

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BÁRBARA DE AZEVEDO RAMOS

**EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTIBIOFILME DE EXTRATOS RICOS EM
COMPOSTOS FENÓLICOS DE FOLHAS DE *Anacardium humile* A. St.-HIL
(ANACARDIACEAE)**

Recife
2017

BÁRBARA DE AZEVEDO RAMOS

**EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTIBIOFILME DE EXTRATOS RICOS EM
COMPOSTOS FENÓLICOS DE FOLHAS DE *Anacardium humile* A. St.-HIL
(ANACARDIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Biológicas do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ramos, Bárbara de Azevedo

Efeito antioxidante e antibiofilme de extratos ricos em compostos fenólicos de folhas de *Anacardium humile* A. St.-HIL (Anacardiaceae) / Bárbara de Azevedo Ramos. – 2017.

110 f. : il.

Orientador: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Caatinga 2. Agentes anti-infecciosos 3. Estafilococos I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientador) II. Título.

634.90981

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 076

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Efeito antioxidante e antibiofilme de extratos ricos em compostos fenólicos de folhas de *Anacardium humile* A. St.-HIL (Anacardiaceae)

Recife, 22 de fevereiro de 2017.

A comissão examinadora, composta pelos professores e doutores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a mestrand **BÁRBARA DE AZEVEDO RAMOS** como:

APROVADA

Recife, 22 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Examinador externo: Prof Dr^o Rafael Matos Ximenes

Examinadora interna: Prof^a Dr^a Betânia Maria

Suplente interna: Prof^a Dr^a Marcia Vanusa da Silva

Suplente externo: Dr^o Túlio Diego da Silva

RECIFE

2017

Dedico este trabalho a minha mãe, Sonia, minha irmã, Viviane, ao meu noivo, Marcio, e a todos que estiveram me apoiando por todo esse trajeto longo e cheio de obstáculos, me ajudando a passar por cada um.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me fazer escolher sempre o caminho certo e por ter colocado pessoas ao meu lado que me apoiam tanto nos momentos mais felizes, quanto nos momentos de tristeza.

Muito carinhosamente agradeço ao Departamento de Bioquímica e a todos que fazem parte por terem me dado a oportunidade de aprender um pouco do que é pesquisa e o que é ser pesquisador com muito carinho e prazer. Agradeço também aos órgãos financiadores, FACEPE, CAPES e CNPq, do qual sem eles eu não teria conseguido exercer nenhuma das minhas atividades.

Agradeço mais uma vez a minha Orientadora Professora Maria Tereza desde a Iniciação Científica sempre me apoiou, confiou e me mostrou durante este tempo de pesquisa o que é ser um pesquisador, que mesmo me dando vários desafios, me ajudou a ultrapassar cada um. Agradeço também por cada segundo da sua atenção.

De uma forma muito especial agradeço a minha Co-Orientadora Professora Marcia Vanusa que foi a primeira a me acolher e trilhar o meu caminho científico com muito carinho e teve grande contribuição por eu ser a pesquisadora que sou.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Maria Cecília, Amanda Virgínia, Sivoneide Maria, Vitória Araújo, Camilla Paiva, José Adelson, Túlio Diego, Bruno Santos, Lívia Caroline, Daniel Rodrigo, pela parceria e amizade durante esses dois anos do mestrado e os ensinamentos que trocamos ao longo dessa jornada. Às iniciações científicas, Marília Manta, Natália Lira e Bárbara Galdino pela ajuda na execução dos trabalhos.

Em especial também agradeço aos meus colegas do Departamento de Antibióticos, Alunos do Professor Rafael Ximenes que me ajudaram a desenvolver experimentos do qual eu não tinha nenhuma experiência, em especial: Maria de Fátima, Camila, Wellington e Raldinei. Ao professor Rafael em especial agradeço muito por ter me ajudado e confiado no trabalho.

Agradeço à minha mãe, Sonia Ramos, por estar sempre ao meu lado em todas as escolhas que fiz em minha vida, à minha irmã Viviane Bandeira e ao meu cunhado Rinaldo Bandeira que sempre me incentivaram e apoiaram meus estudos e minha trajetória de todas as maneiras, e em especial ao meu noivo Marcio Henrique que em todos os obstáculos que tive que enfrentar, esteve comigo me dando forças e comemorando todas as minhas conquistas.

Agradeço aos meus amigos que se estendem na vida pessoal e aos familiares que comemoraram desde o início do meu ciclo acadêmico até o fim desta jornada.

RESUMO

No Brasil são encontradas nove espécies do gênero *Anacardium*, sendo três delas endêmicas. Dentre elas a *Anacardium humile* St. -Hil, também conhecida como cajuzinho-do-cerrado ou Cajuí é uma das espécies nativa do Brasil e como indica seu nome é principalmente encontrada no Cerrado, podendo ser encontrada também na Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica. As espécies dessa família têm se mostrado promissoras na busca de compostos bioativos, comportando o maior número de investigações, principalmente quanto aos seus constituintes metabólicos. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o perfil fitoquímico e identificar o potencial antioxidante, por métodos *in vitro* e *in vivo*, antimicrobiano e antibiofilme dos extratos de folhas de *A. humile* St. Hil (Anacardiaceae). Foram utilizadas folhas de *A. humile* A. St.--Hil coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque, Pernambuco e identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco sob Voucher de número 93.117. As extrações em Soxhlet seguiram a ordem eluotrópica dos solventes: N-hexano (AhN), clorofórmio (AhC), acetato de etila (AhE) e metanol (AhM) e para o extrato bruto (AhW) o material foi extraído por sonicação em água destilada. O perfil fitoquímico foi determinado através das quantificações de fenóis e flavonoides, Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os métodos antioxidantes *in vitro* foram o DPPH, ABTS, ATT, FRAP e Inibição da peroxidação lipídica e a atividade antioxidante *in vivo* foi determinada através do modelo de hepatotoxicidade induzido por Tetracloreto de carbono em camundongos. Cepas de *S. aureus* foram cedidas pela coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, onde foi determinado o perfil de susceptibilidade e a avaliação da formação de biofilme. Para as atividades antimicrobianas somente as amostras ricas em compostos fenólicos foram utilizadas contra as cepas, e a atividade anti-biofilme foi analisada também por Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram identificados nos extratos Flavonoides, Saponinas, Monoterpenos, Sesquiterpenos, Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. Como majoritários, foi identificado o ácido gálico o do extrato AhE, e o ácido elágico o composto do extrato AhM, no qual são compostos já bem descritos na literatura por suas várias funções, incluindo antioxidantes e antimicrobianos. O teste de toxicidade oral mostrou que o extrato AhM das folhas de Cajuí não apresenta toxicidade ao organismo vivo. Os resultados obtidos nos testes de hepatoproteção comprovam o potencial antioxidante do extrato por diminuir os danos oxidativos causado pelo tetracloreto de carbono. O

reestabelecimento das enzimas hepáticas e a redução da peroxidação lipídica comprovam a importância dos compostos presentes na folha da *A. humile*. Os extratos AhE, AhM e AhW testados contra as cepas multirresistentes e cepas formadoras de biofilme e foram eficientes, dentre eles o extrato AhM é o mais eficaz para inibir o crescimento microbiano e o extrato AhM e AhW contra a aderência das cepas para formação do biofilme confirmado através da microscopia eletrônica de varredura. Dessa forma é possível concluir que os compostos encontrados na *A. humile* são eficientes substâncias antioxidante e antimicrobianas, devendo ser explorados agora seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: Caatinga. Hepatoprotetor. *Staphylococcus aureus*. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

In Brazil, nine species of the genus *Anacardium* are found, and three of them are endemic. Amongst them, the *Anacardium humile* St.-Hil, also called cajuzinho-do-cerrado or Cajuí, it is one of the Brazilian native species, mainly found in Cerrado, but can be found in Caatinga, Amazônia and Mata Atlântica too. The species of this family have shown promising results in the search for bio-active compounds, aggregating the largest number of investigations, mainly their constituents metabolites. The aims of this work is to evaluate the phytochemical profile and identify the antioxidant potential, using *in vitro* and *in vivo* methods, antimicrobial and antibiofilm of *A. humile* St. -Hil (Anacardiaceae) leaf extracts. Leaves of the *A. humile* A. St.-Hil were collected in Catimbau Park, Buíque, Pernambuco, identified according to the usual taxonomic techniques and deposited in the IPA Herbarium (Agronomic Institute of Pernambuco) under Voucher nº 93.117. The soxhlet extractions followed the solvents elution: N-hexane (AhN), chloroform (AhC), ethyl acetate (AhE) and methanol (AhM). The aqueous extract (AhW) was extracted by sonication in distilled water. Phytochemical profile was determined by phenols and flavonoids quantification, Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography. DPPH, ABTS, ATT, FRAP and Inhibition of lipid peroxidation *in vitro* antioxidants methods were used and *in vivo* antioxidant activity was determined from hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride model. *S. aureus* strains were acquired from a collection owned by Federal University of Pernambuco Antibiotics department, where susceptibility profile and biofilm formation were evaluated. For antimicrobial activities, only samples rich in phenolic compounds were utilized against the strains, and antibiofilm activity was analyzed by Scanning Electron Microscopy. Flavonoids, Saponins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins were identified in extracts. Gallic acid is majoritarian compound in AhE extract and Ellagic acid is majoritarian in AhM extract found through HPLC. These compounds have been described in other studies mainly because of their functions, as antioxidant and antimicrobial. The Oral toxicity test showed that AhM extract has no toxicity to the organism. The results of hepatoprotection prove the potential antioxidant of AhM extract, because they reduce oxidative damage caused by carbon tetrachloride. The normalization of hepatic enzymes and reduction of lipidic peroxidation prove the importance of the compounds present in *A. humile* leaf. The extracts AhE, AhM and AhW tested against the *multi-resistant bacteria* and biofilm forming strains were efficient, among them the AhM extract is the best to inhibit the microbial growth and AhM and AhW

extracts are the best against the adhesion of the strains, confirmed by Scanning Electron Microscopy. Therefore it is possible to conclude that compounds found in *A. humile* leaves are efficient antioxidant and antimicrobial substances, and now their mechanisms of action should be studied.

Key-words: Caatinga. Hepatoprotector. *Staphylococcus aureus*. Secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Localização do Parque Nacional do Catimbau dentro de pernambuco e em relação aos municípios vizinhos	23
FIGURA 2 - Elementos básicos do metabolismo primário em relação ao metabolismo secundário de plantas	25
FIGURA 3 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas	26
FIGURA 4 - Síntese dos terpenos e sua classificação quanto às unidades de isopreno que possuem	27
FIGURA 5 - Síntese de compostos fenólicos	29
FIGURA 6 - Estrutura química de alguns alcalóides conhecidos	31
FIGURAS 7 - Partes da <i>Anacardium humile</i> St.- HIL	33
FIGURA 8 - Descrição geral das reações que conduzem à formação de ros. Setas verdes representam a peroxidação lipídica. Setas azuis representam as reações haber-weiss e as setas vermelhas representam as reações de fenton. As letras em negrito representam radicais livres. Sod - enzima superóxido-dismutase, cat - enzima catalase	35
FIGURA 9 - O equilíbrio aproximado de antioxidantes e espécies reactivas in vivo	37
FIGURA 10 - Pntegração dos sistemas de defesa enzimáticos. Nota: por meio da reação de dismutação, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($O_2^{\cdot}$). As enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais	38
FIGURA 11 - principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (etapa 1) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - quorum sensing (etapa 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3)	42
FIGURA 12 - os principais componentes da matriz - polissacarídeos, proteínas e dna - são distribuídas entre as células num padrão não homogêneo, definindo-se diferenças entre as regiões da matriz	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DOS ARTIGOS

ARTIGO 1

FIGURA 1 - Cromatogramas gerados a partir da corrida cromatográfica dos extratos de folhas da *A. humile*. (A) Cromatograma do extrato AcEtA. (B) Cromatograma do extrato MeOH. (C) Cromatograma do extrato AHaq. Cromatogramas analisados no comprimento de onda de 256 nm, pois é o indicado para observação de compostos fenólicos. Os picos representam a intensidade do sinal, que é proporcional a concentração de dado composto na amostra 72

FIGURA 2 - Percentual de sequestro de radicais livres pelo método do DPPH em função do aumento da concentração dos extratos de folhas de *A. humile*. SRL – Sequestro de radicais livre 73

FIGURA 3 - Percentual de inibição do radical ABTS em função do aumento da concentração dos extratos de folhas de *A. humile* 74

FIGURA 4 - Análise ponderal dos grupos experimentais, realizada durante 14 dias de experimento. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e analisados por ANOVA com pós-teste de Dun com significância de $p < 0,05$ 78

FIGURA 5 - Efeitos do extrato metanólico e da Silimarina nos níveis das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica. Resultados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. grupo CCl₄ intoxicado 83

ARTIGO 2

FIGURA 1 - Análise da produção de slime através do ágar vermelho congo. Cepa produtora à esquerda e cepa não produtora à direita 100

FIGURA 2 - Análise da formação de biofilme através do método do cristal violeta. Cepas multirresistentes de *S. aureus* comparadas com a ODC de acordo com o método de Stepanovic, S. *et al.* (2007). ODC – Densidade ótica do controle. * $p < 0,05$ vs. ODC. ns – não apresenta diferença significativa vs. ODC 101

FIGURA 3 - Dados da curva de morte das cepas 02, 679, 699 e 733, submetidas ao extrato MeOH durante as 24 horas de crescimento. Amp – ampicilina, Tet – tetraciclina, CC – controle de crescimento da cepa. MeOH – extrato metanólico 103

FIGURA 4 - Microscopia eletrônica das cepas 02 e 731, submetidas aos extratos MeOH e AHaq. Cada letra é composta de duas imagens representando o aumento de x1.000 e o de x10.000. A – Controle de crescimento da cepa 02, B – Cepa 02 submetida ao extrato MeOH, C - Cepa 02 submetida ao extrato AHaq, D - Controle de crescimento da cepa 731, E - Cepa 731 submetida ao extrato MeOH e F – Cepa 731 submetida ao extrato AHaq 105

LISTA DE TABELA DOS ARTIGOS

ARTIGO 1

TABELA 1 - Sistemas e reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada, para identificação dos metabólitos secundários dos extratos de folhas de <i>A. humile</i>	71
TABELA 2 - Resultado das atividades antioxidantes dos extratos de folhas de <i>A. humile</i> e dos padrões	75
TABELA 3 - Correlação de Pearson (r^2) entre as atividades antioxidantes de todos os extratos de folhas de <i>A. humile</i> e as dosagens de Fenóis totais ou Flavonoides	77
TABELA 4 - Efeitos dos tratamentos sobre o peso do corpo, peso do fígado e index hepático nos camundongos intoxicados com tetracloreto de carbono	79
TABELA 5 - Efeitos do extrato metanólico, da Silimarina e do grupo intoxicado nos parâmetros sorológicos hepáticos	81

ARTIGO 2

TABELA 1 - Sistemas e reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada, para identificação dos metabólitos secundários dos extratos de folhas de <i>A. humile</i>	95
TABELA 2 - Prospecção fitoquímica dos extratos de folhas de <i>A. humile</i>	98
TABELA 3 - Espécime clínico, perfil de resistência frente a antimicrobianos e análise da formação de biofilme de cepas de <i>S. aureus</i> multirresistentes	99
TABELA 4 - Resultados da concentração inibitória mínima de folhas de <i>A. humile</i> contra cepas de <i>S. aureus</i> multirresistentes	102
TABELA 5 - Resultados da anti-formação do biofilme de folhas de <i>A. humile</i> sobre as cepas multirresistentes de <i>S. aureus</i>	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

·OH - Radical hidroxila

¹O₂ - Oxigênio singlete

AA - Ácido Ascórbico

ABTS•+ - 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid)

ALB - Albumina

ALT - Transaminase pirúvica

AMP - Ampicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - Transaminase oxalacética

BAP - Proteínas associadas a biofilme

BHT - butilhidroxitolueno

BT - Bilirrubina Total

CAT - Catalase

CDC - Cromatografia em Camada Delgada

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO - dimetilsufóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Ótica

DPPH - 2,2-difenil- 1-picrilhidrazil

eDNA - DNA extracelular

EPS - Substâncias poliméricas extracelulares

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ERSs - Espécies reativas de enxofre

FA - Fosfatase Alcalina

Fe^{2+} - Ferro ferroso

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

GSSH - Glutathione oxidada

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

$\text{HO}_2^\cdot$ - Radical hidroperoxil

HOCl - Ácido hipocloroso

IPA - Instituto Agronômico de Pernambuco

IPP - Isopentilpirofosfato

MEP - Metilerythritol

MEV - microscopia eletrônica de varredura

MMA - Ministério do Meio Ambiente

NO - Óxido nítrico

$\text{O}_2^\cdot$ - Ânion superóxido

O_2 - Oxigênio

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONOO^- - Peroxinitrito

PBP - Proteína ligadora de penicilina

PBP2a - Proteína ligadora de penicilina alterada

PIA - Polissacarídeo de adesão intracelular

PT - Proteínas Totais

QS - Quorum sensing

SOD - Superóxido dismutase

SRL - Sequestro de Radicais Livres

VISA - *Staphylococcus aureus* resistência intermediária a Vancomicina

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a Vancomicina

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1	CAATINGA	22
3.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	24
3.2.1	Terpenos	26
3.2.2	Compostos fenólicos.....	29
3.2.3	Alcaloides	30
3.3	FAMÍLIA ANACARDIACEAE	31
3.4	RADICAIS LIVRES E EXTRESSE OXIDATIVO.....	34
3.5	ANTIOXIDANTES.....	36
3.5.1	Enzimáticos.....	37
3.5.2	Não-enzimáticos	38
3.6	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	39
3.7	FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	41
3.8	A MATRIZ DO BIOFILME	43
3.9	<i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	45
4	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A – Artigo 1.....	60
	ANEXO B – Artigo 2.....	90
	ANEXO C – Parecer de aprovação do comitê de ética	110

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas que cobre a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha (LEAL *et al.*, 2005). De acordo com o Instituto Chico Mendes (2017), atualmente a região da Caatinga possui 29 unidades de conservação no qual possuem planos de manejo diferentes para cada um. Uma das áreas de conservação se encontra no estado de Pernambuco, o Parque Nacional do Catimbau, no qual foi criado por decreto federal em 13 de dezembro de 2002, e está localizado na parte central de Pernambuco em uma região conhecida como "Chapada de São José", que inclui partes dos municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque, e abrange uma área total de 62,300 hectares, essa região é considerada de extrema importância biológica pelo Ministério do Meio Ambiente devido ao grande número de endemismos (MMA, 2002, BRASIL, 2002). A maioria das chuvas na Caatinga (50-70%) é concentrada em três meses consecutivos, apesar da alta variação anual e dos longos períodos de seca serem frequentes (NIMER, 1972). O número de meses secos aumenta da periferia para o centro da região, e algumas localidades experimentam períodos de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade de água para as plantas (PRADO, D., 2003). Essas variações elevadas das condições ambientais da Caatinga fazem com que as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas sejam alteradas, pois, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos e também ecológicos.

As plantas destinam uma quantidade significativa de carbono absorvido e energia para a síntese de uma grande variedade de moléculas orgânicas que parecem ter um papel direto nos processos fotossintéticos, respiratório, a absorção de nutrientes, transporte de solutos ou de síntese de proteínas, carboidratos ou lipídeos, que são chamados de metabólitos secundários. Esses metabólitos são sintetizados em pequenas quantidades e muitas vezes limitados a certa família, gênero, ou até mesmo a espécie (GARCÍA, 2009). Embora metabólitos primários tenham um papel fundamental na sobrevivência da espécie, ausência de metabólitos secundários não resulta em morte imediata, mas sim na disfunção de longo prazo de sobrevivência do organismo, frequentemente desempenhando um importante papel na defesa da planta. Estes compostos constituem um grupo extremamente diversificado de produtos naturais sintetizadas por plantas, fungos, bactérias, algas e animais (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012). Alguns metabólitos possuem funções específicas, como atraente e repelente de

predadores, pigmentos que atraem insetos polinizadores, repelentes e pesticidas naturais, entre outros. Uma simples classificação de metabólitos secundários que inclui os principais grupos é: terpenos (óleos essenciais de plantas, glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e lignina) e compostos nitrogenados (tais como alcalóides e glucosinolatos) (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012).

O gênero *Anacardium* inclui 20 espécies aceitas, porém são indicadas em torno de 39 espécies (THE PLANT LIST, 2010). No Brasil são encontradas, nove espécies, sendo três delas endêmicas. As espécies dessa família têm se mostrado promissoras na busca de compostos bioativos, comportando o maior numero de investigações, principalmente quanto aos seus constituintes metabólicos. Dentre esses constituintes os compostos fenólicos e catecólicos, ou ainda a mistura deles, chamadas de lipídeos fenólicos, ou os terpenos, os flavonoides, entre outros metabólitos (Correia, 2006). Dentre elas a *Anacardium humile* St. Hil, também conhecida como cajuzinho-do-cerrado ou Cajuí, nativa do Brasil e como indica seu nome é principalmente encontrada no Cerrado, porém sendo encontrada também na Caatinga, Amazônia e mata Atlântica (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2016) (Figura 7). Vários estudos ao longo dos anos vêm buscando as propriedades medicinais da *A. humile*, dentre eles essa espécie se destaca pelas propriedades: antilarvicida sobre o mosquito *Aedes aegypti* do seu óleo (PORTO *et al.*, 2008), atividade antiulcerogênica induzida por etanol na mucosa gástrica de ratos de extratos a base de diclorometano e metanol de suas folhas (FERREIRA-LUIZ, 2010), propriedades hipoglicemiantes do extrato aquoso (URZÊDA, 2013), atividade antimicrobiana contra cepas ATCCs de frações rica em taninos das folhas da *A. humile* (FERREIRA, 2012), entre outros. Sendo assim os estudos desta espécie ainda são escassos e futuros trabalhos absorvendo seu potencial fará com que essa espécie seja preservada cada vez mais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o perfil fitoquímico e identificar o potencial antioxidante, por métodos *in vitro* e *in vivo*, antimicrobiano e antibiofilme dos extratos de folhas de *A. humile* St. Hil (Anacardiaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Preparar os extratos de folhas da *A. humile* com solventes orgânicos;
- b) Identificar os metabólitos secundários dos diferentes extratos;
- c) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos;
- d) Identificar o potencial antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a drogas;
- e) Verificar a cinética de morte inicial das cepas de *S. aureus*;
- f) Avaliar a atividade anti-biofilme dos extratos frente a cepas de *S. aureus* formadoras de biofilme e analisar as alterações ultra-estruturais dos microorganismos por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CAATINGA

A Caatinga é um mosaico de arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas que cobre a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha. Estendendo-se por cerca de 735.000 km² e é limitada a leste e a oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado (LEAL, I.N., *et al.*, 2005). O termo “caatinga” é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (PRADO, D., 2003).

