloxacin (contra *S. aureus*), imipenem (contra *E. coli*) e norfloxacin (contra *P. aeruginosa*), sugerindo que os constituintes do extrato podem atuar favorecendo a permeabilidade das células microbianas às drogas convencionais.

Alterações qualitativas e/ou quantitativas de metabólitos secundários de uma mesma espécie podem influenciar na sua atividade biológica uma vez que a síntese de constituintes sofre interferência da sazonalidade, precipitação, ritmo circadiano, temperatura, altitude, idade e desenvolvimento da espécie, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição do ar, forma e período de armazenamento, ação dos patógenos e método de extração (REIS et al., 2004; GOBBO-NETO E LOPES, 2007; ARAÚJO et al., 2009; SANTURIO et al., 2007).

Para atividade antibiofilme do extrato, também foi utilizado a concentração de 2000 µg/mL, pois essa concentração foi sub-inibitória para todas os isolados testados. Estes resultados também foram comparados com a Vancomicina, no entanto para esta amostra foi utilizada as concentrações sub-inibitórias respectivas de capa isolado (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de crescimento do biofilme de isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* sob efeito do extrato hidroalcoólico de folhas de *A. microcarpum* e da Vancomicina.

Isolados Clínicos		Extrato hidroalcoólico	Vancomicina	
		Biofilme (%)	Concentração (µg/mL)	Biofilme (%)
<i>E. faecalis</i>	UFPEDA 09	17.6 ± 2.3	3.9	41.6 ± 0.9
	00640	43.3 ± 3.5	500	112.8 ± 3.2
	01014	0.0 ± 3.3	125	149.5 ± 8.5
	06430	0.0 ± 1.2	1000	63.1 ± 4.7
	17878	0.0 ± 0.7	500	28.4 ± 3.6
<i>E. faecium</i>	15088	0.0 ± 0.3	500	85.5 ± 3.6
	16184	0.0 ± 0.1	500	73.8 ± 9.4
	14872	4.6 ± 10.3	500	32.2 ± 0.8
	1285	0.0 ± 0.2	250	68.1 ± 4.6

Os extratos estão expressos em porcentagem de crescimento do biofilme na concentração de 2000 µg/mL.

O extrato hidroalcoólico inibiu 100% do biofilme de três isolados de *E. faecalis* (01014, 06430 e 17870) e três isolados *E. faecium* (15088, 16184 e 12805). É importante observar que o biofilme dos isolados, 00640 e 01014 foram estimulados quando utilizados Vancomicina.

Assim, como mencionado anteriormente, tal atividade demonstra que os compostos podem não ser capazes de inibir o crescimento microbiano, mas podem ser capazes de inibir algum componente que seja importante para formar a matriz do biofilme, como demonstra SALEHI e colaboradores (2020), onde outras frações como metanólico e etanólico, assim como partes diferentes como partes aéreas e cascas de *A. occidentale* exibiram inibições de biofilme *S. mutans* e *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *S. aureus* e até *Candida albicans*.

Outras espécies da família Anarcadiaceae têm sido descritas como potencial atividade antibiobiofilme, como demonstrado por Sarkar e colaboradores (2014), ao avaliarem o extrato etanólico do caule de Marula (*Sclerocarya birrea*) e relataram uma inibição de aproximadamente 87% do biofilme maduro de *P. aeruginosa*, quando utilizado 200 µg/mL do extrato, assim como redução significativa da motilidade, o que pode afetar também a formação do biofilme.

Barbieri e colaboradores (2014) avaliaram o extrato hidroalcoólico e metanólico de *Schinus terebinthifolius* e relataram uma inibição da aderência do biofilme de *Streptococcus mutans* de aproximadamente 66% e 69% para ambos os extratos, respectivamente. O referido trabalho discute que o efeito antiaderente pode estar associado à presença de apigenina, composto

que tem sido descrito como modulador da expressão gênica de *S. mutans* em células plantônicas e sésseis, reduzindo a aderência.

Em um único caso encontrado na literatura, o extrato hidroetanólico da casca do caule de *A. occidentale* foi avaliado quanto sua atividade frente ao biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus*. Todavia, a menor concentração capaz de inibir a maioria dos biofilmes foi e 7.6 mg/ml (Dias-Souza et al. 2013).

Existem poucos trabalhos na literatura abordando o potencial de extratos da família Anacardiaceae contra biofilmes bacterianos, tampouco com as espécies *A. occidentale* e *A. microcarpum*, o que impulsiona maior interesse por pesquisas envolvendo esta abordagem. Portanto, até onde sabemos, tal potencial de *A. microcarpum* frente a biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium* estão descritos neste trabalho pela primeira vez.

6. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcólico de *A. microcarpum* não teve significativa eficácia contra a maioria dos isolados clínicos e só inibiu acima de 50%, dois isolados de *E. faecalis* e um isolado de *E. faecium*. No entanto, o extrato bruto foi bastante eficaz contra o biofilme dos isolados vancomicina resistentes, chegando a inibir 100% do biofilme de alguns isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*.