A origem da vegetação da Caatinga tem sido debatida ao longo de muitos anos, mas resultados de estudos recentes sugerem que a Caatinga é parte de uma floresta tropical seca sazonal que ocupou grandes áreas da América do Sul em períodos mais secos e frios durante o Pleistoceno (PENNINGTON, *et al.*, 2004). Na região nordeste do Brasil, florestas secas são bem representadas pela caatinga que se caracteriza por possuir um clima sazonal com uma curta estação chuvosa (três a seis meses) e uma estação seca mais prolongada (seis a nove meses) e precipitação média anual que varia de 252 a 1.200 mm (NIMER, E., 1979). As áreas de vegetação de caatinga, em geral, vêm sofrendo muita perturbação antrópica, sendo freqüentemente utilizadas para o estabelecimento de atividades de agricultura ou utilizadas como áreas de pastagens nativas (ARAÚJO, *et al.*, 2007).

Entretanto, estudos recentes vêm demonstrando a importância da Caatinga para a conservação da biodiversidade brasileira (LEAL *et al.*, 2003a). Já foram registradas 932 espécies de plantas vasculares (GIULIETTI, *et al.*, 2004), 187 de abelhas (ZANELLA E MARTINS, 2003), 240 de peixes (ROSA, *et al.*, 2003), 167 de répteis e anfíbios (RODRIGUES, 2003), 62 famílias e 510 espécies de aves (SILVA *et al.*, 2003) e 148 espécies de mamíferos (Oliveira *et al.*, 2003), porém o número real de espécies na Caatinga é, provavelmente, ainda maior, uma vez que 41% da região nunca foi investigada e 80% permanece subamostrada (TABARELLI E VICENTE, 2004). De acordo com o Instituto Chico Mendes (2017), atualmente a região da Caatinga possui 29 unidades de conservação no qual possuem planos de manejo diferentes para cada um.

Uma das áreas de conservação se encontra no estado de Pernambuco. A pequena área do Estado de Pernambuco (98.079 Km²) não lhe permite possuirum tipo ou tipos próprios de vegetação. As diferentes zonas fitogeográficas nele encontradas são parte ou repetições de algumas das grandes zonas fitogeográficas do Brasil. Dessa forma, ocorrem em Pernambuco 4 zonas fítogeográficas: do litoral, da mata, da caatinga e das savanas. A zona da Caatinga é a maior das zonas fitogeográficas e caracteriza-se por uma vegetação de porte médio a baixo, tipicamente tropófila (decídua) rica de espinhos, dentre as espécies de Cactáceas e Bromeliáceas. O clima é seco e o solo em grande parte é raso (LIMA, D.A., 2007). Dentro dessa zona fitogeográfica se encontra o Parque Nacional do Catimbau, no qual foi criado por decreto federal em 13 de dezembro de 2002, e está localizado na parte central de Pernambuco, dentro de uma região considerada de extrema importância biológica pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2002) devido ao grande número de endemismos.

O Parque Nacional do Catimbau está localizado na parte central do estado brasileiro de Pernambuco, em uma região conhecida como "Chapada de São José", que inclui partes dos municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque (Figura 1), e abrange uma área total de 62,300 hectares (BRASIL, 2002). Quatro principais vegetações podem ser distinguidas dentro da área do parque (RODAL *et al.*, 1998) - caatinga arbustiva, campos rupestres, brejos de altitude e caatinga arbustiva perene.

Figura 1: Localização do Parque Nacional do Catimbau dentro de Pernambuco e em relação aos municípios vizinhos



Fonte: Souza, A.E.B.A., 2012.

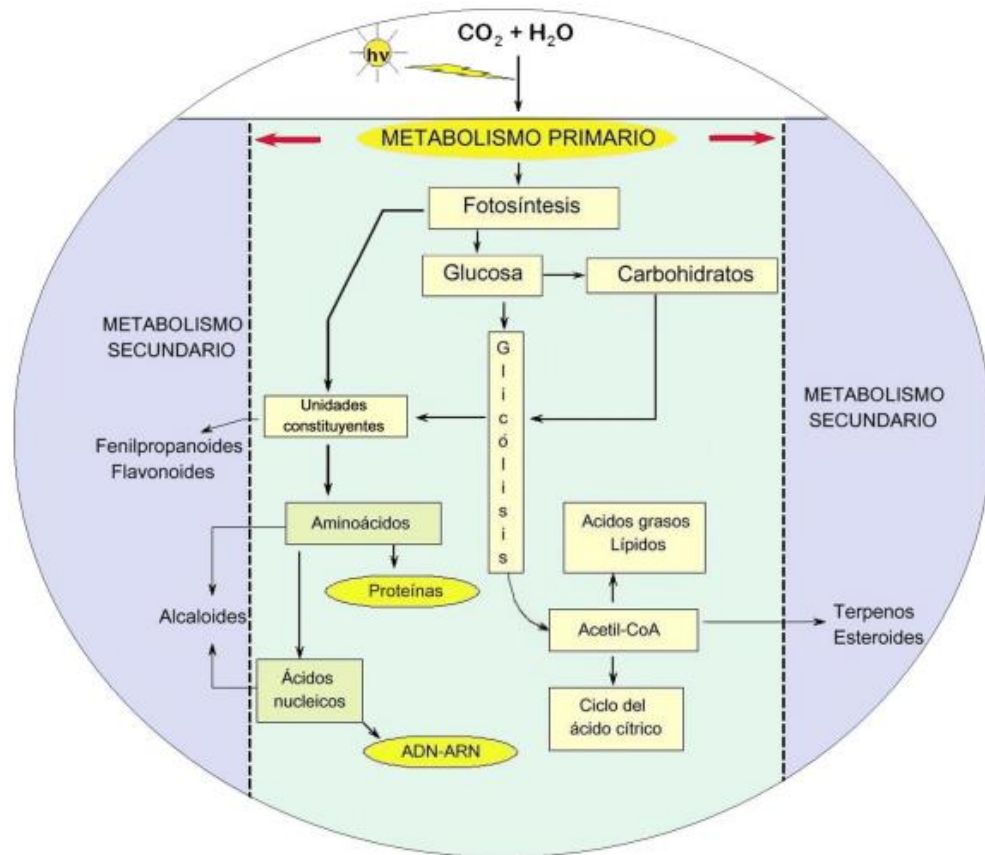
A maioria das chuvas na Caatinga (50-70%) é concentrada em três meses consecutivos, apesar da alta variação anual e dos longos períodos de seca serem frequentes (NIMER, 1972). O número de meses secos aumenta da periferia para o centro da região, e algumas localidades experimentam períodos de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade de água para as plantas (PRADO, D., 2003).

Essas variações elevadas das condições ambientais da Caatinga fazem com que as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas sejam alteradas, pois, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos e também ecológicos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por tais condições ambientais.

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário (Figura 2). As plantas destinam uma quantidade significativa de carbono absorvido e energia para a síntese de uma grande variedade de moléculas orgânicas que parecem ter um papel direto nos processos fotossintéticos, respiratório, a absorção de nutrientes, transporte de solutos ou de síntese de proteínas, carboidratos ou lipídeos, que são chamados de metabólitos secundários. Esses metabólitos são sintetizados em pequenas quantidades e muitas vezes limitados a certa família, gênero, ou até mesmo a espécie (GARCÍA, A.A. 2009).

Figura 2: Elementos básicos do metabolismo primário em relação ao metabolismo secundário de plantas.



Fonte: GARCÍA, A.A. 2009.

Embora metabólitos primários tenham um papel fundamental na sobrevivência da espécie, ausência de metabólitos secundários não resulta em morte imediata, mas sim na disfunção de longo prazo de sobrevivência do organismo, frequentemente desempenhando um importante papel na defesa da planta. Estes compostos constituem um grupo extremamente diversificado de produtos naturais sintetizadas por plantas, fungos, bactérias, algas e animais (AGOSTINI-COSTA, T.S., *et al*, 2012).

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, são de considerável importância e influenciam não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (BOWERS, M. D., *et al*, 1993). Além de outros fatores como: temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes disponíveis, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Figura 3) (GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P., 2007).

Figura 3: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P., 2007.

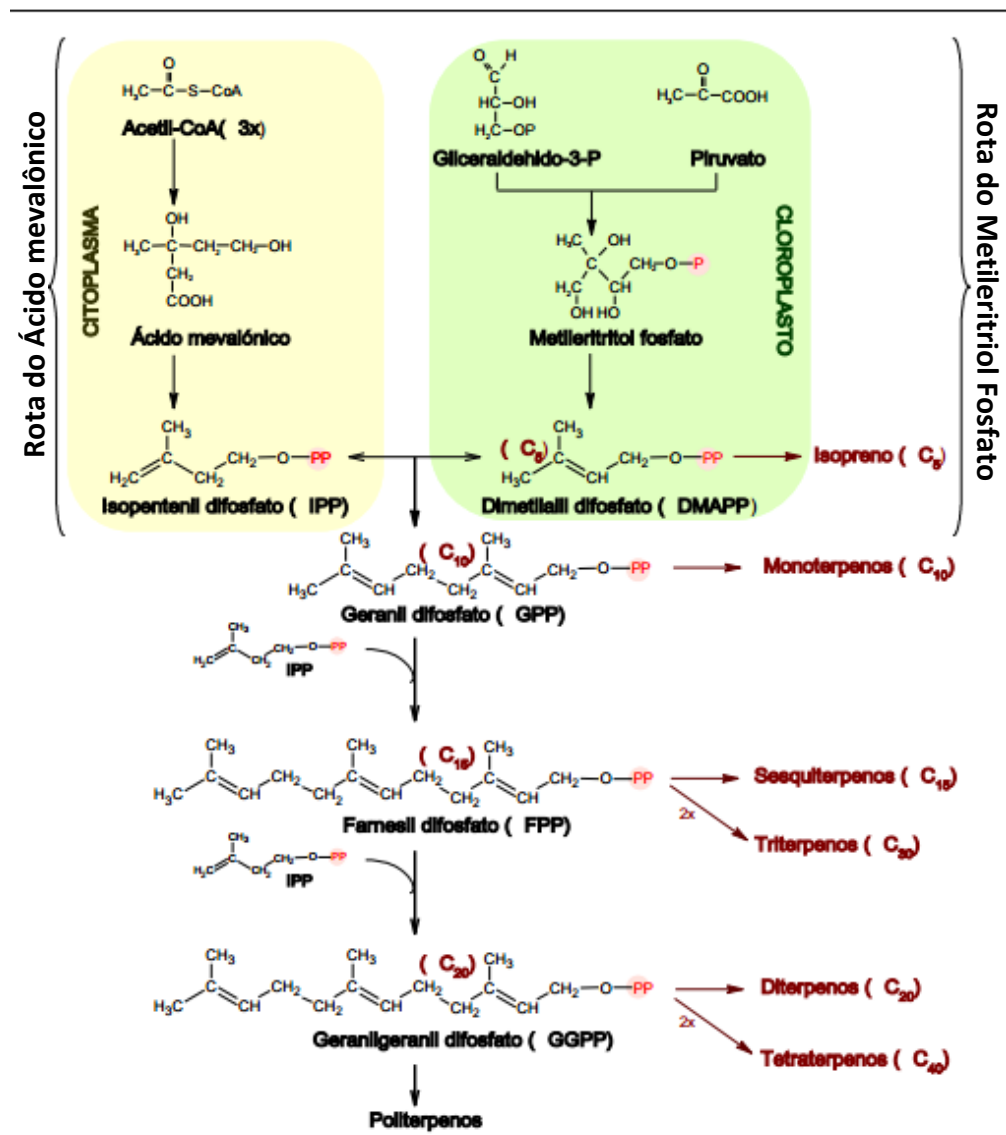
Esses metabólitos são produzidos em níveis mais altos durante uma transição de crescimento ativo a fase estacionária o que caracteriza o metabolismo secundário como parte integrante do metabolismo celular e biologia; ele depende de metabolismo primário para fornecer as enzimas necessárias, energia, substratos e maquinaria celular e contribui para a sobrevivência a longo prazo do produtor (ROZE, L.V., *et al*, 2011). Alguns metabólitos possuem funções específicas, como atraente e repelente de predadores, pigmentos que atraem insetos polinizadores, repelentes e pesticidas naturais, entre outros. Uma simples classificação de metabólitos secundários que inclui os principais grupos é: terpenos (óleos essenciais de plantas, glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e lignina) e compostos nitrogenados (tais como alcalóides e glucosinolatos) (AGOSTINI-COSTA, T.S., *et al*, 2012).

3.2.1 Terpenos

Terpenos são a maior e mais diversificada família de produtos naturais, que variam em estrutura de linear a moléculas policíclicas e no tamanho. Terpenos são feitos a partir de combinações de unidades chamadas de isopreno (C₅). A biossíntese dos terpenos consiste de síntese do isopentenilpirofosfato (IPP) precursor, adição repetida de IPP e modificação

enzimática secundária (reação redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais para os diferentes terpenos. Os principais são os terpenos monoterpênicos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), mas Hemiterpenos (C₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) também existem. O terpeno que contém oxigênio é chamado um terpenóide. Eles são sintetizados a partir de metabólitos primários por duas vias: ácido mevalônico, ativa no citosol, onde três moléculas de acetil-CoA se condensam para formar o ácido mevalônico, que reage para formar isopentenil-difosfato (IPP), ou ainda a rota do fosfato de metileritritol (MEP) que operam nos cloroplastos e também gera IPP (Figura 4) (BAKKALI, F., *et al.*, 2007).

Figura 4: Síntese dos terpenos e sua classificação quanto às unidades de isopreno que possuem.



Fonte: GARCÍA, A.A. 2009, adaptado RAMOS, B.A.

Os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20), são montados pela junção de moléculas de isopreno, já os triterpenos (C30), são resultado da junção de duas moléculas de sesquiterpenos e os tetraterpenos (C40) de duas moléculas de diterpenos. Existem ainda os politerpenos que são junções de mais de 100 moléculas de isopreno.

Os monoterpenos são formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C10). Eles são as moléculas mais representativas constituem 90% dos óleos essenciais e permitem uma grande variedade de estruturas. Os sesquiterpenos são formados a partir da montagem de três unidades de isopreno (C15). A extensão da cadeia aumenta o número de ciclizações que permite que uma grande variedade de estruturas (BAKKALI, F., *et al*, 2007).

Os diterpenos surgem a partir de difosfato de geranylgeranilo, e apresentam unidades de 20 átomos de carbono no seu esqueleto de base. Um dos mais simples e mais importante dos diterpenos é fitol, uma forma reduzida de geranylgeraniol, que forma o lipófilo de cadeia lateral das clorofilas (VETTER, W.; SCHRÖEDER, M., 2011).

Triterpenos (C30) são uma grande classe de compostos que apresentam muitas atividades biológicas importantes; eles surgem de esqualeno, um acoplamento de duas unidades de difosfato de farnesil (Abe, I., 2007). A ciclização de esqualeno, ou de óxido de esqualeno leva a um grande número de diversos tipos esqueléticos de triterpeno estrutural, tais como lupano e oleano (TANTILLO, D.J., 2011). Os esteróides são triterpenóides modificados, sem os três grupos metilo em C-4 e C-14. Os esteróis são característicos de eucariotas e em bactérias são escassamente distribuídos com variedade limitada de produtos (SUMMONS *et al.*, 2006).

As saponinas são um grupo de compostos naturais apresentando agliconas triterpênicas, genina ou sapogenina, ligados covalentemente a uma ou mais unidades de glicose (AUGUSTIN *et al.*, 2011).

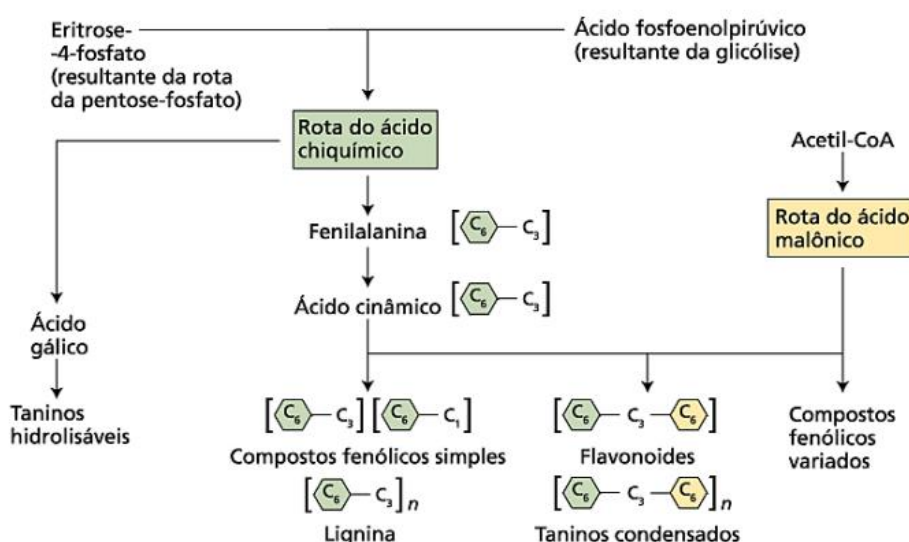
Outro grupo importante encontrado na classe dos terpenos são os carotenóides (C40), mais de 650 são encontrados na natureza, constituem o maior grupo de corantes naturais. Os carotenóides são substâncias com propriedades muito especiais possuídos por nenhum outro grupo de substâncias; que constituem a base das suas várias funções e ações variadas em todos os tipos de organismos vivos (BRITTON, G., 1995). Os carotenóides são biossintetizados por plantas, algas, fungos, leveduras e bactérias e são compostos isoprenóides, biossintetizados por ligação cauda-a-cauda de duas moléculas de geranylgeranilo difosfato. Isto produz o esqueleto de 40 carbonos a partir do qual todas as variações individuais são derivadas.

3.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução, atuam contra patógenos e alguns caracterizam a pigmentação de vegetais e são amplamente distribuídos na natureza (NACZK, M., 2004).

Esses compostos são definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LE, S.J., *et al*, 2005). São sintetizados por duas rotas básicas: a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico (Figura 5).

Figura 5: Síntese de compostos fenólicos



Fonte: TAIZ, L. E ZEIGER, E. 2004.

As suas estruturas químicas podem variar grandemente, incluindo fenóis simples (C_6), tais como derivados de ácido hidrobenzoico, bem como polímeros de cadeia longa de elevado peso molecular, tais como, ligninas (C_6-C_3) $_n$ e taninos condensados ($C_6-C_3-C_6$) $_n$. Estilbenos ($C_6-C_2-C_6$) e os flavonóides ($C_6-C_3-C_6$) são compostos fenólicos com peso molecular intermédio que apresentam muitas atividades farmacológicas e biológicas (Agostini-Costa, T.S., *et al*, 2012).

Por causa da sua estrutura variável, são multifuncionais, existindo cerca de cinco mil compostos no qual destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI, F., 1999).

Os flavonóides estão presentes em todos os tecidos da planta. São constituídos de em esqueleto principal de quinze carbonos organizados em três anéis principais na configuração C₆-C₃-C₆ (HARBONE, J.B., 1999). Os anéis A e B são unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C, no qual as variações e substituições nesse anel resultam nas importantes classes de flavonóides, que são os flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas (HOLLMAN, P.C.H., *et al.*, 1999).

Os ácidos fenólicos possuem como característica um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo principalmente propriedades antioxidantes para os vegetais. São divididos em dois principais grupos. Primeiramente os derivados de ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁) caracterizando os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo grupo é formado pelos derivados dos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃), as cumarinas são representantes desse grupo no qual derivam do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (SOARES, S.E., 2002).

Os taninos são polifenóis de alto peso molecular e, segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis (ANGELO, P.M., 2007).

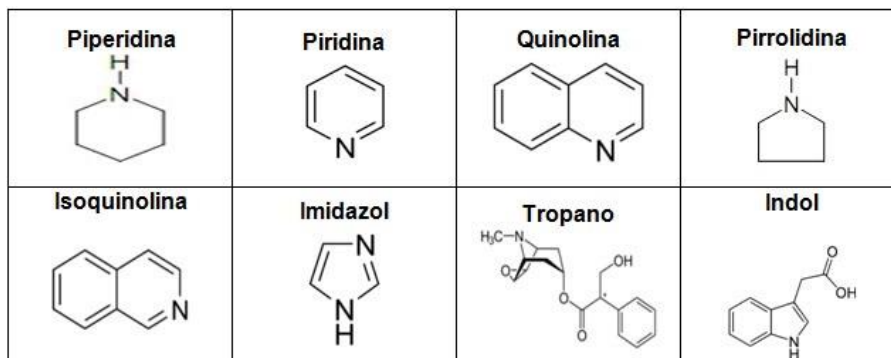
Por último os tocoferóis, que são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas. Sua estrutura química pode ser representada por cadeia saturada ligada ao anel ou cadeia insaturada (SHAHIDI, F., 1992).

3.2.3 Alcaloides

A definição mais aceita dos alcalóides foi apresentada por Pelletier são substâncias orgânicas cíclicas contendo nitrogênio em um estado oxidativo negativo que possui uma distribuição limitada entre os organismos vivos (Figura 6) (Simões C.M.O, *et al.*, 2017). A maioria desses compostos é derivada dos aminoácidos tirosina e triptofano, e alguns derivam da ornitina (AGOSTINI-COSTA, T.S., *et al.*, 2012). São compostos geralmente heterocíclicos embora alguns sejam compostos nitrogenados alifáticos como a mescalina ou colchicina, por

exemplo. Eles são encontrados em cerca de 20% das plantas vasculares, na maior parte das dicotiledoneas herbáceas (GARCÍA, A.A. 2009).

Figura 6: Estrutura química de alguns alcalóides conhecidos.



Fonte: <http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/alcaloides/>.

Alcalóides constituem um grande grupo de metabólitos secundários, com mais de 12.000 substâncias isoladas. Uma enorme variedade de fórmulas estruturais, proveniente de vias biossintéticas diferentes onde suas atividades farmacológicas são características do grupo (BRIELMANN, H.R., *et al.*, 2006).

Evidências arqueológicas têm demonstrado o uso de alcalóides (usando plantas ou extratos) desde 4000 a.C., e eles continuam sendo amplamente utilizados ainda hoje (ROBERTS, M.F.; WINK, M., 1998). Muitos deles são tóxicos e podem causar a morte, mesmo em pequenas quantidades. Esses compostos em plantas e animais parecem ser responsáveis por mecanismos de defesa, pois sua toxicidade é uma boa arma para inibir a ação de predadores, como herbívoros (AGOSTINI-COSTA, T.S., *et al.*, 2012).

3.3 FAMÍLIA ANACARDIACEAE

De acordo com o The Plant List (2010) a família Anacardiaceae é o maior grupo de angiospermas, no qual englobam mundialmente cinco tribos, Dobineeae, Anacardieae, Spondiadeae, Rhoeeae, Semecarpeae, no qual se encontram 72 gêneros que se encontram distribuídas em torno de 600 espécies.

No Brasil, da Tribo Anacardieae, se encontram 53 espécies distribuídas em 18 gêneros (*Anacardium*, *Antrocaryon*, *Apterokarpos*, *Astronium*, *Camptosperma*, *Cyrtocarpa*, *Garuga*, *Lithrea*, *Loxopterygium*, *Mangifera*, *Mauria*, *Myracrodruon*, *Poupartia*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Spondias*, *Tapirira* e *Thyrsodium*) sendo 13 delas endêmicas distribuídas por todo território (Flora do Brasil). Essas plantas se apresentam como árvores, arbustos ou subarbustos verdes, andromonóica com flores funcionalmente estaminadas e bissexuais na mesma inflorescência. (LINNAEUS Sp., 1753).

O gênero *Anacardium* inclui 20 espécies aceitas, porém são indicadas em torno de 39 espécies (THE PLANT LIST, 2010). No Brasil são encontradas, 9 espécies, sendo 3 delas endêmicas. As espécies dessa família tem se mostrado promissoras na busca de compostos bioativos, comportando o maior número de investigações, principalmente quanto aos seus constituintes metabólicos. Dentre esses constituintes os compostos fenólicos e catecólicos, ou ainda a mistura deles, chamadas de lipídeos fenólicos, ou os terpenos e flavonoides, entre outros metabólitos (CORREIA, S.J., 2006).

Dentro desse gênero a espécie mais estudada é a *Anacardium occidentale*, também conhecida como Cajueiro, habita a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e também o Pantanal. Outra espécie importante nesse gênero é a *Anacardium humile* St. Hil, também conhecida como cajuzinho-do-cerrado ou Cajuí, nativa do Brasil e como indica seu nome é principalmente encontrada no Cerrado, porém sendo encontrada também na Caatinga, Amazônia e mata Atlântica (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2016) (Figura 7).

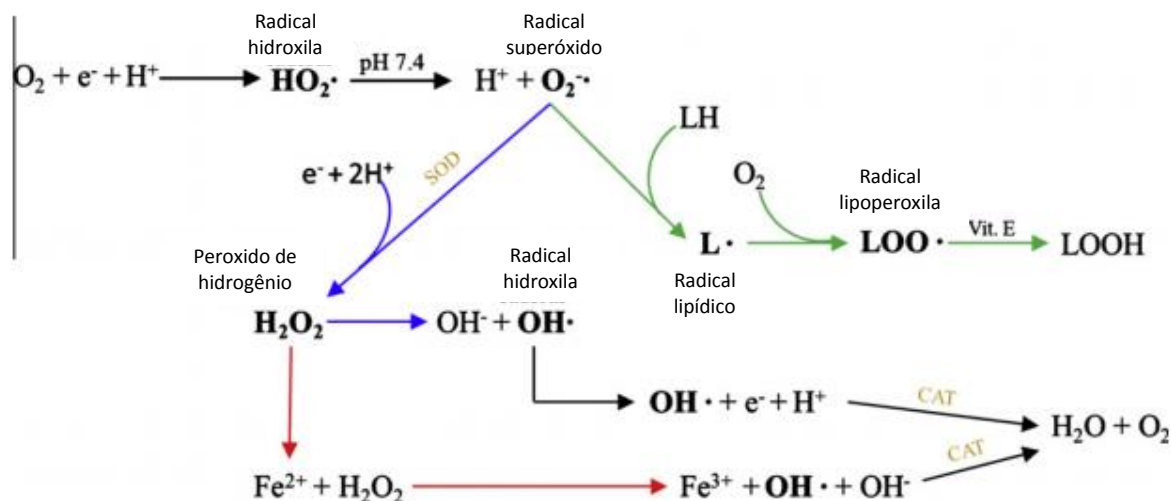
3.4 RADICAIS LIVRES E EXTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons não emparelhados que são altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas. A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (BARBOSA, K.B.F. *et al*, 2010).

Esses radicais são produzidos como uma parte normal do metabolismo; dentro da mitocôndria, através da xantina-oxidase, nos peroxissomos, nos processos inflamatórios, na fagocitose, isquemia, e no exercício físico, porém também existem fatores externos que ajudam a promover a produção de radicais livres como: o fumo, os poluentes ambientais, a radiação, o uso excessivo de medicamentos, os pesticidas e os solventes industriais (LOBO, *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER, C.D., 2004).

Os radicais livres são derivados de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre. Criando, assim, espécies reativas de oxigênio (EROs) (Figura 8), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (ERSs). EROs incluem os radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxil ($HO_2^{\cdot}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), o óxido nítrico (NO), e outras espécies, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). ERNs derivam de NO através da reação com O_2 e formação de $ONOO^{\cdot-}$, já as ERSs são facilmente formadas por meio da reação com radicais tióis com qualquer umas das EROs (CAROCHO, M., 2013).

Figura 8: Descrição geral das reações que conduzem à formação de ROS. Setas verdes representam a peroxidação lipídica. Setas azuis representam as reações Haber-Weiss e as setas vermelhas representam as reações de Fenton. As letras em negrito representam radicais livres. SOD - enzima superóxido-dismutase, CAT - enzima catalase. Adaptado de Ferreira *et al.* (2009) e Flora (2009).



Fonte: CAROCHO, M., 2013, adaptado por RAMOS, B.A., 2017

O radical hidroperoxil ($\text{HO}_2^\cdot$) se dissocia em pH 7, para formar o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Este radical é extremamente reativo e pode interagir com um número de moléculas (CAROCHO, M., 2013). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de radicais hidroxilas possuem uma ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Esse radical possui vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro (BARBOSA, K.B.F., *et al*, 2010). Se o peróxido de hidrogênio reage com um catalisador como Fe^{2+} , a reação de Fenton pode ocorrer ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^\cdot$) formando radical hidroxila (FLORA, S.J.S., 2009). As EROs desempenham papéis importantes na biologia celular, já que em baixos níveis as EROs são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos (LIMA, F.O., 2012).

No que diz respeito à ERNs, o mecanismo de formação de ONOO é: $\text{NO}^\cdot + \text{O}_2^-$ (SQUADRITO, G.L.; PRYOR, W.A., 1998), e finalmente, ERSs derivam, sob condições oxidantes, a partir de tióis para formar um dissulfeto que, com a continuação da oxidação pode resultar em qualquer dissulfeto-S-monóxido ou dissulfeto-S-dióxido como uma molécula intermediária, podendo assim resultar na formação de ácido sulfinico ou sulfenilo (GILES, G.I. *et al.*, 2001).

Os radicais livres têm diferentes tipos de mecanismos de reação, eles podem reagir com várias moléculas por: doação de elétrons, redução dos radicais ou aceitação de elétrons, oxidando os radicais; captando hidrogênios, através de reações de adição, auto-aniquilação e por desprotonação (SLATER, T.F., 1984).

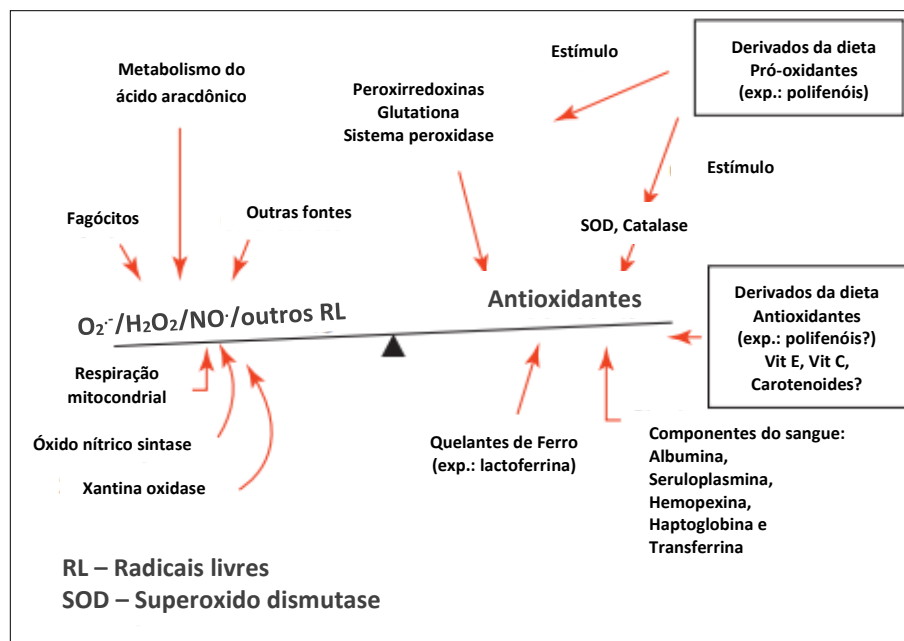
O equilíbrio entre a produção e a neutralização de radicais livres por antioxidantes é muito delicada, e se esse equilíbrio tende a sua superprodução, as células começam a sofrer as consequências do estresse oxidativo (WIERNSPERGER, N.F., 2003). Em seu trabalho Carochio (2013) evidencia que o desequilíbrio os produtos oxidantes e antioxidantes tem sido associado a muitas doenças graves como: doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose e acidente vascular cerebral, distúrbios neurológicos, distúrbios renais, distúrbios hepáticos, hipertensão, artrite reumatóide, síndrome de dificuldade respiratória do adulto, doenças de deficiência auto-imune, inflamação, distúrbios degenerativos associados ao envelhecimento, diabetes mellitus, complicações diabéticas, cataratas, obesidade, autismo, doença de Alzheimer, doenças de Parkinson e de Huntington, vasculite, glomerulonefrite, lúpus eritematoso, úlceras gástricas, hemocromatose e pré-eclâmpsia, entre outros.

3.5 ANTIOXIDANTES

Antioxidante é um antigo termo, que no início era aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais são capazes de reagir com radicais peroxil. Atualmente, este termo é frequentemente aplicado a todos os inibidores de radicais livres. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação (Figura 9) (LIMA, F.O., 2012). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies reativas (sistemas

de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA, K.B.F. *et al*, 2010).

Figura 9: O equilíbrio aproximado de antioxidantes e espécies reactivas in vivo. Adaptado a partir de Halliwell, B. (2008) com a permissão de Elsevier.



Fonte: Halliwell, B., 2000. Adaptado Ramos, B.A., 2017.

Os antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos ajudam o organismo a manter o equilíbrio entre os níveis de radicais livres, os não-enzimáticos, dão suporte a esse processo, visto que às vezes as respostas celulares não são suficientes.

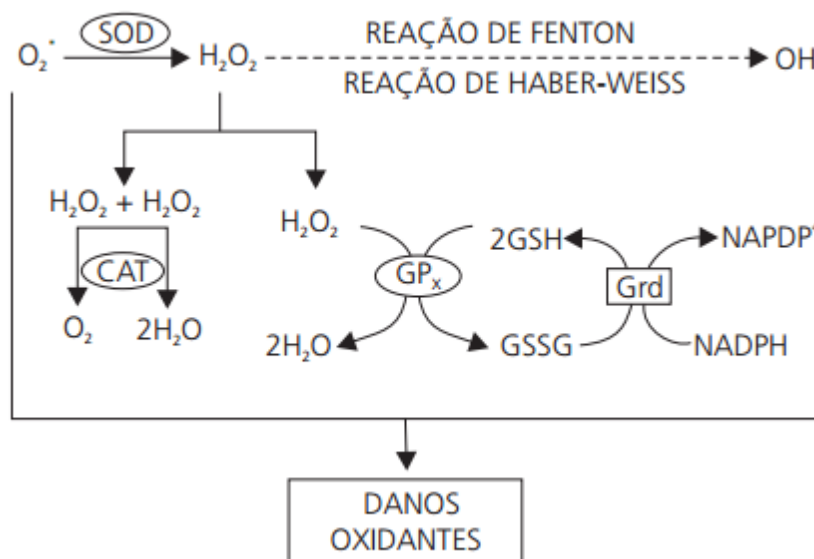
3.5.1 Enzimáticos

Os principais antioxidantes enzimáticos são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). A superóxido dismutase existe em duas formas (MnSOD mitocondrial e citoplasmática Cu-ZnSOD). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, na presença de próton H^+ . Esta reação é seguida por inativação do peróxido de hidrogênio pela catalase que converte H_2O_2 em água e oxigênio. A glutathione peroxidase, na presença de glutathione reduzida (GSH), também converte

H_2O_2 à água. As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio (BARBOSA, K.B.F. *et al.*, 2010).

Reação da GPx a glutatona reduzida é oxidado para a GSSG; GSH é regenerada a partir da GSSG pela enzima GR (Figura 10) Assim, a GPx merece atenção especial, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutatona, por meio do controle da relação entre glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (ROVER, Jr.L., 2001).

Figura 10: Integração dos sistemas de defesa enzimático. Nota: Por meio da reação de dismutação, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). As enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais.



Fonte: Rover, Jr.L., 2001.

A atividade da maioria das enzimas depende da participação de co-fatores enzimáticos, que são geralmente íons metálicos como, manganês, zinco e cobre. Deficiência nesses co-fatores pode alterar a atividade dessas enzimas.

3.5.2 Não-enzimáticos

Os principais antioxidantes não-enzimáticos são o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), a glutatona (GSH) e os flavonóides.

A vitamina E é um antioxidante eficiente que interrompe a peroxidação lipídica, doando hidrogênio aos radicais peroxil formando radicais tocoferoxil que, não são reativos e são incapazes de continuar a reação oxidativa em cadeia. A vitamina E é o único grande antioxidante lipossolúvel, encontrado no plasma, células e tecidos vermelhos, que protege a integridade das estruturas de lipídeos, principalmente membranas (CAROCHO, M., 2013).

O ácido ascórbico é uma molécula usada na hidroxilação de várias reações bioquímicas nas células. Em valores de pH normalmente encontrados no meio intracelular, o ácido ascórbico encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ascorbato. O ascorbato age indiretamente na desidratação de resíduos de prolina do colágeno. O colágeno, uma proteína estrutural fundamental, necessita ter determinados resíduos de prolina na forma hidroxiprolina para manter uma estrutura tridimensional correta (LEHNINGER, 2005). Por outro lado, o ácido ascórbico pode atuar como catalisador na reação de Fenton, promovendo a redução de íons férricos em íons ferrosos. Assim, o ácido ascórbico pode ser tanto um antioxidante, quanto um pró-oxidante dependendo das condições (LIMA, F.O., 2012).

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), que desempenha várias funções no organismo. O ácido ascórbico e GSH são os mais importantes antioxidantes solúveis em meio aquoso encontrados nos organismos vivos. A atividade antioxidante da glutathione é especialmente importante no cérebro, que contém níveis relativamente baixos de SOD, catalase e glutathione peroxidase. Neste caso, a alteração do metabolismo de GSH pode contribuir para patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (DENISOV, E.T., 2005).

Os flavonóides são um grupo de compostos antioxidantes compostas de flavonóis, flavanols, antocianinas, isoflavonóides, flavanonas e flavonas. As propriedades antioxidantes são conferidas pelos grupos hidroxila fenólicos ligados a estruturas do anel C e eles podem atuar como agentes redutores, os doadores de hidrogênio, desativadores de oxigênio singlete, varredores de radicais superóxido e ainda como agentes quelantes de metais. Alguns dos mais importantes são os flavonóides catequina, catequina galato, quercetina e campferol (CAROCHO, M., 2013).

3.6 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (BECKER, K., 2006). No Brasil representa um grande ônus sócio-econômico para as instituições em decorrência dos custos hospitalares e em relação ao paciente pelo prolongamento do período de afastamento de suas atividades profissionais e familiares (RHABAE *et al.*, 2000).

A Organização Mundial da Saúde recentemente categorizou bactérias resistentes a múltiplas drogas como uma das três principais ameaças à saúde humana (BASSETTI, M., *et al.*, 2011). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento dos pacientes, no qual requerem tratamento com fármacos de segunda e terceira geração, que podem ser menos efetivos, mais tóxicos ou mais caros (MARTINS, I.S., 1998).

As bactérias desenvolveram frente à exposição aos fármacos, enzimas inativadoras dos mesmos que promovem a transferência de agrupamentos químicos ou possuem atividade hidrolítica, como as conhecidas β -lactamases que clivam anéis β -lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas, desencadeando a perda da função antimicrobiana (WRIGHT, G.D., 2005). A impenetrabilidade ao antibiótico pode ser também aumentada pela diminuição de receptores de membrana para antibióticos e pela existência de proteínas específicas para a exportação de substâncias nocivas ao metabolismo celular, como as bombas de efluxo (CLOETE, T.E., 2003).

Cepas bacterianas podem se tornar resistente a um determinado antibiótico sem a necessidade de contato prévio com a droga. Existem diversos mecanismos de resistências já elucidados. Na resistência intrínseca algumas bactérias já possuem em seu DNA genes que codificam resistência a determinado antibiótico, podendo ser inativo, ativo ou induzido por exposição a alguma droga específica. Mutações gênicas espontâneas, induzidas ou recombinações podem resultar na expressão e multiplicação de um gene resistente (COHEN, F.L., 1997) e a através de mecanismos de transdução e conjugação, elementos conhecidos como plasmídeos (DNAs extracromossomais, circulares e pequenos com replicação autônoma, presentes no interior da célula bacteriana) e transposons (que são segmentos móveis especializados de DNA e que podem estar inseridos aleatoriamente em plasmídeos e/ou

cromossomos bacterianos) outras bactérias podem adquirir, essa carga genética externa conferindo um gene de resistência do qual não possuía (BERGER, B.B., 2006).

Além desses mecanismos as bactérias podem se aderir a dispositivos médicos implantados ou ao tecido. Essas bactérias envolvem-se em uma matriz de polissacarídeo e proteína, conhecida como um biofilme (COSTERTON, J.W., 1999). A formação de biofilme é importante porque este modo de crescimento está associado com infecções crônicas e subsequentes, devido a sua resistência inerente à quimioterapia antibiótica.

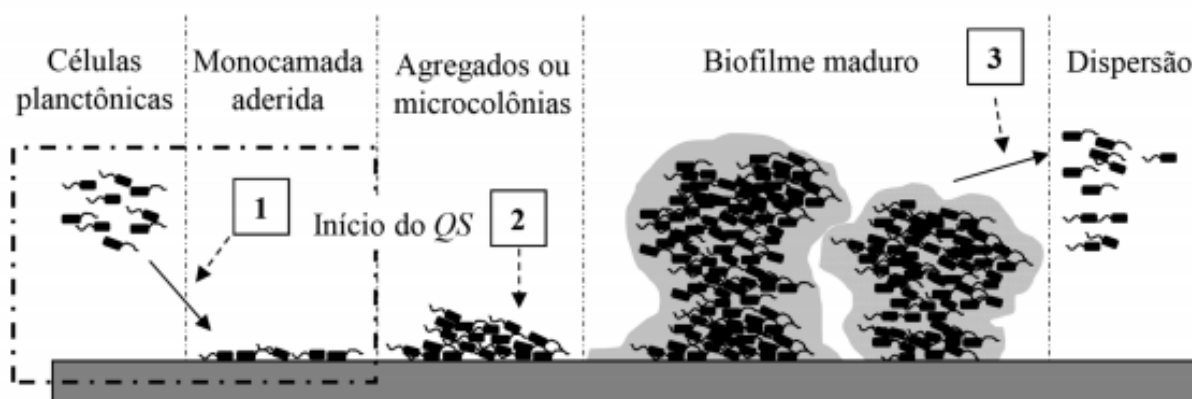
3.7 FORMAÇÃO DO BIOFILME

A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a estresses ambientais são características fundamentais dos microrganismos. As bactérias existem em dois estados de vida básicos: como células planctônicas, também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também conhecidas como biofilmes. As células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos territórios, enquanto que as células sésseis caracterizam a cronicidade (COSTERTON, J.W., *et al*, 1978).

Comunidades associadas à superfície protegem as bactérias contra predadores e do sistema imunológico, apoiar a divisão do trabalho, fornecer uma barreira física e estrutural contra estímulos mecânicos e físicos, e promover a conservação do genótipo. Estas comunidades podem ser persistentes e difíceis de remover uma vez formado, e esforços para compreender seu mecanismo de crescimento e homeostase (DUNNE JR. W.M., 2002). O processo de formação de biofilme é caracterizado por cinco etapas (Figura 11). No primeiro passo as células se fixam em superfícies de modo reversível. As bactérias utilizam uma variedade de organelas e proteínas extracelulares para detectar e fixar a superfícies, incluindo flagelos, pili, fímbrias, fibras Curli, e proteínas da membrana externa (BULLITT, E. *et al*, 1995, THOMAS, W.E. *et al*, 2004). No segundo passo as células se fixam em superfícies de forma irreversível. A secreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que consiste em DNA, proteínas, lipídeos, e lipopolissacarídeos que facilitam a adesão entre as células e as superfícies (FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. 2010). No passo seguinte as células adsorvidas em superfícies se replicam e crescem em microcolônias. Estas bactérias segregam EPS e tornam-se encapsuladas formando uma barreira física entre a comunidade e o meio ambiente extracelular. A composição de EPS varia entre as espécies e as condições de

crescimento, e comunicação química entre células na comunidade estimula a sua formação e secreção (BORLEE, B.R., *et al.*, 2010). O quorum sensing (QS) é o exemplo melhor caracterizado de comunicação química em bactérias. QS é um processo central na formação de biofilme e um mecanismo que as células usam para reconhecer seu ambiente extracelular. Esse processo modula uma variedade de funções celulares, incluindo a patogênese, a aquisição de nutrientes, conjugação, motilidade, e a produção de metabólitos secundários (HARMSEN, M., *et al.*, 2010). No quarto passo constituído agora por uma comunidade cresce numa estrutura tridimensional e amadurece como biofilme e o EPS acumula e resiste às tensões mecânicas e descolamento da comunidade a partir da superfície do substrato. Como quinto e último passo os biofilmes separam regiões de células e dispersam o fluido em grandes quantidades, onde eles podem adsorver sobre as superfícies e formam biofilmes em novos nichos ambientais (HALL-STOODLEY, L., *et al.*, 2004 e COSTERTON, J.W., *et al.*, 1987). Este passo é importante para a propagação e auto-renovação da comunidade.

Figura 11: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (etapa 1) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - Quorum sensing (etapa 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3).



Fonte: Adaptado de MACEDO; ABRAHAM (2009).

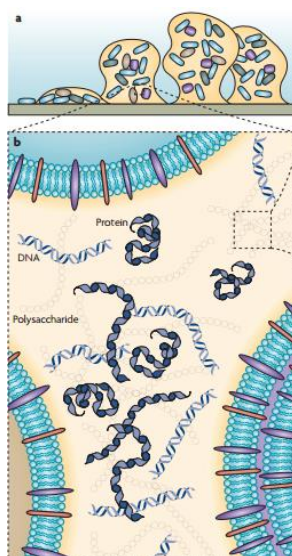
Biofilmes podem envolver apenas uma ou diferentes espécies microbianas. No caso de uma infecção multiespécie, algumas espécies apenas desempenham o papel de favorecer a virulência e a organização estrutural do biofilme, o que protege e permite a sobrevivência das demais espécies envolvidas, que, por sua vez, participam ativamente da infecção (BURMOLLE, *et al.*, 2010). Considerando o modo como pode ser alcançada a inibição da

formação de biofilmes, duas grandes classificações podem ser feitas: através da inibição do crescimento bacteriano, pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, através do bloqueio da adesão bacteriana e, consequentemente, da formação de biofilme por uma via que não envolve a morte.