O uso de compostos naturais é uma abordagem econômica, simples de usar e ambientalmente amigável para os problemas de saúde. O método de extração empregado, a sazonalidade e o solvente podem influenciar na natureza química dos compostos, seu peso molecular e contaminação. Assim, é válido ressaltar que todos os tipos de variações extrativas, bem como outras partes da planta devem ser examinados em estudos antimicrobianos uma vez que fatores como os mencionados acima podem implicar na atividade antibacteriana.

7. REFERÊNCIAS

- AJILEYE, O.O. et al. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University – Science**. vol 27, p. 244–252. 2015.
- AMORIM, L. S. et al. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of *Anacardium occidentale* L. extracts and their toxicity on PBMCs and zebrafish embryos. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 45:6, p. 2653-2663. 2021.
- ARAÚJO, C. R. F. et al. Concentração Mínima Bactericida do extrato do cajueiro sobre bactérias do biofilme dental. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, vol. 9(2), p. 187-191. 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20**: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM 2018. Acesso: 12 de janeiro de 2023.
- AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia*. v. 72, p.286–287, 2001.
- AGOSTINI-COSTA, T.S. et al. Secondary Metabolites. Chromatography and Its Applications. **Sasikumar Dhanarasu**. 2012.
- BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. SECONDARY PLANT METABOLITES. **Revista Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- BARBIERI, D. S. V. et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**. v.59(9), p.887-796. 2014.
- BOONKAEW B. et al. Expression and characterization of a recombinant stevioside hydrolyzing β -glycosidase from *Enterococcus casseliflavus*. **Protein Expression and Purification**. 2019.
- BARBOSA-FILHO, V.M. et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products** vol. 55: p. 280 – 288. 2014.
- BARBOSA-FILHO, V.M. et al. Phytocompounds and modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajuí) on antibiotic drugs used in clinical infections. **Drug Design, Development and Therapy** 2015.
- BAPTISTA, A. et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts and Fractions of Cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*), and Pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A Systematic Review. **Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.

2018.

COUTO, M. T. T. et al. Mecanismo de ação dos antibióticos. In: SILVA, F. H. **Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes**. v. 1. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020.

CH'NG, J.H. et al. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nat Rev Microbiol**. vol.17(2), p. 82-94, 2019.

CORREIA, S. DE J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**. Vol. 29 nº 6, p. 1287–1300, 2006.

COSTA, D. N. et al. Prospective scientific and technological mapping of the family Anacardiaceae R. Br. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e408101220746, 2021.

DUEZ, C. et al. The penicillin resistance of *Enterococcus faecalis* JH2-2R results from an overproduction of the low-affinity penicillin-binding protein PBP4 and does not involve a *psr*-like gene. **Microbiology**. vol. 147: p. 2561–2569. 2001.

EUCAST. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Versão 2.01. 2017.

DIAS-SOUZA, M. V. et al. Evaluation of Antimicrobial and Anti-biofilm activities of *Anacardium occidentale* stem bark extract. **Journal of Natural Products**, v. 6, p.198-205. 2013.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. ANTIOXIDANTS PROPERTIES OF PHENOLIC COMPOUNDS. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40. 2004.

FORTALEZA, C. M. C. B. et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **Journal of Hospital Infection**. vol. 96(2), p. 139–144. 2017.

FREITAS, M.A. et al. HPLC–DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Biotech** v.12, 2022.

FILHO, V. M. B. et al. Phytocompounds and modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajuí) on antibiotic drugs used in clinical infections. **Drug Des Devel Ther**. 2015.

FILHO, V. M. B. et al. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280–288. 2014

SIMÕES, C. M.O. et al (Org.) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de

metabólitos secundários. **Química Nova**, vol. 30, p. 374–381, 2007.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L.B. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clin Microbiol Rev.** 2019.

GONÇALVES, J. L. S. et al. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p.403–407, 2005.

GARCÍA, A.A.; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário de plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**. Vol. 2(3): pág. 119-145, 2009.

GAO, W.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current Opinion in Microbiology**, v. 41, p. 76–82, fev. 2018.

HUA-BIN, L. et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in metanol extracts from medicinal plants. **LWT**. vol. 41 p.385–390. 2008.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, vol. 3, no. 5, p. 421-569. 2012.

INFANTE V.H. et al. Evaluation of polymorphisms in pbp4 gene and genetic diversity in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* from hospitals in different states in Brazil. **FEMS Microbiol Lett**. vol. 7 p. 363. 2016.

JUTEAU, F. et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia** vol. 73: p. 532-535. 2002.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In SIMÕES et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed. p. 286-287. 2017.

KACZMAREK, B. Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials-A Minireview. **Materials (Basel)**. 2020.