3.8 A MATRIZ DO BIOFILME

Na maioria dos biofilmes, os microorganismos são responsáveis por menos de 10% da massa seca, enquanto que a matriz pode ser responsável por mais de 90%. A matriz é o material extracelular, principalmente produzido pelos próprios organismos, em que as células do biofilme são incorporadas. É constituída por um conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros - conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) - que forma a armação para a arquitetura tridimensional do biofilme e é responsável pela adesão a superfícies e para a coesão no biofilme (Figura 12). Várias funções de EPS já são conhecidas como: adesão, agregação de células bacterianas, coesão do biofilme, retenção de água, barreira protetora, absorção de íons inorgânicos, fonte de nutrientes, troca de informações genéticas, aceitor e doador e de elétrons, exportação e componentes celulares, retirar o excesso de nutrientes, armazenar enzimas (FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. 2010).

Figura 12: Os principais componentes da matriz - polissacarídeos, proteínas e DNA - são distribuídas entre as células num padrão não homogêneo, definindo-se diferenças entre as regiões da matriz.



Fonte: FLEMMING, H.C. E WINGENDER, J. 2010.

Alguns EPS, principalmente as cápsulas, estão associados de forma mais estreita com as superfícies celulares do que outros. A formação e manutenção de comunidades microbianas multicelulares estruturadas depende essencialmente da produção e quantidade de EPS (SUTHERLAND, I.W. 2001). A arquitetura dos biofilmes é influenciada por muitos fatores, incluindo as condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade bacteriana e a comunicação intercelular, bem como exopolissacarídeos e proteínas, no qual foi demonstrado pela morfologia alterada de biofilmes produzidos por mutantes sem componentes de EPS (FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. 2010).

Os polissacarídeos são uma grande fração da matriz EPS (FRØLUND, B. *et al.*, 1996). A maioria são moléculas longas, lineares ou ramificadas com uma massa molecular de $0,5 \times 10^6$ daltons a 2×10^6 daltons. Vários exopolissacarídeos são homopolissacarídeos, incluindo os glucanos derivados de sacarose e frutanos produzidos pelos estreptococos em biofilmes orais, e celulose formada por *Gluconacetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp. e várias espécies de famílias Enterobacteriaceae (ZOGAJ, X. *et al.*, 2001) e Pseudomonadaceae (GÖTZ, F. 2002).

Muitos polissacarídeos são heteropolissacarídeos que consistem de uma mistura de resíduos de açúcares neutros e carregados. Eles podem conter substituintes orgânicos ou inorgânicos que afetam grandemente as suas propriedades físicas e biológicas. Exopolissacarídeos policatiônicos também existem tais como adesina intercelular, que é composto de β -1,6-ligada N-acetilglucosamina com resíduos parcialmente desacetilado. Esta adesina foi descoberta em importantes agentes patogênicos nosocomiais tais como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, que podem colonizar implantes médicos e conduzir a infecções relacionadas com o biofilme (GÖTZ, F. 2002), e desde então foi detectado em uma gama de outras bactérias (JEFFERSON, K.K. 2009). Em muitas bactérias, exopolissacarídeos são indispensáveis para a formação de biofilme e mutantes que não pode sintetizar exopolissacarídeos são severamente comprometidos ou incapazes de formar biofilmes maduros (DANESE, P. N. 2000; MA, L. *et al.*, 2009).

A matriz do biofilme pode conter quantidades consideráveis de proteínas que, em conjunto, podem exceder em muito o teor de polissacarídeos. Várias enzimas extracelulares foram detectadas em biofilmes, muitos dos quais estão envolvidas na degradação de biopolímeros. A presença de enzimas que degradam componentes EPS torna a matriz um sistema digestivo que se decompõe biopolímeros para produtos de baixa massa molecular, que pode, então, ser absorvidos e utilizados como fontes de carbono e de energia. As proteínas não

enzimáticas da matriz, tais como as proteínas de ligação a carboidratos de superfície celular associada a extracelulares (chamadas lectinas), estão envolvidas na formação e estabilização da rede de matriz de polissacarídeo e constituem uma ligação entre a superfície bacteriana e EPS extracelulares (FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. 2010). Outro grupo de proteínas extracelulares são as proteínas de superfície associadas ao biofilme de (BAP) de *S. aureus* e as proteínas BAP-like. Estas são proteínas de elevado peso molecular sobre a superfície das células bacterianas que promovem a formação de biofilme em várias espécies bacterianas (LASA, I.; PENADÉS, J. R. 2006). Elas são necessárias para a formação de um biofilme e desempenham um papel em processos infecciosos bacterianos. Por último, apêndices protéicos, tais como os pili, fímbrias e flagelos também podem agir como elementos estruturais através da interação com outros componentes da matriz EPS do biofilme.

Também são encontrados eDNA em biofilmes de diferentes origens, embora a quantidade produzida pode variar mesmo entre espécies estreitamente relacionadas. eDNA é um componente estrutural importante na matriz do biofilme de *S. aureus* (IZANO, E.A. 2008). Lipídeos encontrados na matriz são cruciais para a aderência (CONRAD, A. *et al*, 2003). EPS tensoativos incluem surfactina, viscosin e emulsano, que pode dispersar substâncias hidrofóbicas e torná-los biodisponível.

Ainda assim, de todos os componentes a água é de longe o maior deles. A matriz EPS fornece um ambiente altamente hidratado que seca mais lentamente do que os seus arredores e, portanto, isola as células de biofilme contra variações de água do meio (OR, D, *et al*, 2007).

3.9 *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

O gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, que formam arranjos semelhantes a "cachos de uva", são anaeróbios facultativos, e sensíveis à enzima lisostafina (HUBER; HUBER, 1989). A *S. aureus* é o patógeno humano mais importante deste gênero, composto de 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (CHESNEAU *et al.*, 1993, HAJEK, 1992). São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de uma grande parte de mamíferos (GIAMMARINARO *et al.*, 2005). *Staphylococcus aureus* é um simbiote comensal um patógeno oportunista. Uma vez que *S. aureus* invade tecidos do hospedeiro, ela pode desencadear doenças agudas e crônicas, como a bacteremia, septicemia, endocardite e síndrome do choque tóxico.

Durante a fase inicial de crescimento, a *S. aureus* produz fatores que facilitam a integração do tecido e a evasão do sistema imunitário do hospedeiro que permite que as bactérias se acumulem e formem um biofilme associado (KONG *et al.*, 2006). Uma vez que atinge a fase exponencial começa a segregar um espectro de exoproteínas, incluindo proteases, hemolisinas, antígenos, e, ao mesmo tempo, regula negativamente os fatores associados a parede celular, que conduz à dispersão do biofilme e a propagação da infecção (DINGES *et al.*, 2000). Esta bactéria possui vários fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade de produzir doença. Entretanto, essas propriedades, e genotipicidade não são constantes em todas as cepas de *S. aureus*. Os principais fatores de virulência são: cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, hemolisinas, enzimas, toxinas extracelulares e leucocidinas (KONEMAN *et al.*, 2001). As toxinas estafilocócicas também são responsáveis pela necrose epidérmica tóxica (síndrome estafilocócica da pele escaldada), síndrome do choque tóxico (RIFAI *et al.*, 1989, SEE *et al.*, 1989) e intoxicação de origem alimentar (OSTRO *et al.*, 2002).

A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios. *S. aureus* possui três mecanismos distintos de resistência à meticilina: a) hiperprodução de beta-lactamases; b) presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP protein binding penicilin) alterada denominada PBP2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos meticilina a todos os antibióticos beta-lactâmicos (CHAMBERS, 1997).

Desde a década de 1970, estafilococos meticilina resistentes tornaram-se a principal causa de infecções hospitalares no mundo. A vancomicina era o único antibiótico efetivo contra os mesmos, mas, em 1997, foram descritos *S. aureus* com resistência à vancomicina e à teicoplanina. Tais estafilococos receberam a sigla VISA (*S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina) e atualmente são denominados simplesmente de VRSA (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*). Seu mecanismo de resistência está associado a uma ativação da síntese da parede celular. Em virtude da produção elevada de componentes da

parede celular (resíduos de mucopeptídeo) que reduzem a quantidade de antibiótico que chega ao seu local de ação (membrana citoplasmática) (BOYLE-VAVRA *et al.*, 2001), ocorre hiperprodução das proteínas ligadoras de penicilinas PBP2 e PBP2', espessamento da parede celular e aprisionamento das drogas.

Pesquisas laboratoriais foram desenvolvidas com o fim de se obter cefalosporinas que fossem resistentes à inativação por beta-lactamases, que apresentassem ação contra bactérias gram-negativas e que tivessem elevada potência contra os gram-positivos, especialmente contra os estafilococos. A obtenção de substâncias com estas características deu origem às cefalosporinas de quarta geração. A cefpiroma é o primeiro representante do grupo (TAVARES, 2002). A cefpiroma é bastante ativa contra os cocos gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* sensíveis e resistentes à penicilina, entretanto é pouco ativa contra os estafilococos metilina resistentes.

Biofilmes de *Staphylococcus aureus* crescem constituindo uma densa camada de células com uma matriz elaborada abrigando vários tipos de polímeros. Formação e maturação de biofilme em *S. aureus* é dependente da interação entre vários reguladores, incluindo aqueles codificados por *sarA*, *agr*, *ica*, e *sigB* (CUE, D., *et al.*, 2009, LAUDERDALE, K.J. *et al.*, 2009, TAMBER, S. *et al.*, 2009).

Esses biofilmes contêm polímero de poli-N-acetil glucosamina (PNAG), que é também referido como polissacárido de adesão intercelular (PIA), e é sintetizado por enzimas codificadas na *ica*-operon (O'GARA J.P., 2007). Além do PIA, as BAP proteínas também estão envolvidos na formação do biofilme em várias estirpes (LASA, I. *et al.*, 2006, LATASA, C. *et al.*, 2006, CUCARELLA, C. *et al.*, 2001). Outro sistema quorum sensing é o regulador de acessório de genes mediado por peptídeo (AGR), que consiste de um operon que contém quatro genes (*agrBDCA*) (RIEDEL C.U. *et al.*, 2009, RIEU, A. *et al.*, 2007).

Como os biofilmes são muito difíceis de erradicar, a capacidade das bactérias para formar biofilmes representa um grande problema em vários cenários industriais e medicinais, sendo uma fonte persistente de contaminação (re) e/ou infecção, respectivamente. De acordo com Souza, M.V., *et al.* (2005), torna-se necessário, além do uso de altas concentrações do antibiótico para superar o mecanismo de inativação que o microorganismo dispõe e uso da associação de antibióticos, e principalmente o desenvolvimento de novos antimicrobianos que não sofram ação dos mecanismos de resistência dos microorganismos.

4 CONCLUSÃO

- Através do perfil fitoquímico foi possível observar que os principais componentes dos extratos das folhas são compostos fenólicos. Dentre eles o principal composto do extrato AcEtA foi o ácido gálico, do extrato MeOH foi o ácido elágico, porém do extrato AHaq não foi possível determinar o majoritário, sabendo-se somente que este extrato possui quantidades razoáveis de compostos fenólicos no geral.
- Os extratos das folhas da *Anacardium humile*, foram eficazes nos testes antioxidants in vitro, especialmente o extrato metanólico, no qual não apresentou diferença significativa com a maioria dos padrões testados.
- Através da avaliação da Toxicidade aguda oral, observou-se que o extrato metanólico não possui toxicidade *in vivo*, na maior dose que foi de 2000mg/Kg.
- Nos testes *in vivo*, foi possível confirmar a eficácia do extrato metanólico, visto que os níveis dos parâmetros hepáticos diminuíram significativamente quando comparados com o grupo intoxicado por Tetracloreto de Carbono.
- O extrato aquoso não possui atividade antimicrobiana frente as cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes testadas, porém novamente os extratos AcEtA e MeOH foram promissores nesta atividade.
- Na atividade antibiofilme, os extratos MeOH e AHaq foram mais promissores que o extrato AcEtA, diminuindo a aderência do biofilme das cepas de *S. aureus*.
- Na Microscopia eletrônica de varredura foi possível evidenciar a diminuição da aderência do biofilme, comprovando assim a eficácia dos extratos na anti-formação do biofilme.

REFERÊNCIAS

- ABE, I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. **Natural Product Reports**. 24: 1311-1331, 2007.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; VIEIRA, R.F., BIZZO, H.R.; SILVEIRA, D.; GIMENES, M.A. **Secondary Metabolites**. Chromatography and Its Applications, Edited by Sasikumar Dhanarasu. ISBN 978-953-51-0357-8, 2012.
- ANACARDIACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15463>>. Acesso em: 17 Set. 2016.
- ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 66(1): 1-9, 2007.
- ARAÚJO, E.E.; CASTRO, C.C; ALBUQUERQUE, U.P. Dynamics of Brazilian caatinga – A review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and Communities**.1: 15-28, 2007.
- AUGUSTIN, J.M., KUZINA, V., ANDERSEN, S.B. E BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**. 72: 435-457, 2011.
- BAKKALI, A.B.F., AVERBECK, A.S., AVERBECK, A.D., IDAOMAR, B.M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 446–47, 2008.
- BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, Campinas. 23(4):629-643, 2010.
- BASSETTI, M., GINOCCHIO, F., MIKULSKA, M. New treatment options against Gram-negative organisms. **Crit. Care**, 15:215, 2011.
- BECKER, K., HU, Y., BILLER-ANDORNO, N. Infectious diseases: a global challenge. **Int J Med Microbiol**, 296(4/5):179-85, 2006.
- BENCKE, G.A.; MAURICIO, G.N.; DEVELEY, P.F. E GOERCK, J.M. **Áreas importantes para a conservação das aves no Brasil: parte 1** – estados do domínio da Mata Atlântica. São Paulo, SAVE Brasil. 2006.

BERGER, B.B., MCCALLUM, N. State of the knowledge of bacterial resistance. **Injury**, 37(2):20-25, 2006.

BORLEE, B.R., GOLDMAN, A.D., MURAKAMI, K., SAMUDRALA, R., WOZNIAK, D.J., PARSEK, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. **Mol. Microbiol.** 75(4):827, 2010.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of Plant Age, Genotype and Herbivory on *Plantago* Performance and Chemistry. **Ecology**. 74(6): 1778-1791, 1993.

BOYLE-VAVRA, S., LABISCHINSKI, H., EBERT, C.C., EHLERT, K., DAUM, R.S. A spectrum of changes occurs in peptido glycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** 45: 280-287, 2001.

BRASIL. 2002. **MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA**. Decreto de 13 de dezembro de 2002. Criação do Parque Nacional do Catimbau. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/dnn/2002/Dnn9771.htm> Acesso em: 20 de setembro de 2016.

BRIELMANN, H.R., SETZER, W.N., KAUFMAN, P.B., KIRAKOSYAN, A. E CSEKE, L.J. **Phytochemicals: The Chemical Components of Plants, In: Natural Products from Plants** (2ed), p.1-50, CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-0-8493-2976-0, 2006.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**. 9: 1551-1558, 1995.

BULLITT, E., MAKOWSKI, L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. **Nature**. 373: 6510-6164, 1995.

BURMOLLE, M. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 59: 324-36, 2010.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**. 51: 15–25, 2013.

CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clin Microbiol Ver.** 1, 173-186, 1988.

CHESNEAU, O., MORVAN, A., GRIMONT, F., LABISCHINSKI, H., ELSOLH, N. *Staphylococcus pasteurii* sp. Nov. Isolated from human, animal, and food specimens. **Int J Syst Bacteriol.** 43:237-44, 1993.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **Int Biodeter Biodegradation**, 51(4):277-82, 2003.

COHEN, F.L., Tartasky, D. Microbial resistance to drug therapy: a review. **Am J Infect Control**, 25(1):51-64, 1997.

CONRAD, A. Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. **Lipids**, 38, 1093–1105, 2003.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPINSCOTT, H.M. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 41:435, 1987.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**; 284: 1318–22, 1999.

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G., CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**. 238: 86-95. 1978.

CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I., PENADES, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J Bacteriol.** 183:2888-2896, 2001.

CUE, D., LEI, M.G., LUONG, T.T., KUECHENMEISTER, L., DUNMAN, P.M., O'DONNELL, S., ROWE, S., O'GARA, J.P., LEE, C.Y. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. **J Bacteriol.** 191:6363-6373, 2009.

DANESE, P. N., PRATT, L. A. E KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **J. Bacteriol.** 182, 3593–3596, 2000.

DENISOV, E.T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 1981, 2005.

DINGES, M.M., ORWIN, P.M., AND SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.** 13, 16–34, 2000.

DUNNE, JR.W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev.** 15(2): 155, 2002.

FERREIRA, I.C.F.R., BARROS, L., ABREU, R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. **Curr. Med. Chem.** 16: 1543–1560, 2009.

FERREIRA, P.R.B., MENDES, C.S.O., RODRIGUES, C.G., ROCHA, J.C.M., ROYO, V.A., VALÉRIO, H.M., OLIVEIRA, D.A. Antimicrobial activity tannin-rich fraction from leaves of *Anacardium humile*. **Ciência Rural**. 10: 1861-1864, 2012.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews – Microbiology**. 8: 623-633. 2010.

FLORA, S.J.S., Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and mettaloid exposure. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2: 191–206, 2009.

FRØLUND, B., PALMGREN, R., KEIDING, K. E NIELSEN, P.H. Extraction of extracellular polymers from activatedsludge using a cation exchange resin. **Water Res.** 30,1749–1758, 1996.

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

GIAMMARINARO, P., LEROY, S., CHACORNAC, J.P., DELMAS, J., TALON, R. Developementof a new oligonucleotide arrayto identify *Staphylococcal strains* at species level. **J Clin Microbiol**. 43:3673-80, 2005.

GILES, G.I., TASKER, K.M., JACOB, C. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** 31: 1279–1283, 2001.

GIULIETTI, A.M., SILVA, J.M.C., TABARELLI, M., FONSECA M.T. E LINS L.V. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.** p.48-90. Ministério do MeioAmbiente, Brasília, 2004.

GOBBO-NETO, L. E LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**. 30(2): 374-381, 2007.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol. Microbiol.** 43, 1367–1378, 2002.

HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **Int J Syst Bacteriol.** 26: 401-8, 1992.

HALLIWELL, B. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? **Free Radic. Rev.** 33: 819–830, 2000.

HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. Rev. Microbiol.** 2(2):95, 2004.

HARBORNE, J.B., BAXTER, H., MOSS, G.P. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants. 2ed. London: **Taylor & Francis**; 1999.

HARMSSEN, M., YANG, L., PAMP, S.J., TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 59(3): 253, 2010.

HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem Toxicol.** 37(9/10): 937-942, 1999.

HUBER, M.M, HUBER, T.W. Susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to lysostaphin. **J Clin Microbiol.** 27:1122-1124, 1989.

IZANO, E. A., AMARANTE, M. A., KHER, W. B. E KAPLAN, J.B. Differential roles of poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 470–476, 2008.

JEFFERSON, K.K. **Bacterial Polysaccharides.** Current Innovations and Future Trends p.175–186, Norfolk, UK, 2009.

KARATAN, E. E WATNIK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 73, 310–347, 2009.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido.** 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KONG, K.F., VUONG, C., E OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **Int. J. Med. Microbiol.** 296, 133–139, 2006.

KURAMOTO, M., ARIMOTO, H., UEMURA, D. Bioactive Alkaloids from the Sea: A Review. **Marine Drugs**. 2:39-54, 2004.

LASA, I., PENADES, J.R.: Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Res Microbiol** , 157: 99-107, 2006.

LATASA, C., SOLANO, C., PENADES, J.R., LASA, I.: Biofilm-associated proteins. **C R Biol**. 329:849-857, 2006.

LAUDERDALE, K.J., BOLES, B.R., CHEUNG, A.L., HORSWILL, A.R. Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **Infect Immun**, 77:1623-1635, 2009.

LEAL, I.R., SILVA, J.M.C., TABARELLI, M. LACHER JR, T.E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**. 1(1): 139-146. 2005.

LEAL, I.R., TABARELLI, M.E SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003.

LEE, S.J., UMANO, K., SHIBAMOTO, T., LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem**. 91(1): 131-137, 2005.

LEHNINGER, L.A. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2005.

LIMA, D.A. Estudos **Fitogeográficos de Pernambuco**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, 4: 243-274, 2007.

LIMA, F.O., BEZERRA, A.S. **Flavonoids and Free Radicals**. Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria. 13(1): 111-124, 2012.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum**. 1: 383. 1753.

LOBO, V., PHATAK, A., CHANDRA, N., Free radicals and functional foods: impact on human health. **Pharmacogn. Rev**. 4: 118–126, 2010.

LOWY, F.D. Medical progress — *Staphylococcus aureus* infections. **N. Engl. J. Med**. 339, 520–532, 1998.

LUIZ-FERREIRA, A., ALMEIDA, A.C.A., COLA, M., BARBASTEFANO, V., ALMEIDA, A.B.A., BATISTA, L.M., FARIAS-SILVA, E., PELLIZZON, C.H., HIRUMA-LIMA, C.A., SANTOS, L.C., VILGAS, W., BRITO, A.R.M.S. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on Ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Molecules**, 15:7153-7166, 2010.

MA, L. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathog.** 5, 2009.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**. 5: 517-528, 2009.

MARTINS I.S., NOGUEIRA, I.A., CONCEIÇÃO, M. Recomendações para o uso adequado de antimicrobianos. **Rio de Janeiro: Secretária de Estado de Saúde**; 1998. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/Docs/cecih/Antimicrobianos.doc>. Acesso em: 17 de julho de 2016.

MEYDANI, S.N., HAYTEK, M. Vitamin E and the immune response. Biomedical Publ, St. Johns, **New found land**, p105-128. 1992.

MMA. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento, **Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, EMBRAPA/Semi-Árido**. Brasília: MMA/SBF, 2002.

MMA, ICMBio. Unidades de conservação da Caatinga. **Instituto Chico Mendes**. 2017: Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2017.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A**. 1054(1/2): 95-111, 2004.

NIMER, E. **Climatologia do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação IBGE – SUPREN. Recursos Naturais e Meio Ambiente. 4, 1979.

O’GARA J.P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett**. 270: 179-188, 2007.

OLIVEIRA, J.A., GONÇALVES, P.R. E BONVICINO, C.R. **Mamíferos da Caatinga. Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. p275-333, 2003.

OR, D., PHUTANE, S. E DECHESNE, A. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils. **Vadose Zone J.** 6, 298–305 (2007).

OSTRÓ, A., GONDOL, J., HOLECKOVÁ, B., HOLODA, E., KALINÁCOVÁ, V., BERGDOLL, M.S. Occurrence and characteristics of staphylococcal enterotoxin antibodies in gynecologic patients. **Ceska Gynekol.** 67(4): 210-5, 2002.

PENNINGTON, R.T., LAVIN, M., PRADO, D.E., PENDRY, C.A., PELL, S.K. E BUTTERWORTH, C.A. Historical climate change and speciation: Neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London.** 359: 515-538, 2004.

PORTO, K.R.A., ROEL, A.R., SILVA, M.M., COELHO, R.M., SCHELEDER, J.D., JELLER, A.H. Atividade larvívica do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Rev Socie Bras de Med Trop.** 41(6): 586-589, 2008.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. Ecologia e conservação da Caatinga. **Editora Universitária**, Recife, Brasil. p3-73, 2003.

RABHAE, G.N., RIBEIRO, F.N., FERNANDES, A.T. Infecção do sítio cirúrgico. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. **Atheneu**, 479-505, 2000.

RIEDEL, C.U., MONK, I.R., CASEY, P.G., WAIDMANN, M.S., GAHAN, C.G., HILL, C. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Mol Microbiol.** 71: 1177-1189, 2009.

RIEU, A., WEIDMANN, S., GARMYN, D., PIVETEAU, P., GUZZO, J. Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. **Appl Environ Microbiol**, 2007, 73: 6125-6133.

RIFAI, S., BARBANCON, V., PREVOST, G., WEBB, C.D. Synthetic exfoliative toxin A and B DNA probes for detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **J Clin Microbiol.** 1989; 27: 504-6

ROBERTS, M.F. E WINK, M. **Introduction, In: Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications**, p. 1-6, Plenum Press, ISBN 0-306- 45465-3, New York, 1998.

RODAL, M.J.N. ANDRADE, K.V.S.A.; SALES, M.F. E GOMES, A.P.S. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetal no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia**, 58: 517-526, 1998.

ROSA, R.S., MENEZES, N.A., BRITSKI, H.A., COSTA W.J.E.M., E GROTH, F. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. Ecologia e conservação da Caatinga. **Editora Universitária**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. p135-180, 2003.

ROVER, JR.L., HOEHR, N.F., VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova**. 24(1): 112-9, 2001.

ROZE, L.V., CHANDA, A. E LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, Vol. 48, p. 35–48, 2011.

SAINT-HILAIRE, A.F.C.P. Ann. Sci. Nat. (Paris), 23: 272, Obra **Original Flora Brasiliensis**, vol. 12, part. 2, tab. 88, 1831.

SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**. 10(10): 308-13, 2004.

SEE, R.H., ADILMAN, S., BARTLETT, K.H., CHOW, A.W. Colony immunoblot assay for the detection of staphylococcal toxins: drometoxin (TSST-1) with anti-TSST-1E(ab')₂ fragments. **J Clin Microbiol**. 27:2050-2053, 1989.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 32(1): 67-103, 1992.

SHAHIDI, F., NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic; 1995.

SILVA, J.M.C., SOUZA, M.A., BIEBER, A.G.D. E CARLOS, C.J. Avesda Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. Ecologia e conservação da Caatinga. **Editora Universitária**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. p237-273, 2003.

SILVA-LUZ, C.L., PIRANI, J.R. **Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15463>>. Acesso em: 02 de Junho 2016.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Alcoloides: generalidades e aspectos básicos. **Farmacologia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 305 – 315.

SLATER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.** 222: 1–15, 1984.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr.** 15(1): 71-81, 2002.

SOUZA, M.V., REIS, C. E PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical.** 34(1):27-36, 2005.

SQUADRITO, G.L., PRYOR, W.A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. **Free Radic. Biol. Med.** 25: 392– 403, 1998.

SUMMONS, R.E.; BRADLEY, A.S.; JAHNKE, L.L.; WALDBAUER, J.R. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.** 361: 951-968, 2006.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol.** 9, 222–227 (2001).

TABARELLI, M. E VICENTE, A. Conhecimento sobre plantas lenhosas da Caatinga: lacunas geográficas e ecológicas. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília. p101-111, 2004.

TAMBER, S., CHEUNG, A.L. *SarZ* promotes the expression of virulence factors and represses biofilm formation by modulating SarA and *agr* in *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun.** 77: 419-428, 2009.

TANTILLO, D.J. Biosynthesis via carbocations: Theoretical studies on terpene formation. **Natural Product Reports.** 28: 1035-1053, 2011.

TAVARES W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**, 3ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

THE NATURE CONSERVANCY DO BRASIL E ASSOCIAÇÃO CAATINGA. As unidades de conservação do bioma Caatinga. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília. p295-300, 2004.

THE PLANT LIST: A working list of all plants species, Anacardiaceae.

Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Anacardiaceae/>> Acesso em: 2 de junho de 2016.

THOMAS, W.E., NILSSON, L.M., FORERO, M., SOKURENKO, E.V., VOGEL, V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 53(5):1545, 2004.

TOMASZ, A., DRUGEON, H.B., LENCASTRE, H.M., JABES, D., MCDOUGAL, L., BILLE, J. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrob Agents Chemother**, 33: 1869-1874, 1989.

TRENTIN, D.S., GIORDANI, R.B. E MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. 14(22): 113-238, 2013.

URZÊDA, M.A., MARCUSSI, S., PEREIRA, L.L.S., FRANÇA, S.C., PEREIRA, A.M.S., PEREIRA, P.S., SILVA, S.L., GUIMARÃES, C.L.S., CALDERON, L.A., STÁBELI, R.G., SOARES, A.M., COUTO, L.B. Evaluation of the hypoglycemic properties of *Anacardium humile* aqueous extracts. **Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

VETTER, W. E SCHRÖDER, M. Phytanic acid—a tetramethyl branched fatty acid in food. **Lipid Technology**. 23: 175-178. 2011.

WIERNSPERGER, N.F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. **Diabetes Metab**. 29: 579–585, 2003.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev**, 57(10):1451-1470, 2005.

ZANELLA, F.C.V. E MARTINS, C.F. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. Ecologia e conservação da Caatinga. **Editora Universitária**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. p.75-134, 2003.

ZOGAJ, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. E RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Mol. Microbiol**. 39, 1452–1463, 2001.

ANEXO A – Artigo 1

Artigo a ser enviado para revista Food and Chemical Toxicology. ISSN: **0278-6915**

Normas de submissão da revista: <https://www.elsevier.com/journals/food-and-chemical-toxicology/0278-6915/guide-for-authors>

Efeito antioxidante *in vitro* e atividade hepatoprotetora das folhas de *Anacardium humile* St. Hil (ANACARDIACEAE) da Caatinga de Pernambuco, Brasil.

Bárbara de Azevedo Ramos¹, babi.a.ramos@gmail.com

Maria de Fátima Rodrigues², fatima_rlrs@hotmail.com

Marília Martins Manta¹, liloka.manta@gmail.com

Maria Cecília Lima Vieira de Melo¹, ceci_lvm@hotmail.com

José Adelson do Nascimento Júnior¹, juniior.aalves@live.com

Wolfgang Harand³, wolfgang.harand@insa.gov.br

Alexandre Gomes da Silva³, agsilva@live.com

Márcia Vanusa da Silva¹, marciavanusa@yahoo.com.br

Rafael Matos Ximenes², ximenesrm@gmail.com

Maria Tereza dos Santos Correia¹, mtscorreia@gmail.com

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

³Instituto Nacional do Semiárido, INSA, Campina Grande – PB.

RESUMO

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo, porém o excesso dessas substâncias apresenta diversos efeitos deletérios ao DNA, proteínas e organelas, assim estando diretamente envolvidos com diversas doenças. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante de folhas de *A. humile*, através de métodos *in vitro* e *in vivo*, através da atividade hepatoprotetora, bem como identificar quais os compostos responsáveis por tais atividades. Foram utilizadas folhas de *A. humile* A. St.-Hil coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque, Pernambuco, seguido de extração à quente em sohxlet, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: N-hexano (AhN), clorofórmio (AhC), acetato de etila (AhE) e metanol (AhM). Para o extrato bruto (AhW) o material foi extraído por sonicação em água destilada. O perfil fitoquímico foi determinado através das quantificações de fenóis e flavonóides e em cromatografia líquida de alta eficiência. Os métodos *in vitro* foram o DPPH, ABTS, ATT, FRAP e Peroxidação lipídica e a avaliação da atividade antioxidante *in vivo* foi determinada através do modelo de hepatotoxicidade induzido por Tetracloreto de carbono em camundongos, e então avaliados os parâmetros bioquímicos séricos, os níveis enzimáticos e a peroxidação lipídica. O potencial antioxidante dos extratos das folhas de *A. humile* se deve aos compostos identificados, principalmente os majoritários, sendo o ácido gálico o do extrato AhE, e o ácido elágico o composto do extrato AhM, no qual são compostos já bem descritos na literatura por suas várias funções, incluindo antioxidantes. O teste de toxicidade oral mostrou que os extratos das folhas de Cajuí não apresentam toxicidade ao organismo vivo. Os resultados obtidos nos testes de hepatoproteção comprovam o potencial antioxidante do extrato por diminuir os danos oxidativos causado pelo tetracloreto de carbono. O reestabelecimento das enzimas hepáticas e a redução da peroxidação lipídica comprovam a importância dos compostos presentes na folha da *Anacardium humile*.

Palavras-chave: Antioxidante, Hepatoprotetor, *Anacardium humile*, Compostos fenólicos

INTRODUÇÃO

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo, estando envolvidos em processos fisiológicos naturais como a produção de energia, a fagocitose, o crescimento celular, a sinalização intracelular e a síntese de substâncias biológicas importantes, porém o excesso dessas substâncias apresenta diversos efeitos deletérios ao DNA, proteínas e organelas, assim estando diretamente envolvidos com diversas doenças (Alves e David, 2010) como, câncer, aterosclerose, diabetes, úlceras gástricas, doenças cardiovasculares e muitas outras (Murphy, 2009). Antioxidante é um antigo termo, que no início era aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais são capazes de reagir com radicais peroxil. Atualmente, este termo é frequentemente aplicado a todos os inibidores de radicais livres. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem atrasar ou inibir as taxas de oxidação (Lima, F.O., 2012). Os principais antioxidantes enzimáticos são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). Os principais antioxidantes não-enzimáticos são o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione (GSH) e os compostos fenólicos, como os flavonóides. Os flavonóides são um grupo de compostos antioxidantes com propriedades antioxidantes conferidos pelos grupos hidroxila fenólicos ligados a estruturas do anel C e eles podem atuar como agentes redutores, os doadores de hidrogênio, desativadores de oxigênio singlete, varredores de radicais superóxido e ainda como agentes quelantes de metais. Alguns dos mais importantes são os flavonóides catequina, catequina galato, quercetina e campferol (Carocho, M., 2013).

Extratos a partir de solventes orgânicos de diferentes tecidos vegetais vêm sendo amplamente investigados por suas propriedades farmacológicas (Paiva, 2010). *Anacardium humile* St. Hil (Anacardiaceae), também conhecido como cajuzinho-do-cerrado é uma planta arbustiva nativa do Brasil, sendo uma espécie encontrada com frequência no cerrado e no pantanal do Mato Grosso do Sul (Carvalho, 2005). O gênero *Anacardium* inclui 20 espécies aceitas, porém são indicadas em torno de 39 espécies (The Plant List, 2010). No Brasil são encontradas, 9 espécies, sendo 3 delas endêmicas. As espécies dessa família tem se mostrado promissoras na busca de compostos bioativos, comportando o maior número de investigações, principalmente quanto aos seus constituintes metabólicos. Dentre esses constituintes os compostos fenólicos e catecólicos, ou terpenos, flavonoides, entre outros metabólitos (Correia, 2006). Vários estudos ao longo dos anos vêm buscando as propriedades medicinais da *A. humile*, dentre eles essa espécie se destaca pelas propriedades: antilarvicida sobre o mosquito

Aedes aegypti do seu óleo (Porto, *et al*, 2008), atividade antiulcerogênica induzida por etanol na mucosa gástrica de ratos de extratos a base de diclorometano e metanol de suas folhas (Ferreira-Luiz, 2010), propriedades hipoglicemiantes do extrato aquoso (Urzêda, 2013), atividade antimicrobiana contra cepas ATCCs de frações rica em taninos das folhas da *A. humile* (Ferreira, 2012), entre outros. Desta forma o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante de folhas da *A. humile*, através de métodos *in vitro* e *in vivo*, através da atividade hepatoprotetora, bem como identificar quais os compostos responsáveis por tais atividades.

METODOLOGIA

Coleta do material e preparação dos extratos

Folhas de *A. humile* St. Hil foram coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque, Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de três a quatro dias. As amostras foram identificadas conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguido de extração à quente em sohxlet, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: N-hexano (N-Hex), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcEta) e metanol (MeOH). As amostras foram rotaevaporadas e deixadas em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Para o extrato bruto (AHaq) o material foi extraído por sonicação em água destilada para obtenção do extrato bruto aquoso e posteriormente liofilizado.

Avaliação Fitoquímica

Dosagem de Fenóis Totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu segundo Hua-Bin Li, *et al.* (2008) com algumas modificações. Diferentes concentrações de ácido gálico, assim como as amostras, foram dissolvidas em metanol ou água (no caso da amostra aquosa). Para cada poço foram adicionados 0,1 mL da solução de Folin diluída de 1:10 (v/v) e 0,02 mL das amostras diluídas. Após 3 minutos no escuro, 0,08 mL de carbonato de sódio (7,5%) foi adicionado, deixando por mais 120 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após esse

período as absorbâncias das amostras foram medidas à 765 nm contra um branco (reagente adicionado ao metanol ao invés da amostra). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração de ácido gálico e então encontrada a equação linear ($y = 0,0121x - 0,032$, $R^2 = 0,9967$). O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

Dosagem de Flavonóides

A técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky e Salatino (1998) foi utilizada para estimativa de flavonóides, com algumas modificações. Diferentes concentrações de Quercitina, assim como as amostras, foram dissolvidas em metanol ou água (no caso da amostra aquosa). Em cada poço foi adicionado 0,1 mL do reagente de cloreto de alumínio (2g de cloreto de alumínio diluído em etanol a 2%), e misturado a 0,1 mL das amostras em triplicata. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 minutos. A absorbância das amostras foi medida à 420 nm contra um branco. A curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração de Quercetina e então encontrada a equação linear ($y = 0,0098x - 0,0483$, $R^2 = 0,9957$). O teor de flavonóides total no extrato foi expresso como equivalente Quercitina (mg QE / g de extrato).

Identificação de compostos fenólicos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A identificação dos compostos fenólicos nas amostras foi determinada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Agilen 1260 infinity) usando a coluna Zorbax SB (C18), 4,6 x 250 mm, 5 µm, com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada usando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetonitrila), 0-15 min = 92% de A e 8% de B, 16-30 min = 65% de A e 35% de B, com fluxo de 2,4 mL/min, usando detector UV à 280 nm, em um volume de injeção de 5 µL. Foram utilizados os compostos padrões puros (Sigma Aldrich): Ácido caféico, Ácido clorogênico, Ácido gálico, Ácido elágico, Ácido trans-ferúlico, Catequina, Quercitina e Rutina. A identificação de cada composto foi estabelecida por tempo de retenção e comparando o espectro UV dos picos obtidos com os previamente obtidos pela injeção dos padrões puros.

Atividades Antioxidantes *in vitro*

Preparo das amostras

Para as atividades antioxidantes in vitro as amostras foram diluídas a 1 mg/mL em metanol no caso dos extratos N-Hex, CHCl₃, AcEtA e MeOH, e em água destilada no caso da amostra AHaq. Foram utilizados os padrões Ácido Gálico, BHT, Quercitina e Ácido Ascórbico também diluídos a 1 mg/mL em metanol, afim de comparar as atividades dos extratos.

Sequestro de radicais livres pelo DPPH•

Neste ensaio a atividade sequestradora de radical livre do extrato, foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH•). (Blies, 1958). Foi misturado 0,25 mL da solução de DPPH• (1 mM e DO₅₁₇ = 0,650 ± 0,05) em 0,04 mL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 500 e 1000 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. O controle foi o DPPH adicionado a 0,04 mL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH• foi calculada pela fórmula: SRL [DPPH•] (%) = [(Aa – Ac) / Ac] x 100. Onde: Aa = Absorbância da amostra e Ac = Absorbância do controle.

Atividade Antioxidante Total

Cem microlitros de cada amostra foram adicionados a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente incubados em água a 95 °C por 90 minutos. Após voltarem a temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do metanol) (Pietro, *et al.*, 1999). A atividade antioxidante total calculada pela fórmula ATT (%) = [(Aa – Ac) / (Aaa – Ac)] x 100, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

Redução do Íon Férnico

O ensaio de FRAP foi realizado segundo Benzie, *et al.* (1996), com algumas modificações. A solução estoque foi preparada com 300 mM de tampão acetato (3,1 g CH₃COONa e 16 mL CH₃COOH) em pH 3,6, 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine) solubilizado em 40 mM de HCl, e 20 mM de solução de FeCl₃. A solução de trabalho foi preparada na hora misturando, 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL FeCl₃ (10:1:1) e incubado por 5 min a 37 °C. Vinte microlitros das amostras em diferentes concentrações diluídas em metanol, foram misturadas com 0,180 mL do reagente de FRAP e deixadas em repouso por 30 minutos a 37 °C no escuro. Posteriormente as absorbâncias foram medidas à 593 nm. Uma curva padrão com FeSO₄ (0 - 1000µg/mL) foi realizada para obtenção

da equação $Y = 0,0053x - 0,146$, $R^2 = 0,9849$. Os resultados são expressos em mg EFeSO₄ (II) / g de extrato.

Inibição pelo radical ABTS^{•+}

O método do ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-ethtylbenzothiazoline-6-sulfonate) foi feito baseado em RE, *et al.* (1999) com algumas modificações. Uma solução estoque do radical ABTS^{•+} foi preparada dissolvendo 7 mM de ABTS^{•+} com 2,45 mM de Persulfato de potássio, e deixado por 16 horas antes do uso. A solução de trabalho foi preparada por diluição da solução de estoque em etanol até obter a absorbância de $0,700 \pm 0,02$ em 734 nm. Dez microlitros dos extratos foram adicionados a 1 mL da solução de trabalho e lida exatamente após 6 minutos da reação em espectrofotometro a 734 nm. A porcentagem de inibição foi calculada através da equação: Inibição do ABTS^{•+} (%) = $[(Ac - Aa) / Ac] \times 100$. Onde: Ac = Absorbância do controle e Aa = Absorbância da amostra.

Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada segundo Kikuzaki e Nakatani (1993). Duzentos microlitros da amostra, do padrão (controle positivo) ou do branco (metanol ou água) foram adicionados em um tubo (separadamente) com 0,2 mL da solução de ácido linoleico (2,5 M), 0,4 mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7) e 0,2 mL de água destilada (volume final 1 mL). Posteriormente, os tubos foram incubados no escuro por 24 horas a 40 °C. Após a incubação, 0,05 mL da mistura foi adicionado a 0,05 mL de etanol (75%), 0,05 mL da solução de tiocianato de amônio (0,3 M) e 0,05 mL de solução de cloreto ferroso (20 mM) em um uma placa de microtitulação de fundo chato. Após 3 minutos, foi mensurada a densidade ótica em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 500 nm. A mistura original voltou para incubadora e o experimento foi realizado a cada 24h até 1 dia após o controle positivo atingir o seu valor máximo de absorbância. Os resultados foram expressos em porcentagem de Inibição, calculados pela fórmula: $I(\%) = [(Abs \text{ do controle positivo do ultimo dia} - Abs \text{ da amostra no ultimo dia}) / Abs \text{ do controle positivo do ultimo dia}] \times 100$, onde abs é absorbância.

Atividades antioxidantes *in vivo*

Animais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos Swiss machos (para ensaio de hepatoproteção) e fêmeas (para avaliação da toxicidade oral), com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do

Departamento de Antibióticos. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e serão submetidos à Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco. Protocolo nº: 23076.039016/2016-08.

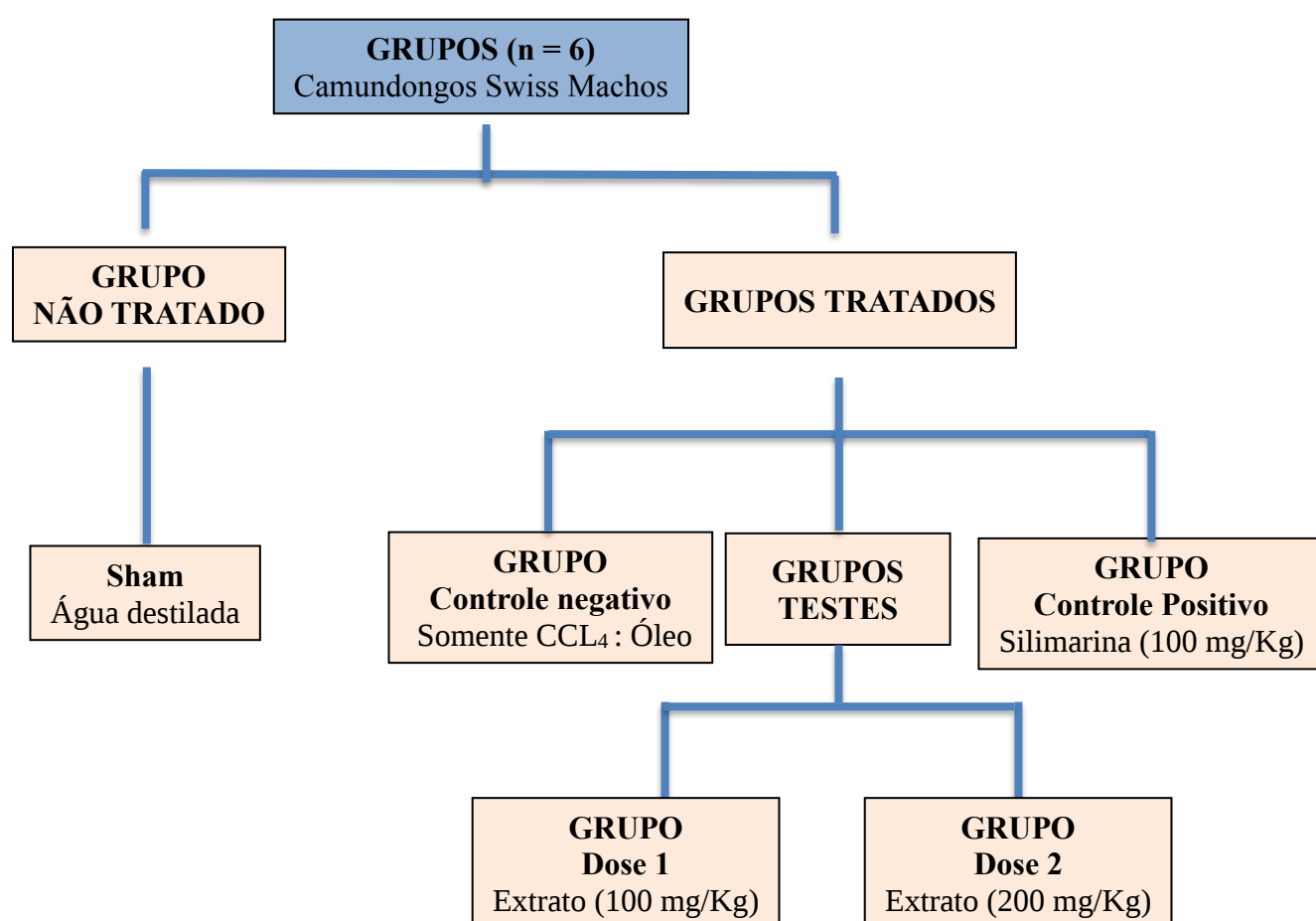
Toxicidade aguda oral (*up-and-down*)

O protocolo foi realizado seguindo as orientações do “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” (Brasil, 2004). Inicialmente, seis camundongos fêmeas foram tratados por via oral com o extrato de *A. humile* (2000 mg/kg) e observados quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade, tais como alteração de locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, convulsões, hiperexcitabilidade do Sistema Nervoso Central, contorções abdominais e número de animais mortos, com possível causa de morte. Os animais foram observados nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas (nas primeiras 24 horas) e diariamente durante 14 dias após administração, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, com o objetivo de observar a reversão ou não destes sinais. Desde a 24ª hora e até 14 dias após administração da dose, foram observados a variação de peso e o consumo de alimentos e de água. Ao fim do período de observação, todos os animais sobreviventes foram sacrificados e autopsiados. Caso fosse observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos seriam realizados. Caso houvesse mortes, seriam utilizadas outras doses para que se possa determinar a DL₅₀ (Dose letal: dose que mata 50% dos animais).