KRAWCZYK, B. et al. The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. **Microorganisms**, vol. 9, no. 9, p. 1900. 2021.

KAO, P.H.N. et al. How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. **J. Mol. Biol.** vol. 431, p. 2932–2945. 2019.

KRAWCZYK, B, et al. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from one hospital in Poland-commensals or hospital-adapted pathogens?. **PLoS ONE**. 2020.

LI, C. et al. Point-Prevalence of healthcare-associated infection in China in 2010: a large multicenter epidemiological survey. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 35: p.1436-7. 2014.

LIMA, F. L. O.; ALMEIDA, P. A.; OLIVEIRA, G. A. L. Enterococcus spp. resistant to vancomycin and its spread in infections in the hospital environment. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8. 2020.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem.** v. 91(1): p. 131-137, 2005.

MAGILL, S.S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N Engl J Med.** Vol. 370: p.1198-208. 2014.

MARTINS, I.K. et al. Anacardium microcarpum Promotes Neuroprotection Dependently of AKT and ERK Phosphorylation but Does Not Prevent Mitochondrial Damage by 6-OHDA. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2018.

MACHADO T.B. et al. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Antimicrob.** vol. 21, p. 279-284. 2003.

MOTA, M. L. R.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 13, p.289–300, 1985.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 78, p.133–137, 2001.

MOHAMED J.A; HUANG D.B. Biofilm formation by enterococci. **J Med Microbiol** vol. 56, p. 1581–1588. 2007.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NEVES, A. M. et al. Phenolic profile, antioxidant and antifungal activity of extracts from four medicinal plants of the Anacardiaceae family. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8. 2021.

PLYUTA, V. et al. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **APMIS.** 2013.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 45-74, 2003.

RUFINO, M.S.M. et al. **Suporte técnico para a exploração racional do cajuzeiro.** Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará Fortaleza. Documento 107. 2007.

RAZA, T. et al. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **J Pak Med Assoc.** vol. 18. p. 768-772. 2018.

- SARKAR, R. et al. Anti-biofilm activity of Marula – A study with the standardized bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.154(1), p.170–175. 2014.
- SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella enterica de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.
- SALEHI, B. et al. Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Effects of Anacardium Plants: An Ethnopharmacological Perspective. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 11. 2020.
- SAVA, I.G. Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection. **Journal of Medical Microbiology**. Vol. 59, p.1001–1004. 2010.
- SÁEZ G.D. et al. Molecular identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented kidney beans flours (*Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus*) in northwestern Argentina. **Food Research International**. 2017.
- SANTOS, G.H.F. et al. Antibacterial activity of irradiated extracts of *Anacardium occidentale* on multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 140: p. 327- 332. 2018.
- SILVA-LUZ C.L.; PIRANI JR. [**Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4381>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- ŠVEC P.; FRANZ C. M. A. P. The genus *Enterococcus*. In Holzapfel WH, Wood BJB (ed), **Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy**. p. 175-211. 2014.
- SHARMA, S.; BINDAL, N. MOHANTY, S. Therapeutic Potential of Phytoconstituent in Management of Pesticide-Induced Neurotoxicity. **International Journal of Bio-Technology & Pharmaceutical Sciences**. V. 11. 2022.
- SCHMOURLO, G. et al. Screening of anti-fungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, p.563–568, 2005.
- SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R.; PELL, S.K.; MITCHELL, J.D. **Anacardiaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB44>>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- TAN, Y. P.; CHAN, E. W. C. Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*. **Food Bioscience**. v. 6, p. 17-23. 2014.

TENDOLKAR, P.M., BAGHDAYAN, A.S., SHANKAR, N. Pathogenic enterococci: New developments in the 21st century. **Cell. Mol. Life Sci.** vol. 60, p. 2622–2636. 2003.

TORTORA, G. J., BERDELL, R. F., CASE, C. L. Microbiologia. 12. ed. – Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

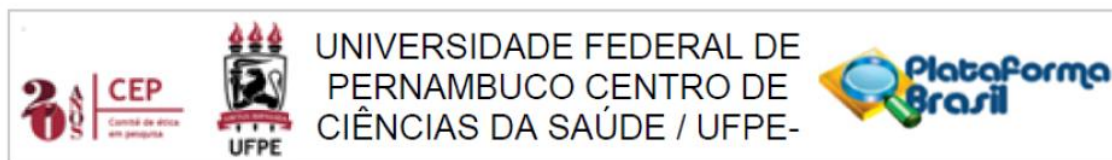
WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em 27 de dezembro de 2022.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso: 27 de dezembro de 2022.

ZARB, P., et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. **Euro Surveill.** vol.17. 2012.

8. ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência dos extratos de folhas de *Anacardium humile* A. St-HIL e do ácido elágico em comunidades de *Enterococcus faecalis* multirresistentes utilizando técnicas moleculares e proteômica

Pesquisador: Bárbara de Azevedo Ramos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84015517.7.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.581.568