Desenho experimental para indução Hepatotoxicidade por Tetracloreto de Carbono (CCL₄)

Os camundongos foram divididos em sete grupos (n=6). Os tratamentos foram administrados durante os 5 dias por via oral e a indução com tetracloreto de carbono no segundo e terceiro dia através de via intraperitoneal. Grupo I (controle normal) recebeu DMSO 2% em água destilada (10 mL/kg i.p.) por 5 dias e óleo (10 mL/kg i.p.) no segundo e terceiro dia. Grupo II (CCL₄ intoxicado) recebeu DMSO 2% em água destilada (10 mL/kg i.p.) por 5 dias e CCL₄-óleo (1:1, 2,0 mL/kg i.p.) no segundo e terceiro dia. Grupo III (controle positivo) foram tratados diariamente com silimarina (100 mg/kg) por 5 dias e recebeu CCL₄-óleo (1:1, 2,0 mL/kg i.p.) no segundo e terceiro dia, 30 minutos após a administração da silimarina. Finalmente, os Grupos IV e V (grupos testes) foram administrados oralmente com 100 ou 200 mg/kg do extrato

metanólico de *A. humile* diluído em DMSO 2% em água destilada por 5 dias. Os dois grupos testes receberam CCL₄-óleo (1:1, 2,0 mL/kg) no segundo e no terceiro dia 30 minutos após a administração do extrato (Tong, *et al.*, 2015). Os camundongos foram mortos 24 horas após o último tratamento e então o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro separado para a dosagens dos parametros bioquímicos, o fígado foi removido e pesado, imediatamente após a pesagem um pedaço da amostra foi acondicionada em tampão de extração e congelada para posteriores dosagens.



Determinação das funções hepáticas *in vivo*

As dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), albumina, bilirrubina total e proteínas totais no soro foram realizadas utilizando kits comerciais da Labtest.

Preparo do homogeneizado do tecido coletado para utilização nas técnicas bioquímicas

O tecido coletado foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; Nonidet 1%; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM) na proporção de 200 mg para cada 1 mL de tampão. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e os sobrenadantes submetidos à quantificação de proteína e armazenados a 20 °C negativos.

Dosagem de proteína

A quantificação de proteína foi feita pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), com valores compreendidos entre 0 e 1000 µg, obtendo-se a curva $Y = 0,0006x + 0,1624$, $R^2 = 0,9835$.

Peroxidação lipídica – TBARS

Para a avaliação da peroxidação lipídica no fígado foi utilizada a técnica colorimétrica de Uchiyama e Mihara (1978), modificada por Hermes-Lima *et al.* (1995). O ácido tiobarbitúrico presente no reagente reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído. Cento e sessenta microlitros do homogeneizado foram adicionados a 0,160 mL do reagente de trabalho composto por 1% de TBA, 50 mM de NaOH e 0,1 mM de BHT e misturado a 0,08 mL de ácido fosfórico (7%). As amostras foram incubadas a 100 °C por 15 minutos e posteriormente resfriadas em banho de gelo para estabelecer o término da reação. Seiscentos microlitros de butanol foram adicionados e os tubos foram agitados vigorosamente e então centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. A fase orgânica foi então removida onde os produtos da lipoperoxidação formam um composto de coloração rosada que foi mensurado a 532 nm.

Medida da atividade da Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada de acordo com o método de Beachamp (1971) com algumas modificações. Diferentes volumes de amostra foi misturado ao tampão fosfato (50 nM em pH 7,8), e posteriormente adicionados 0,2 mL de EDTA (0,1 M) e 0,1 mL de NBT (1,5 mM). Dessa mistura foi retirada 0,1 mL e feita a leitura da OD1 a 560 nm (O tubo controle foi feito sem adição da amostra). Foi adicionada aos tubos 0,15 mL de riboflavina (20 µM) e então exposta a luz fluorescente por 15 minutos a 25 °C para iniciar a reação. Cem microlitros das amostras foram adicionados a placa de microtitulação e obtida a OD2 a 560 nm. Considerar a OD1 como um branco. Uma unidade de atividade enzimática é considerada o volume de amostra necessário para inibir 50% do formazan. E os resultados foram expressos em unidade de enzima por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Atividade da Glutathione Peroxidase

A atividade da Glutathione peroxidase (GPx) foi medida pelo método de Hafeman, *et al.* (1974). Uma mistura reacional contendo 0,02 mL do homogenato de fígado, 0,02 mL de GSH (mM), 0,02 mL de H₂O₂ (1,2 mM), 0,02 mL de azida sódica (25 mM) e 0,420 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M em pH 8,0) foi incubada a 37 °C por 6 minutos e posteriormente foi adicionado 0,4 mL de ácido fosfórico (1,65%) para interromper a reação (O branco foi preparado substituindo o homogenato por tampão). As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e então 0,5 mL do sobrenadante foi misturado a 0,5 mL de fosfato de sódio monobásico (0,4 M) e 0,25 mL de DTNB (1 mM), posteriormente as amostras foram novamente incubadas a 37 °C durante 10 minutos e então feita a leitura a 412 nm. Os resultados foram expressos em Unidades de GPx por mg de proteína da amostra através da fórmula:

$$\text{GPx (U/mg proteína)} = \frac{\text{OD do branco} - \text{OD da amostra} \times 1}{0,0001 \times \text{mg de proteína}}$$

Análises Estatísticas

Todos os testes foram executados em triplicada, e calculados a média e o desvio padrão. A porcentagem de inibição x log da concentração (IC₅₀) foram calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* 5.0, onde também foram produzidos os gráficos e as análises de significância ($p < 0,05$) e correlação de Pearson (r^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Fitoquímica

Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em plantas que ganharam muita atenção devido a suas atividades antioxidantes e habilidades de eliminação de radicais livres, no qual possui implicações benéficas para a saúde humana (Patel *et al.*, 2011). A atividade antioxidante dos fenólicos é essencialmente determinada pelas suas estruturas, em particular a deslocalização dos elétrons sobre um núcleo aromático. Quando estes compostos reagem com radicais livres, ocorre a deslocalização do elétron gerado sobre o antioxidante fenólico e a estabilização pelo efeito de ressonância do núcleo aromático, o que impede a continuação da reação em cadeia dos radicais livres (Miguel, 2009). Os compostos fenólicos totais e os

flavonóides foram dosados em todos os extratos, em equivalente de ácido gálico e equivalente de quercitina, respectivamente (Tabela 1). Os compostos fenólicos estão realmente em maior concentração no extrato AhM, e os flavonóides no AhE.

Tabela 1: Resultado das dosagens fitoquímicas dos extratos de folhas de *A. humile*.

Amostras	Fenóis	Flavonóides
	mg EAG / g extrato	mg EQ / g extrato
AhN	18,62 ± 3,46	40,44 ± 2,65
AhC	24,16 ± 2,13	18,02 ± 6,36
AhE	103,39 ± 6,58	47,17 ± 3,51
AhM	156,24 ± 2,10	19,35 ± 2,45
AhW	108,62 ± 3,85	11,90 ± 0,59

Legenda: EAG – equivalente de ácido gálico, EQ – equivalente de quercitina.

Esses dois extratos que apresentaram, maiores de concentrações de compostos fenólicos e o extrato aquoso foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência, para identificação através do tempo de retenção e da UV de compostos padrões. São observados nos cromatogramas abaixo os picos que representam os compostos majoritários desses extratos. Na figura 1(a) que representa o extrato AhE, são representados quatro picos, dos quais, o pico 1 e 4 são ácido gálico (majoritário) e quercitina, respectivamente. Na figura 1(b) que representa o extrato AhM, os picos 1, 2 e 3 são ácido gálico, catequina e ácido elágico (majoritário), respectivamente. Na figura 1(c) que representa o extrato AhW, é observado um conjunto de picos justaposto antes de um minuto da corrida cromatográfico, sendo assim não identificado nenhum dos compostos que foram utilizados como majoritário dessa amostra.

Além desses compostos que estão representados nos cromatogramas abaixo, foram identificados no extrato AhE, ácido caféico, ácido elágico, ácido trans-ferúlico e quercetina 3-β D-glicosilada e no extrato AhM, ácido caféico, ácido p-cumárico, quercetina 3-β D-glicosilada, quercetina e rutina. No extrato AhW, não foi identificado o composto majoritário, porém foram identificados traços de ácido caféico, ácido trans-ferúlico e quercetina 3-β D-glicosilada. Os resultados da HPLC foram consistentes com os resultados obtidos para o conteúdo de fenóis totais e flavonóides, no qual os extratos AhE e AhM, possuem um conteúdo desses metabólitos maior que os extratos AhN, AhC e AhW. Os resultados evidenciam a relação direta entre o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante dos diferentes extratos.

Hatamnia, *et al.* (2014), demonstrou que atividades antioxidantes testadas em diferentes partes do fruto de *Pistacia atlantica* estava proporcionalmente ligado ao conteúdo fenólico presente nas diferentes partes.

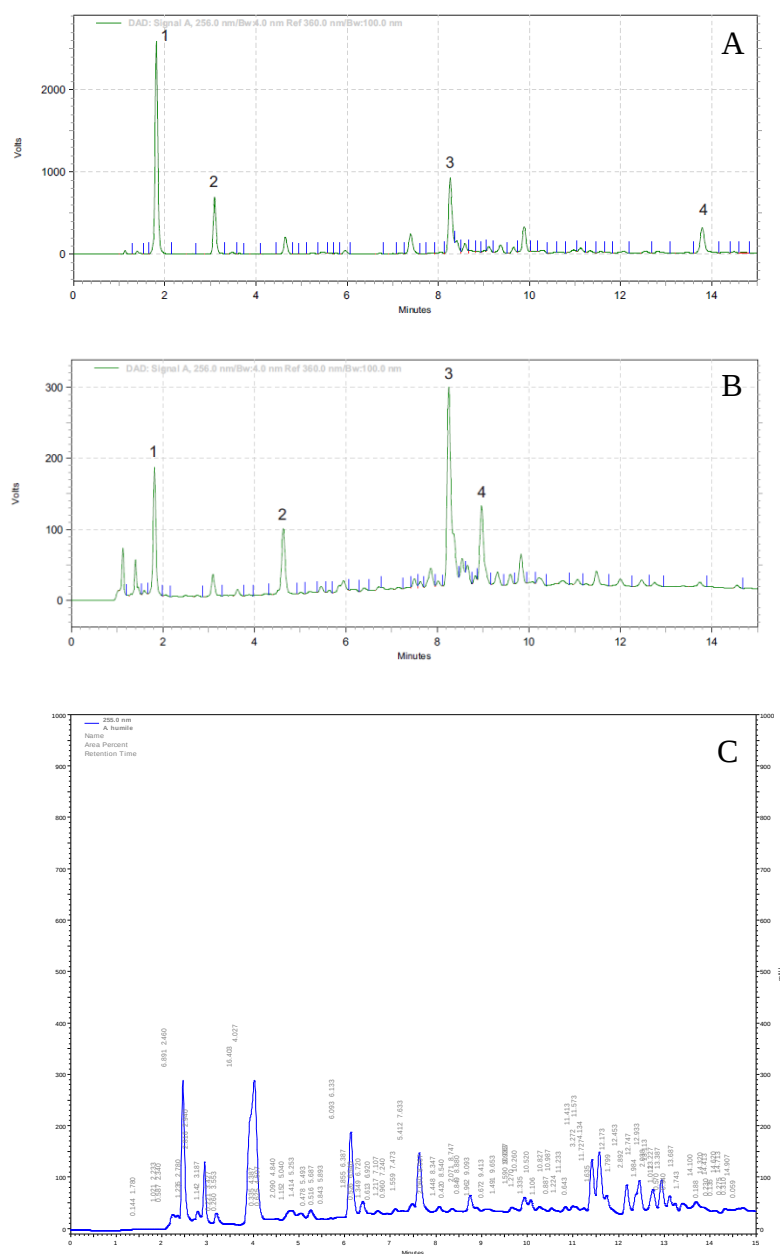


Figura 1: Cromatogramas gerados a partir da corrida cromatográfica dos extratos de folhas da *A. humile*. (A) Cromatograma do extrato AhE. (B) Cromatograma do extrato AhM. (C) Cromatograma do extrato AhW. Cromatogramas analisados no comprimento de onda de 256 nm, pois é o indicado para observação de compostos fenólicos. Os picos representam a intensidade do sinal, que é proporcional a concentração de dado composto na amostra.

Os resultados do extrato AhE corroboram com os de Luiz-Ferreira, *et al.* (2010), no qual seu extrato de acetato de etila das folhas da *Anacardium humile*, coletada no Porto Nacional no estado do Tocantins, também apresentaram altos níveis de ácido gálico, porém não sendo o composto marjoritário, como apresentado neste trabalho. Como já se sabe a disponibilidade hídrica, temperatura e outras variações climáticas do local influenciam nos níveis de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Antioxidantes *in vitro*

Várias metodologias para análise do potencial antioxidante *in vitro* foram testadas. Como métodos que avaliam o seqüestro de radicais livres através da doação de elétrons, foram escolhidos os ensaios de seqüestro de radical livre do DPPH[•] e de inibição do radical ABTS^{•+}. Quando DPPH[•] reage com um dador de hidrogênio, uma forma reduzida (molecular) (DPPH) é gerada, acompanhada pelo desaparecimento da cor violeta, a diminuição de absorvância depende linearmente da concentração do antioxidante (Pisoschi, 2011). O ensaio de inibição do radical ABTS^{•+} baseia-se na capacidade de antioxidantes para reduzir esta radical a ABTS[•], o ABTS^{•+} é azul em solução etanólica, à medida que a amostra sequestra os radicais a coloração muda para amarelo em um máximo de absorbância de 734 nm (Re *et al.*, 1999). A figura 2 e 3, mostra os resultados em percentual de seqüestro do DPPH e inibição do ABTS, respectivamente. Os extratos mais polares, AhE, AhM e AhW, apresentam atividade superior aos extratos mais apolares, AhN e AhC.

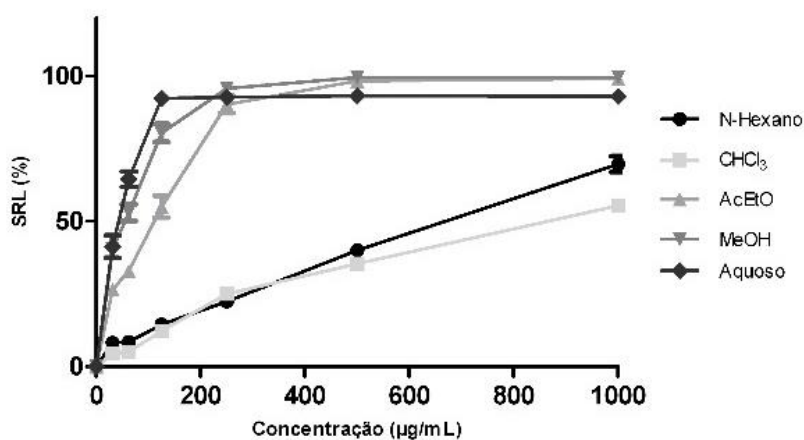


Figura 2: Percentual de seqüestro de radicais livres pelo método do DPPH em função do aumento da concentração dos extratos de folhas de *A. humile*. SRL – Seqüestro de radicais livre.

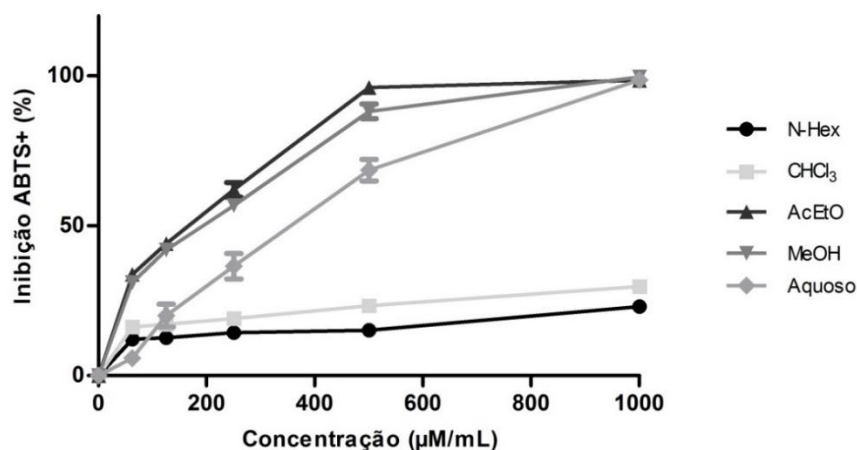


Figura 3: Percentual de inibição do radical ABTS em função do aumento da concentração dos extratos de folhas de *A. humile*.

No método do DPPH, o extrato AhW tem um IC_{50} menor que os outros extratos, sendo nesse método o mais eficaz, seguido do extrato MeOH (Tabela 2), mostrando-se bem eficazes quando comparados com padrões como a Quercitina, por exemplo, não apresentando diferença estatística com nenhum dos padrões. O IC_{50} do método do ABTS para o extrato AcEtA é menor que os outros extratos (131,2 µg/mL), seguido dos extratos AhM > AhW > AhC > AhN (Tabela 4). Nesta atividade os extratos AhE e AhM se aproximam da atividade potencial do ácido gálico, ácido ascórbico e quercetina e são melhores do que a atividade do BHT, sendo significativamente diferente deste último.

Tabela 2: Resultado das atividades antioxidantes dos extratos de folhas de *A. humile* e dos padrões.

Amostras	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS IC ₅₀ (µg/mL)	ATT (1 mg/ml - %)	FRAP (1 mg/ml - %)	Peroxidação lipídica (%)
AhN	340,9 (282,4 a 411,5) ^{a,b,c,d}	95842,0 (17976 a 510996) ^{a,b,c,d}	34,8 ± 3,2 ^{a,b,c,d}	80,50 ± 6,02 ^{a,b,c,d}	6,88 ± 1,82 ^{a,b}
AhC	281,8 (246,3 a 322,4) ^{a,b,c,d}	20805,0 (9976 a 43388) ^{a,b,c,d}	50,8 ± 6,6 ^{a,b,c,d}	173,77 ± 15,48 ^{a,b,c,d}	6,70 ± 1,28 ^{a,b}
AhE	87,5 (75,4 a 101,5) ^{a,b,c,d}	131,2 (109,0 a 158,0) ^d	41,5 ± 2,9 ^{a,b,c,d}	556,60 ± 4,84 ^c	41,32 ± 8,96 ^{a,b,d}
AhM	47,0 (42,11 a 52,5)	150,0 (126,2 a 178,2) ^d	62,5 ± 1,3 ^{b,c,d}	563,21 ± 5,89 ^c	53,22 ± 5,05 ^{a,b,d}
AhW	36,5 (33,4 a 39,9)	309,6 (278,2 a 344,4) ^{a,b,c,d}	19,8 ± 0,6 ^{b,c,d}	538,18 ± 9,13	33,06 ± 1,02 ^{b,d}
Quercitina	20,7 (18,5 a 23,2)	51,9 (45,8 a 58,8)	62,4 ± 1,9	551,57 ± 17,49	27,92 ± 1,69
Ác. Gálico	5,0 (4,5 a 5,6)	128,2 (109,7 a 149,8)	1,5 ± 0,6	546,73 ± 2,75	100
Ác. Ascórbico	19,2 (16,8 a 21,9)	11,4 (94,0 a 132,1)	100	526,23 ± 21,98	Na
BHT	20,9 (17,8 a 24,6)	717,2 (598,3 a 859,7)	4,1 ± 0,1	563,52 ± 8,76	0,75 ± 0,40

Legenda: na – não apresenta atividade. ^{a,b,c,d}Diferença estatística entre as amostras e cada padrão testado, onde $p < 0,05$, onde ^aDiferença comparada com o padrão Quercitina, ^bDiferença comparada com o padrão Ácido gálico, ^cDiferença comparada com o padrão Ácido ascórbico e ^dDiferença comparada com o padrão BHT.

A atividade antioxidante total (ATT) e a redução do íon férrico (FRAP) representam metodologias que usam de redução de íons metálicos. O ensaio do ATT é um método que determina quantitativamente da capacidade antioxidante, através da formação de complexo fosfomolibdênio. O ensaio baseia-se na redução de Mo(VI) à Mo(V) e a subsequente formação de um complexo de fosfato de molibdênio, Mo(V), que possui a coloração verde em pH ácido (Shabbir, *et al.*, 2013). O método FRAP baseia-se na redução do complexo de Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à sua forma ferrosa em pH ácido (Prior e Cao, 1999). A ligação de Fe^{2+} ao ligante gera uma cor azul muito intensa, correlacionando assim com a concentração de antioxidantes.

Nesses dois métodos o extrato AhM possui melhor atividade quando comparada aos outros extratos e bem próximos dos padrões testados. No ensaio do ATT, o extrato AhM possui $62,5 \% \pm 1,3$, bem próximo da quercitina, $62,4 \% \pm 1,9$, alguns padrões antioxidantes não possuem atividade relevante neste método, como por exemplo, o ácido gálico ($1,5 \pm 0,6$) que possui uma atividade muito baixa quando comparado ao ácido ascórbico que é considerado o composto que possui 100% de atividade para este teste. O extrato AhE também possui atividade relevante quanto ao FRAP, seu resultado está bem próximo dos padrões (Tabela 2).

O método de ensaio de inibição da peroxidação lipídica induz a peroxidação lipídica de um ácido graxo, no caso o ácido linoléico, por aquecimento à 40 °C. Se houver produtos antioxidantes no meio, esses inibem a produção dos radicais peroxilas ($\text{LOOH}^\bullet$), no qual serão medidos indiretamente pela adição dos reagentes (Kumar, *et al.* 2014). Nesse método o ácido gálico é o mais eficaz dos compostos padrões, sendo considerado como 100% de atividade anti-peroxidação. A capacidade de anti-peroxidação dos extratos foi na ordem $\text{AhM} > \text{AhE} > \text{AhW} > \text{AhN} > \text{AhC}$. O extrato AhE, sendo maior que os padrões testados. O ácido ascórbico não possui atividade neste teste.

Na tabela 3, estão representadas as correlações entre as atividades testadas e suas respectivas dosagens de compostos fenólicos e flavonóides, para evidenciar que as atividades presentes nesses extratos, sendo elas boas ou não, estão relacionadas as concentrações desses metabólitos secundários em cada extrato. A correlação foi obtida por simples comparação do r^2 obtido através do gráfico plotado no programa *GraphPad Prism* 5.0, entre cada atividade antioxidante de cada extrato e sua dosagem de compostos fenólicos ou flavonóides, sendo assim, quanto mais próximos de 1, melhor sua correlação. Os níveis de correlação são então indicados por asterísticos.

Tabela 3: Correlação de Pearson (r^2) entre as atividades antioxidantes de todos os extratos de folhas de *A. humile* e as dosagens de Fenóis totais ou Flavonoides.

	Fenóis	Flavonóides
	mg EAG / g extrato	mg EQ / g extrato
AhN		
DPPH	0,9960 ***	0,9930 ***
ABTS	0,7860 *	0,8025 *
ATT	0,9798 **	0,9823 **
FRAP	0,7337 ^{ns}	0,5496 ^{ns}
Peroxidação Lipídica	0,8996 ^{ns}	0,9541 *
AhC		
DPPH	0,9745 ***	0,8507 **
ABTS	0,7650 *	0,9365 **
ATT	0,9913 ***	0,8070*
FRAP	0,8797 *	0,4420 ^{ns}
Peroxidação Lipídica	0,9713 *	0,7281 ^{ns}
AhE		
DPPH	0,7195 *	0,6841 *
ABTS	0,8502 **	0,8380 *
ATT	0,9941 ***	0,9926 ***
FRAP	0,9204 **	0,9346 **
Peroxidação Lipídica	0,9926 **	0,9930 **
AhM		
DPPH	0,6071 *	0,6996 *
ABTS	0,9050 **	0,9390 **
ATT	0,9742 ***	0,9612 ***
FRAP	0,9621 **	0,9584 **
Peroxidação Lipídica	0,9853 **	0,9843 **
AhW		
DPPH	0,3982 ^{ns}	0,7207 *
ABTS	0,9751 ***	0,8449 **
ATT	0,9130 **	0,9795 ***
FRAP	0,9650 **	0,9003 *
Peroxidação Lipídica	0,9964 **	0,8504 ^{ns}

Legenda: EAG – equivalente de ácido gálico, EQ – equivalente de quercitina. ns – não correlaciona.

A peroxidação lipídica parece não está totalmente relacionada aos compostos fenólicos. Os compostos que agem na inibição da peroxidação lipídica de membranas são geralmente

vitaminas lipossolúveis como o tocoferol, sendo totalmente diferentes da estrutura química dos compostos fenólicos que foram encontrados nos extratos das folhas de *A. humile*, podendo ser esse o motivo da não correlação entre essa atividade e os compostos dosados.

Atividade antioxidante *in vivo*

As atividades antioxidantes *in vivo* foram avaliadas através da atividade hepatoprotetora do extrato metanólico, já que este foi o extrato que possui melhor atividade antioxidante nos métodos *in vitro*. Foram avaliados neste teste os níveis dos parâmetros hepáticos sanguíneos, a peroxidação lipídica do fígado e os níveis das enzimas antioxidantes.

Para toxicidade oral aguda do extrato AhM, foi avaliado o peso dos animais, o aspecto macroscópico do fígado, baço e rins e os parâmetros bioquímicos hepáticos. O peso dos animais do grupo tratado e do grupo controle não apresentou diferença significativa entre o primeiro e o décimo quarto dia (Figura 4), nem alterações macroscópicas dos órgãos analisados. Não existem relatos científicos da avaliação da toxicidade aguda de extratos de *A. humile*.

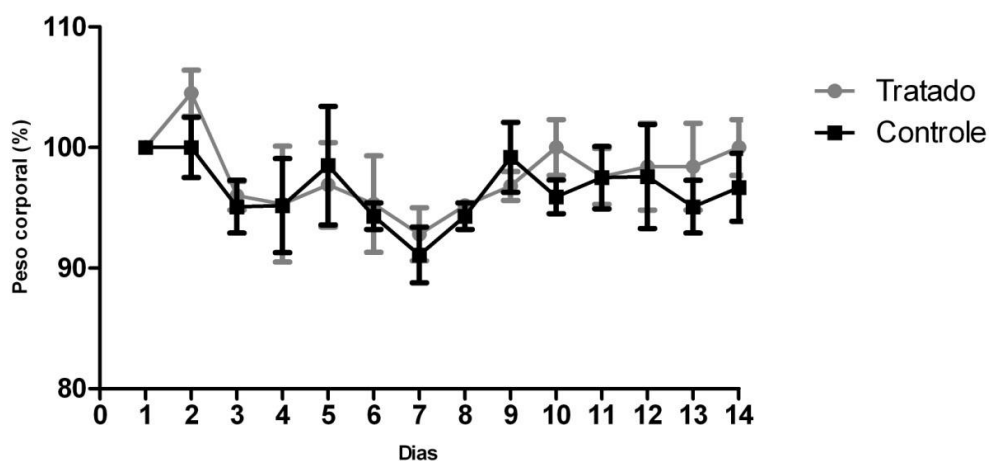


Figura 4: Análise ponderal dos grupos experimentais, realizada durante 14 dias de experimento. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet com significância de $p < 0,05$.

Tetracloreto de carbono é acumulado no parênquima celular e metabolizado na citocromo P450, o transformando em radical triclorometil (CCl_3) e triclorometil peroxila ($\text{CCl}_3\text{OO}^{\cdot}$) que causam a peroxidação lipídica na membrana, necrose celular e finalmente o dano hepático (Guo

et al., 2007). Este modelo tem sido amplamente utilizado para a avaliação etnofarmacológica do potencial benéfico de extratos vegetais (Ahn, M. *et al.*, 2014). A lesão hepática induzida é caracterizada principalmente por estresse oxidativo direto, levando então à morte de hepatócitos (McCay, P.B., 1984). Os efeitos do grupo intoxicado e dos grupos tratados sobre o peso do animal e do peso do fígado nos camundongos estão representados na tabela 4. O grupo intoxicado apresenta uma diminuição significativa no peso corporal quando comparado ao controle normal, assim como um aumento no fígado. O index hepático, no qual representa o percentual do fígado em relação ao corpo (peso do corpo/peso do corpo x 100) aumenta significativamente quando comparado o grupo intoxicado com o controle normal. A administração do extrato nas doses de 200 mg/kg administradas consegue diminuir o index hepático porém, não apresentam diferença significativa quando comparadas ao controle negativo, como é possível observar na Silimarina.

Tabela 4: Efeitos dos tratamentos sobre o peso do corpo, peso do fígado e index hepático nos camundongos intoxicados com tetracloreto de carbono.

Grupos	Peso corporal (g)	Peso do fígado (g)	Index Hepático (%)
Controle normal	38,1 ± 3,6	1,68 ± 0,2	4,40 ± 0,3***
Controle intoxicado	33,0 ± 2,0	2,18 ± 0,3	6,54 ± 0,6
Silimarina	37,0 ± 3,1	1,82 ± 0,2	4,91 ± 0,4***
AhM(100 mg/Kg)	35,0 ± 1,0	2,17 ± 0,1	6,19 ± 0,2
AhM (200 mg/Kg)	33,3, ± 2,0	2,17 ± 0,1	5,99 ± 0,5

Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão. *p < 0,05 vs. Grupo CCl₄ intoxicado.

Danos celulares são refletidos nas alterações dos parâmetros bioquímicos hepáticos. AST e ALT são os principais marcadores e altamente sensíveis. São conhecidas como aminotransferases, sua elevação sérica é indicativo de necrose ou lesão do hepatócito. AST, também conhecida como transaminase glutâmica oxalacética, tem origem citoplasmática ou microssomal, já a ALT, conhecida também como transaminase glutâmica pirúvica tem origem exclusivamente citoplasmática e permanece alterada por mais tempo quando ocorre um dano celular (Erichsen, *et al.*, 2009). AST, ALT, assim como FA e Bilirrubina estão aumentados no sangue quando existe algum dano, contrário do que ocorre com os níveis de Albumina e Proteínas Totais, no qual decrescem, pois o metabolismo está comprometido. A tabela 5 mostra os marcadores hepáticos dosados no soro. Foi observado que os níveis de ALT, AST, FA, ALB,

PT e BIL diferem significativamente entre o grupo intoxicado e o grupo controle, assim como é possível observar o reestabelecimento dos níveis desses parâmetros quando administrado a Silimarina.

Tabela 5: Efeitos do extrato metanólico, da Silimarina e do grupo intoxicado nos parâmetros sorológicos hepáticos.

Grupos	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	ALB (g/dL)	BT (g/dL)	PT (mg/dL)
Controle normal	84,32 ± 15,53**	20,80 ± 8,60***	54,84 ± 9,43***	3,28 ± 0,62***	2,73 ± 0,16**	6,72 ± 0,62***
Controle intoxicado	108,08 ± 19,78	68,04 ± 20,26	103,39 ± 26,43	1,88 ± 0,40	3,13 ± 0,27	4,06 ± 0,72
Silimarina	93,64 ± 12,41*	25,86 ± 8,93***	57,43 ± 9,73***	2,30 ± 0,27 ^{ns}	2,76 ± 0,24*	4,65 ± 0,70 ^{ns}
AhM (100 mg/Kg)	91,52 ± 20,72*	52,45 ± 26,33 ^{ns}	65,10 ± 6,86***	2,61 ± 0,10**	2,98 ± 0,16 ^{ns}	5,87 ± 0,49***
AhM (200 mg/Kg)	86,57 ± 15,20**	45,60 ± 14,24 ^{ns}	48,47 ± 16,53***	2,73 ± 0,25**	2,93 ± 0,08 ^{ns}	6,10 ± 0,62***

Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão. *p < 0,05 vs. Grupo CCL₄ intoxicado.

Entre os grupos tratados, o grupo tratado na dose de 200 mg/kg foi o mais eficaz, no qual reduziu os marcadores hepáticos significativamente quando comparados com o controle intoxicado.

Urzêda *et al.* (2013) em seu trabalho mostrou que o extrato aquoso de stems da *A. humile* diminuiu 21% da ALT quando comparada com o grupo diabético, sugerindo que o extrato apresenta uma proteção hepática aos danos na diabetes, porém não foi encontrado trabalhos científicos que mostram esse efeito com o extrato metanólico.

O organismo contui de algumas enzimas que são capazes de diminuir os danos oxidativos que são causados pelo próprio metabolismo, ou por agentes externos, sendo elas principalmente GPx, SOD e Catalase, elas possuem um sistema de defesa eficaz contra danos induzidos por radicais livres. Na hepatotoxicidade induzida por CCl₄, o desequilíbrio entre a produção de ROS e essas defesas antioxidantes pode resultar em estresse oxidativo que levam à necrose hepática (Naskar e Mazumder, 2015). Foram mensuradas no homogenato de fígado SOD, GPx e a peroxidação lipídica (Figura 5). Um aumento da peroxidação lipídica é observado no grupo tratado com o CCl₄. O extrato AhM, nas duas doses testadas diminuem a peroxidação lipídica significativamente, assim como reestabelece quase que completamente os níveis da superóxido dismutase, porém para os níveis de atividade de GPx, somente a dose de 200 mg/kg difere significativamente do grupo intoxicado. Essas enzimas estão relacionadas à defesa enzimática contra a toxicidade do hidroperóxido, pois a SOD catalisa a desmutação que neutraliza o O₂⁻ transformando-o em H₂O₂ enquanto que a GPx metaboliza o H₂O₂ e hidroperóxidos a produtos não tóxicos (YAO, *et al.*, 2005).

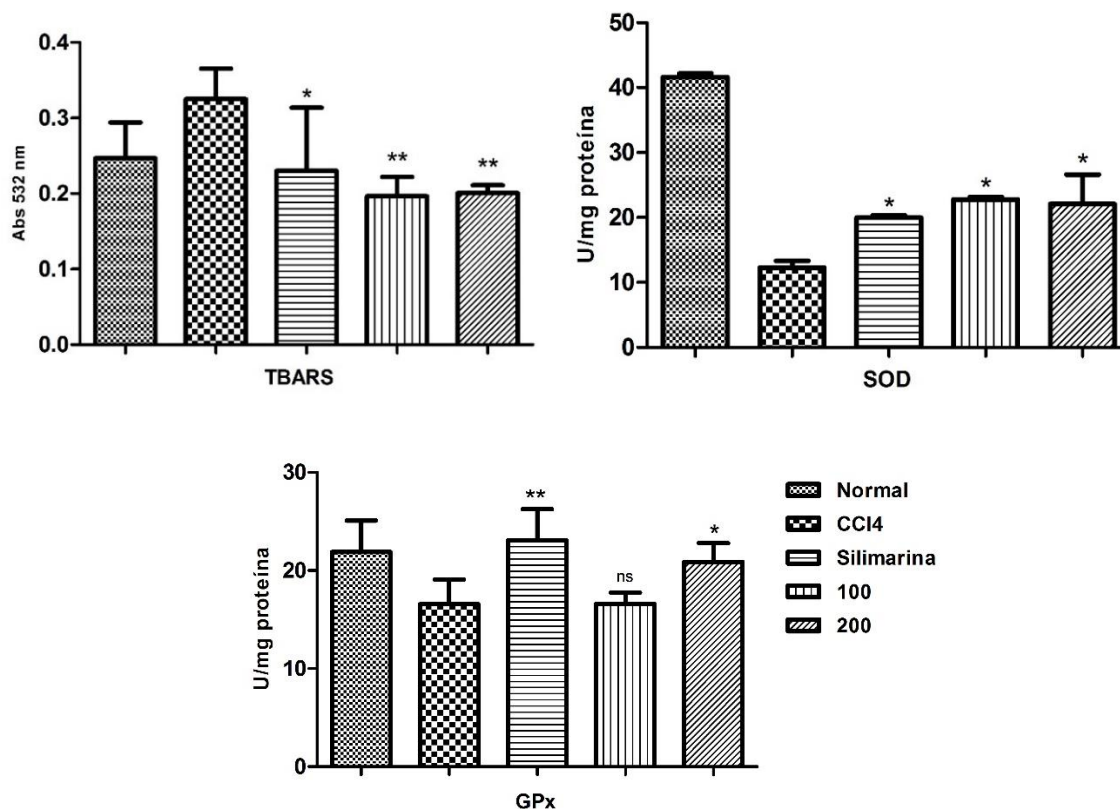


Figura 5: Efeitos do extrato metanólico e da Silimarina nos níveis das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica. Resultados expressos em média e desvio padrão. *p < 0,05 vs. grupo CCl₄ intoxicado.

A administração do extrato melhora os aspectos dos grupos tratados, inclusive quando comparado com Silimarina no qual já tem atividade hepatoprotetora conhecida. Silimarina é uma mistura de flavonoides extraída de *Silybum marianum* (Gaertn.) (Parés *et al.*, 1998) e tem sido clinicamente utilizado sobre várias doenças do fígado, como intoxicação por álcool ou drogas, envenenamento por cogumelos e hepatite viral (Flora *et al.*, 1998), cuja patogênese envolve uma resposta infamatória. As propriedades subjacentes aos seus efeitos hepatoprotetores são consideradas múltiplas: atividade de eliminação de radicais livres, prevenção da oxidação e depleção da glutathione, efeito estabilizador da membrana, entre outros (Shear *et al.*, 1995; Dehmlow, 1996).

Os efeitos oxidativos do CCl₄ foram amenizados quando administrado o extrato metanólico das folhas de *A. humile*, sugerindo que a atividade hepatoprotetora ocorre através do sequestro de radicais livres, causado pelos seus compostos antioxidantes. No entanto, é necessário estudos que envolva os mecanismos de ação e sinalização para melhor entendimento

da eficácia das substâncias presentes na amostra, bem como testes com os compostos isolados, explorando ainda mais esse possível novo suplemento natural proveniente do Cajuí.

CONCLUSÕES

O potencial antioxidante dos extratos das folhas de *A. humile* se deve aos compostos identificados, principalmente os majoritários, sendo o ácido gálico o do extrato AhE, e o ácido elágico o composto do extrato AhM, no qual são compostos já bem descritos na literatura por suas várias funções, incluindo antioxidantes. O teste de toxicidade oral mostra que os extratos das folhas de Cajuí mesmo tendo sido extraído com solventes orgânicos não apresentam toxicidade ao organismo vivo. Os resultados obtidos nos testes de hepatoproteção comprovam o potencial antioxidante do extrato por diminuir os danos oxidativos causado pelo tetracloreto de carbono. O reestabelecimento das enzimas hepáticas e a redução da peroxidação lipídica comprovam a importância dos compostos presentes na folha da *Anacardium humile*.

REFERÊNCIAS

- Ahn, M., *et al.* Hepatoprotective effects of Lycium chinense Miller fruit and its constituent betaine in CCl₄-induced hepatic damage in rats, *Acta Histochem.* 116: 1104-1112, 2014.
- Alves, C.Q. e David, J.M., *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova.* 33(10): 2202-2210, 2010.
- Barbosa, D.B. Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). 64f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.2008.
- Beauchamp, C. e Fridovich, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry.* 44(1): 276-287, 1971.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry.* 239(1): 70-76, 1996.
- Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature.* 181:1199-1200, 1958.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de março de 2004.
- Brasseur, T. e Angenot, L. Unreactif de choix pour la revelation des flavonoides: Le mélange diphenylborated' aminoethanol - Peg 400. *Journal of Chromatography.* 351: 351-355, 1986.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology.* 51: 15-25, 2013.
- Carvalho, M.P., Santana, D.G., Ranal, M.A. Emergência de plântulas de *Anacardium humile* A. St.-Hil. (Anacardiaceae) avaliada por meio de amostras pequenas. *Revista Brasileira de Botânica.* 28:627-633, 2005.

- Dehmlow, C., *et al.* Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. *Life Sciences*. 58(18): 1591-1600, 1996.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*. 232(2): 243–248, 1995.
- Ferreira, P.R.B., *et al.* Antibacterial activity tannin-rich fraction from leaves of *Anacardium humile*. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42(10): 1861-1864, 2012.
- Flora, K.M.D., *et al.* Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 93, 139–143, 1998.
- Gobbo-Neto, L. e Lopes, N.P. Plantas medicinais: Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*. 30(2): 374-381, 2007.
- Guo, T.T., *et al.* In vivo protective effect of *Porphyra yezoensis* polysaccharide against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 49:101–106, 2007.
- Hafeman, D.G., Sundae, R.A. e Houestra, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *Journal of Nutrition*, 104: 580–587, 1974.
- Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R. Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica subsp. Kurdica*) fruits. *Food Chemistry*. 145:306-311, 2014.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G. e Storey, K.B. Quantification of Lipid Peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)Xylenol Orange Complex Formation. *Free Radical Biology & Medicine*, 19(3): 271-280, 1995.
- Hua-Bin, L., *et al.* Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in metanol extracts from medicinal plants. *LWT*. 41:385–390, 2008.
- Kikuzaki, H., Nakatani, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci*. 58:1407–1410, 1993.
- Kumar, S., Sandhir, R. e Ojha, S. Evaluation of antioxidante activity and total phenol in diferente varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Research Notes*. 7:560-568, 2014.
- Lima, F.O., Bezerra, A.S. Flavonoids and Free Radicals. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas*, Santa Maria. 13(1): 111-124, 2012.

- Lowry, O.H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193-265, 1951.
- Luiz-Ferreira, A. *et al.* Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on Ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Molecules*, 15:7153-7166, 2010.
- McCay, P.B., *et al.* Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro, *J Biol Chem*, 259: 2135-2143, 1984.
- Miguel, M.G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr.* 25:291-312, 2010.
- Moron, M.A., Depierre, J.W. e Manner, V.B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 582:67–68, 1979.
- Murphy, MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemistry*. 417, 1-13, 2009.
- Naskar, S., Mazumder, U.K. Antioxidant Potential and Hepatoprotectivity of Hydromethanolic Extract of *Litchi chinensis* Fruits: In Vivo and In Vitro Studies. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 14(1): 1-9, 2015.
- Paiva, P.M.G., *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Badajoz: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. p. 396-406. 2010.
- Parés, A., *et al.* Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. *Journal of Hepatology*. 28(4): 615-621, 1998.
- Patel, D.K. *et al.* Evaluation of phytochemical and antioxidant activities of the different fractions of *Hybanthus enneaspermus* (Linn.) F. Muell. (Violaceae). *Asian Pacific J of Tropical Medicine*. p391-396, 2011.
- Pietro, P., Pineda, M., Aguilar, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269(2): 337–341, 1999.

- Pisoschi, A.M. e Negulescu, G.P. Methods for total antioxidant activity determination: a review Biochemistry and Analytical Biochemistry, 2011.
- Porto, R.A. *et al.* Atividade larvica do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(6):586-598, 2008.
- Prior, R.L. e Cao, G. In vivo total antioxidante capacity: Comparison of diferents analyticals methods. Free Radical Biology and Medicine. 27: 1173-1181, 1999.
- Re, R., *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26(9-10): 1231-1237, 1999.
- Shabbir, M., Khan, M.R. e Saeed, N. Assesment of phytochemicals, antioxidante, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extracts and various frantions of *Maytenus royleanus* leaves. BMC Complementary and Alternative Medicine. 13: 143-154, 2013.
- Shear N.H., Malkiewicz I.M., Klein D. Acetaminophen-Induced Toxicity to Human Epidermoid Cell Line A431 and Hepatoblastoma Cell Line Hep G2, in vitro. Is Diminished by Silymarin. Skin Pharmacol. 8:279-291, 1995.
- The Plant List: A working list of all plants species, Anacardiaceae. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Anacardiaceae/> Acesso em: 2 de junho de 2016.
- Tong, J. *et al.* Hepatoprotective activity of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds in vitro and *in vivo* carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Journal of Ethno-Pharmacology. 2015.
- Uchiyama, M.; Mihara, M. Determination of malonaldehyde in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem. 86:271-278, 1978.
- Urzêda, M.A. *et al.* Evaluation of the hypoglycemic properties of *Anacardium humile* aqueous extracs. Complementary and Alternative Medicine. 2013.
- Woisky, R.G. e Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apicultural Research. 37(2): 99-105, 1998.

ANEXO B – Artigo 2

Artigo a ser enviado para revista Food Control, ISSN: 0956-7135.

Normas de submissão revista: <https://www.elsevier.com/journals/food-control/0956-7135/guide-for-authors>

Anacardium humile* A. St-Hil from Caatinga of Pernambuco-Brazil: Potencial antibiofilm and antimicrobial activity against multidrug resistant *Staphylococcus aureus

Bárbara de Azevedo Ramos¹, barbara.a.ramos@hotmail.com

Amanda Virgínia Barbosa¹, amandavirginia88@gmail.com

José Adelson do Nascimento Júnior¹, juniior.aalves@live.com

Bruno Souza Santos¹, souza.farmacia@hotmail.com

Flávia Brust², flaviabrust@gmail.com

Alexandre Gomes da Silva¹, agsilva@live.com

Rafael Matos Ximenes³, ximenesrm@gmail.com

Alexandre Macêdo², alexandre.jose.macedo@gmail.com

Márcia Vanusa da Silva¹, marciavanusa@yahoo.com.br

Maria Tereza dos Santos Correia¹, mtscorreia@gmail.com

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

²Laboratório de Biofilmes & Diversidade Microbiana, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre – RS.

³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

RESUMO

Infecções causadas por bactérias que apresentam ampla resistência a antimicrobianos representam grande desafio na saúde pública, e como o uso indiscriminado de antibióticos tem selecionado microrganismos ainda mais resistentes, cresce ainda mais o interesse em produtos de fonte naturais. A busca de plantas com atividade antimicrobiana tem aumentado devido a vários compostos que são produzidos pelo metabolismo secundário desses vegetais, no qual são eficazes nesta atividade. Dessa forma o objetivo deste artigo é avaliar a formação de biofilme de diferentes cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, e avaliar a atividade antimicrobiana e anti-biofilme de extratos de folhas de *Anacardium humile* sobre essas cepas, assim como seu perfil fitoquímico. Foram utilizadas folhas de *A. humile* St. Hil coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque, Pernambuco, seguido de extração a quente em sohxlet, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: N-hexano (AhN), clorofórmio (AhC), acetato de etila (AhE) e metanol (AhM). Para o extrato bruto (AhW) o material foi extraído por banho de ultrassom em água destilada. Somente as amostras ricas em compostos fenólicos foram utilizadas para os testes posteriores. As cepas de *S. aureus* foram cedidas pela coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, onde foi determinado o perfil de susceptibilidade e a avaliação da formação de biofilme. Foram identificados nos extratos Flavonoides, Saponinas, Monoterpenos, Sesquiterpenos, Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. Os extratos AhE, AhM e AhW foram testados contra as cepas multirresistentes e cepas formadoras de biofilme e foram eficientes, dentre eles o extrato AhM é o mais eficaz para inibir o crescimento microbiano e o extrato AhM e AhW contra a aderência das cepas para formação do biofilme confirmado através da microscopia eletrônica de varredura, podendo essa atividade estar ligada aos compostos fenólicos encontrados nesses extratos.

Palavras-chave: Anacardiaceae, Metabólitos secundários, Gram-positivos.

ABSTRACT

Infections caused by bacteria that have broad resistance to antimicrobials pose a great challenge in public health, and the indiscriminate use of antibiotics has selected microorganisms even more resistant, interest in products of natural source grows even more. The search for plants with antimicrobial activity has increased due to several compounds that are produced by the secondary metabolism of plants, which are effective in this activity. Thus, the objective of this paper is to evaluate the biofilm formation of different multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, and to evaluate the antimicrobial activity and anti-biofilm of extracts from leaves of *Anacardium humile* on these strains, as well as their phytochemical profile. Leaves of *A. humile* St. were used. Hil collected in Parque do Catimbau, in Buíque, Pernambuco, followed by hot extraction in sohxlet, following the elutropic order of the solvents: N-hexane (AhN), chloroform (AhC), ethyl acetate (AhE) and methanol (AhM). For the crude extract (AhW) the material was removed by ultrasonic bath in distilled water. Only samples rich in phenolic compounds were used for the subsequent tests. The strains of *S. aureus* were given by the collection of the Department of antibiotics from the Federal University of Pernambuco, where the susceptibility profile and evaluation of biofilm formation were determined. Flavonoids, saponins, monoterpenes, sesquiterpenes, condensed proanthocyanidins and leucoantocianidinas was identified. The extracts AhE, AhM and AhW were tested against multidrug-resistant strains and biofilm-forming strains. AhM is the most effective to inhibit microbial growth and the extract AhM And AhW against the grip of the strains for the formation of biofilm confirmed by scanning electron microscopy, so this this activity be associated to the phenolic compounds found in these extracts.

Key-words: Anacardiaceae, Secondary metabolites, Gram-positives.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* correspondem a cocos Gram-positivos, que formam arranjos semelhantes a "cachos de uva", anaeróbios facultativos, e sensíveis à enzima lisostafina (Huber & Huber, 1989). *Staphylococcus aureus* é um simbiote comensal e um patógeno oportunista. Uma vez que essa espécie invade tecidos do hospedeiro, faz com que ambas as doenças agudas e crônicas, como a bacteremia, septicemia, endocardite e síndrome do choque tóxico ocorra. Esta bactéria possui vários fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade de produzir doença. Entretanto, essas propriedades, e genotipicidade não são constantes em todas as cepas de *S. aureus*. Os principais fatores de virulência são: cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, hemolisinas, enzimas, toxinas extracelulares e leucocidinas (Koneman, Allen & Janda, 2001).

Biofilmes de *S. aureus* são constituídos principalmente de polímero de poli-N-acetil glicosamina (PNAG) (Zapotoczna, O'Neill, & O'Gara, 2016). A formação de biofilme é importante, pois esse modo de crescimento está associado a infecções crônicas e recorrentes, devido a sua resistência à terapia com antibióticos. A inibição do biofilme pode ocorrer de duas formas: através da inibição do crescimento bacteriano, pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, pela inibição da adesão bacteriana e, conseqüentemente, da formação de biofilme (Trentin, Giordani & Macedo, 2013).

Infecções causadas por bactérias que apresentam ampla resistência a antimicrobianos representam grande desafio na saúde pública, que leva ao aumento das taxas de morbimortalidade, do tempo de internação e dos gastos do sistema público de saúde. Esse sistema não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população, sobretudo no Nordeste brasileiro. Assim o uso indiscriminado de antibióticos tem selecionado micro-organismos ainda mais resistentes e dessa forma cresce o interesse em produtos de fonte naturais, onde a Implementação de Programas de Fitoterapia na Atenção Primária a Saúde vem aumentando cada vez mais (Becker, Hu, & Biller-Andorno, 2006).

A busca de plantas com atividade antimicrobiana tem aumentado devido aos compostos que são produzidos pelo metabolismo secundário desses vegetais, no qual são eficazes nesta atividade. Dentre os vegetais que representam o Domínio da Caatinga está a *Anacardium humile* A. St-Hil, conhecida também como cajuzinho-do-cerrado ou Cajuí, pertence à família Anacardiaceae e é encontrada em várias regiões do território brasileiro (Silva-Luz & Pirani, [s.d.]). Estudos recentes revelam seu potencial como larvicida (Porto et al., 2008),

antiulcerogênica (Luiz-ferreira et al., 2012), hipoglicemiante (Urzêda et al., 2013) e antimicrobiano (Ferreira et al., 2012), porém nunca descritas em atividade antimicrobiana ou antibiofilme frente a isolados de interesse clínico. Esses metabólitos secundários podem ser muito eficazes contra bactérias, sendo assim o objetivo deste artigo foi avaliar a formação de biofilme de diferentes cepas multirresistentes de *S. aureus*, e avaliar a atividade antibacteriana e anti-biofilme de extratos de folhas de *A. humile* frente a essas cepas.

METODOLOGIA

Coleta, Processamento e obtenção dos extratos

Folhas de *A. humile* A. St.-HIL foram coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque, Pernambuco e identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, do Instituto Agronômico de Pernambuco sob Voucher de número 93.117. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40 - 45°C) por quatro dias, processado em moinho de bancada seguido de extração a quente em sohxlet, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: N-hexano (AhN), clorofórmio (AhC), acetato de etila (AhE) e metanol (AhM). As amostras foram concentradas em rotaevaporador e deixadas em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Para extrato aquoso (AhW) o material foi extraído por sonicação em água destilada e posteriormente liofilizada. As amostras mais polares, AhE, AhM e AhW, foram utilizadas para os experimentos seguintes.

Cromatografia em camada Delgada

A análise do perfil fitoquímico de *A. humile*, foi determinada por Cromatografia em Camada Delgada de Sílica. A metodologia empregada para cada composto está descrita na tabela 1 (Harbome, 1998; Roberts, *et al.*, 1957; Wagner, *et al.*; 1996 e Brasseur e Angenot, 1986).

Tabela 1: Sistemas e reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada, para identificação dos metabólitos secundários dos extratos de folhas de *A. humile*.

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al. 1957

Cepas bacterianas

Foram utilizados 11 isolados clínicos de *S. aureus* e a cepa padrão (ATCC 6538) cedidos da Coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Os isolados clínicos foram coletados de diferentes sítios de infecção (Tabela 2). As culturas foram crescidas em ágar Mueller-Hinton (MH) a 37 °C por 24 h e armazenadas em glicerol a - 20 °C.

Perfil de susceptibilidade

Os isolados de *S. aureus* foram testados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos: ampicilina (AMP) 10 µg e oxacilina (OXA) 1 µg; ciprofloxacina (CIP) 5 µg; amicacina (AMI) 30 µg e gentamicina (GEN) 10 µg; clindamicina (CLI) 2 µg; clorafenicol (CLO) 30 µg; e tetraciclina (TET) 30 µg. Os experimentos foram realizados em triplicata por meio do antibiograma, através do método de difusão em discos (Kirby-Bauer) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2014). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e comparados com a tabela padrão para testes de susceptibilidade aos antibióticos e classificados como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R).

Avaliação da formação do Biofilme

Avaliação da formação através do semeio em Ágar Vermelho Congo

O ágar Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com Congo Red foi utilizado para avaliar a produção de exopolissacarídeos das cepas de *S. aureus* (37 g/L de BHI, sacarose 50 g/L, ágar 10 g/L e Congo Red 8 g/L) (Freeman, Falkiner, & Keane, 1989). O meio foi preparado como uma solução aquosa e autoclavado (121 °C durante 15 minutos), os outros componentes foram adicionados posteriormente. As bactérias foram inoculadas e as placas incubadas aerobicamente durante 24 h a 37 °C. A produção do exopolissacarídeos foi indicada pelo crescimento de colônias pretas com uma consistência cristalina seca enquanto as que as colônias das cepas não-produtoras permaneceram vermelhas. Um resultado indeterminado foi indicado por coloração vermelha das colônias, mas com morfologia colonial cristalina seca.

Avaliação da formação através da aderência em placas de microtitulação

A formação de biofilme dos isolados de *S. aureus* foi avaliada pelo método de Cristal Violeta (CV) descrito por Stepanovic et al. (2007) em Tryptic Soy Broth (TSB). A partir das leituras de densidade óptica (OD₅₇₀), As amostras foram classificadas como fracas, moderadas e fortes formadoras de biofilme. Os isolados que apresentarem valores de absorbância igual ou inferior ao controle foram classificados como não produtores de biofilme.

Atividades antimicrobianas

Determinação da concentração mínima inibitória

Os extratos de *A. humile* foram diluídos em DMSO a 2% na concentração de 2 mg/mL e foram diluídos até a concentração final de 0,0625 mg/mL. Todos os extratos foram filtrados em membrana 0,22 µm para garantir a esterilidade. A avaliação antimicrobiana foi realizada em modelo experimental de microdiluição seriada, conforme descrito pela CLSI (2014). A suspensão de bactéria foi ajustada à Densidade Ótica (OD₆₀₀) entre 0,150 a 0,200, em seguida foram adicionados os extratos nas determinadas concentrações e o meio de cultura caldo MH. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A determinação da absorbância das microplacas de 96 poços foi realizada a um comprimento de onda de 600 nm nos tempos 0 h e 24 h. Tetraciclina foi utilizada como controle de morte bacteriana.

Determinação da curva de morte bacteriana

Os procedimentos da curva de morte foram conduzidos em placas de microtitulação. As suspensões bacterianas foram preparadas em salina a 0,85% ajustando a OD₆₀₀ em (0,185 ±

0,05). Vinte microlitros de suspensão foram adicionados a 160 µL de caldo MH e 20 µL do extrato metanólico na concentração determinada como MIC₉₀. Duzentos microlitros do meio de cultura foram utilizados como controle negativo e como controle de morte bacteriana foi utilizado ampicilina e tetraciclina ao invés do extrato e como controle de crescimento bacteriano, foi utilizado somente 160 µL do meio de cultura, 20 µL de H₂O destilada e 20 µL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h e as leituras de OD₆₀₀ foram determinadas nos tempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, 22 e 24 h.

Determinação da anti-formação do Biofilme

Os isolados que apresentam moderada ou forte formação de biofilme foram testados com os extratos de *A. humile*. A atividade foi realizada através da metodologia descrita por Trentin et al. (2011), com algumas modificações, no qual 20 µL das concentrações do extrato foram adicionados na placa de microtitulação junto a 20 µL da bactéria e 160 µL do meio de crescimento TSB. A concentração final dos extratos foi então 2 e 0,2 mg/mL. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C, após a incubação o conteúdo foi removido e a placa lavada três vezes com solução salina a 0,85%. Para fixação do biofilme a placa foi incubada a 55 °C por 1 h. o biofilme foi corado com CV a 0,4 % por 10 min, e posteriormente, lavado três vezes com salina e eluído em etanol (100%). A densidade ótica foi visualizada a 570 nm.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O biofilme de *S. aureus* expostos aos extratos na concentração de 0,2 mg/mL, foram cultivados em placas de microtitulação de 96 poços (37 °C durante 24 h) com um fragmento de Slide Permanox™ em cada poço (Trentin et al., 2011). Após 24 h de incubação, os fragmentos de Lâmina Permanox™ foram fixados e armazenados em 2,5% de glutaraldeído a - 20 °C até análise microscópica. Antes da microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato (100 mM pH 7,2) e desidratadas em concentrações crescentes de acetona. As lâminas Permanox™ foram secas pela técnica de ponto crítico de CO₂ (CPD 030 Balzers, Liechtenstein), fixadas sobre stubs de alumínio, cobertas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6060).

Análises estatísticas

Todos os testes foram realizados em triplicatas, e a média e o desvio padrão foram calculados. Os gráficos e as análises de significância foram determinados com auxílio do programa *GraphPad Prism* 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Fitoquímica

Através da cromatografia em camada delgada foi possível analisar quais principais classes de metabólitos secundários estão presentes nos diferentes extratos obtidos das folhas de *A. humile*. Os resultados estão na tabela 2. É possível observar que a presença de substâncias se encontra principalmente nos extratos AhE e AhM. Flavonóides foram os principais compostos, porém os ácidos fenólicos também são encontrados no extrato AhM. Foram encontrados também traços de saponinas e de terpenos.

Tabela 2: Prospeção fitoquímica dos extratos de folhas de *A. humile*.

Classe de metabólitos secundários	AhN	AhC	AhE	AhM	AhW
Flavonoides	-	-	+++ ¹	+++ ^{1,2}	+ ¹
Derivados cinâmicos	-	-	-	+	-
Saponinas	-	-	Tr	+	-
Alcaloides	-	-	-	-	-
Triterpenos e Esteroides	+	tr	-	-	-
Monoterpenos e Sesquiterpenos	+	+	Tr	tr	-
Cumarinas	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	-	-	tr ³	++ ^{3,4}	+ ^{3,3}

Legenda: (+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente; (tr) traços. Notas: ¹monoheterosídeos de flavonoides 3'-OH e 4'-OH; ²aglicona livre de 3'-OH flavonoides; ³proantocianidinas oligoméricas; ⁴proantocianidinas poliméricas.

Sabe-se que compostos fenólicos estão presentes em grande quantidade na *A. humile* e que estes compostos são tóxicos para os micro-organismos. Estes efeitos são decorrentes da inibição enzimática ou de interações mais inespecíficas com as proteínas que ajudam no metabolismo das bactérias ou do rompimento da parede celular bacteriana (Ferreira et al., 2012; Cowan, 1999). Andrade Filho et al. (2010) identificaram no extrato aquoso de folhas da *A. humile*, taninos hidrolisáveis, saponinas e açúcares redutores. Dentre esses as saponinas são

conhecidas como agentes antimicrobianos, antifúngicos e citotóxicos (Jin et al., 2017; Bilal et al., 2017; Soberón et al., 2017) que podem estar atuando em conjunto com os compostos fenólicos presentes nos extratos deste trabalho.

Perfil de susceptibilidade

As cepas são denominadas multirresistentes (MDR) a partir dos resultados do teste de susceptibilidade *in vitro*. A definição mais aceita para esta classificação é quando a bactéria é resistente a pelo menos um antibiótico de três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012). O perfil de suscetibilidade e a classificação das cepas avaliadas estão descritos na Tabela 3. Infecções causadas por micro-organismos multirresistentes são preocupantes devido à falta de antimicrobianos disponíveis para o tratamento destas infecções, essa dificuldade da terapia leva menores resultados nos pacientes. Esse problema aumenta ainda mais considerando um menor número de novos agentes antimicrobiano lançados no mercado nos últimos anos (Magiorakos et al., 2012; Butler, Blaskovich, & Cooper, 2013).

Tabela 3: Espécime clínico, perfil de resistência frente a antimicrobianos e análise da formação de biofilme de cepas de *S. aureus* multirresistentes.

Cepas	Espécime clínico	Resistência a antimicrobianos	Classificação de resistência	Produção de polissacarídeo	Formação do biofilme
02	Cepa padrão ATCC 6538	-	-	P	+++
671	Fragmento de osso	AMP, OXA, CIP, AMI, GEN, CLI, CLO e TET	MDR	N	++
679	Secreção de ferida operatória	AMP e OXA	MRSA	P	-
683	Exsudato purulento	AMP, OXA CIP, AMI, GEN, CLI e TET	MDR	N	+
691	Ponta de cateter	CIP, AMI e CLO	MDR	N	+
699	Ponta de cateter	AMP e OXA		N	-
700	Secreção de úlcera	AMP, OXA, CIP, AMI, GEN, CLI, CLO e TET	MRSA	P	++
705	Ferida operatória	CIP	-	P	++
709	Exsudato purulento	AMP, OXA, CIP, AMI, GEN, CLI, CLO e TET	MDR	P	++
726	Secreção nasal	AMP, OXA, CIP, AMI, GEN, CLI, CLO e TET	MDR	P	++
731	Secreção de ferida operatória	AMP, CIP, CLI e CLO	MDR	P	++
733	Fragmento de osso	AMP, OXA, CIP e CLO	MDR	N	-

Legenda: S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente. P – produz slime, N – não produz slime. Formação de biofilme: (+) fraca, (++) moderada, (+++) forte, (-) não produz.

Análise da formação do Biofilme

Através do Congo Red é possível observar a produção de polissacarídeo extracelular pela alteração da coloração de vermelho para bordo ou preto e pelo aspecto seco da colônia. Colônias vermelhas e brilhantes são características da não produção de polissacarídeo extracelular, colônias bordo e brilhantes caracterizam uma produção intermediária e colônias bordo ou preta de aspecto seco caracterizam as cepas fortes produtoras de polissacarídeo extracelular (Figura 1).

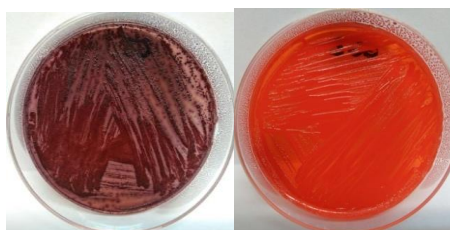


Figura 1: Análise da produção de slime através do ágar vermelho congo. Cepa produtora à esquerda e cepa não produtora à direita.

Das doze cepas de *S. aureus* testadas, cinco cepas não são produtoras (Tabela 3). Para confirmação da produção de biofilme foi utilizado o método de CV. Esse método classifica as cepas em três níveis: fraca, moderada ou forte formadora de biofilme, quando comparados com a OD₅₇₀ do controle negativo (Stepanovic et al., 2007). Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnet com significância de $p < 0,05$ e estão apresentados na Figura 2 e na Tabela 3. As cepas 679, 699 e 733 foram consideradas cepas não produtoras de biofilme. Dessas cepas somente a 679 teve capacidade de produzir polissacarídeo extracelular, porém não aderiu biofilme, e as cepas 671, 683 e 691 não produziram polissacarídeo extracelular mas aderiram e formaram biofilme. Essa diferença pode estar associada à subjetividade das provas fenotípicas. Lianou & Koutsoumanis, 2012, mostraram que a capacidade de formação de biofilme de *Salmonella enterica* é influenciada por diversos fatores como pH, período de incubação e o meio de crescimento, assim como Stepanovic et al. (2007) identificou as condições ideais para formação de biofilme de *S. aureus*, sendo este método mais usado para avaliar a formação de biofilme dessa espécie bacteriana.

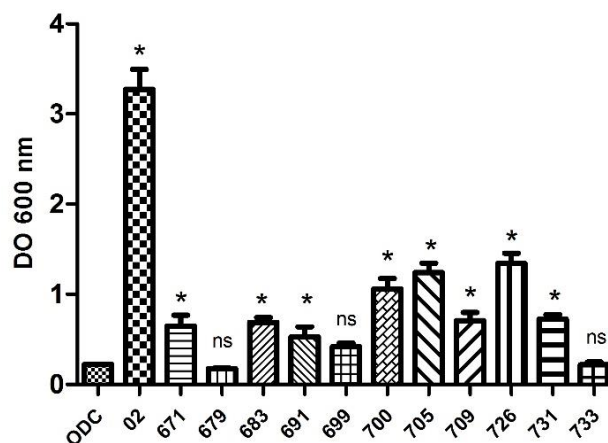


Figura 2: Análise da formação de biofilme através do método do cristal violeta. Cepas multirresistentes de *S. aureus* comparadas com a ODC de acordo com o método de Stepanovic, S. *et al.* (2007). ODC – Densidade ótica do controle. * $p < 0,05$ vs. ODC. ns – não apresenta diferença significativa vs. ODC.

Atividades antimicrobianas

Produtos naturais proporcionam ponto de partida para a maioria das principais classes de antibióticos. Desde 2000, 22 novos antibióticos foram lançados para o tratamento de infecções, dentre eles três possui sua origem em produtos naturais: a daptomicina (obtido da fermentação do *Streptomyces pristinaspiralis*), a retapamulina (derivado semissintético do composto pleuromutilina, isolado por meio de fermentação do *Clitopilus passeckerianus*) e a fidaxomicina (produto obtido da fermentação do actinomiceto *Dactylosporangium aurantiacum hamdenesis*) (Harvey, Edrada-Ebel, & Quinn, 2015; Butler, Blaskovich, & Cooper, 2013). Essas descobertas torna a investigação de novos antibióticos através de fontes naturais ainda mais importante.

Os extratos AhE, AhM e AhW foram testados contra as bactérias da coleção do Departamento de Antibióticos. O extrato AhW não apresentou atividade antimicrobiana frente a nenhuma das cepas testadas, já o extrato AhE na concentração de 2 mg/mL inibiu, aproximadamente, 50% do crescimento bacteriano na maioria das cepas, com exceção da 679 no qual inibiu 70% do crescimento. O extrato AhM inibiu 70 ou 90% de algumas cepas na concentração de 2 mg/mL, em algumas cepas ainda conseguiu inibir 50, 70 ou 90% na concentração de 1 mg/mL (Tabela 4).

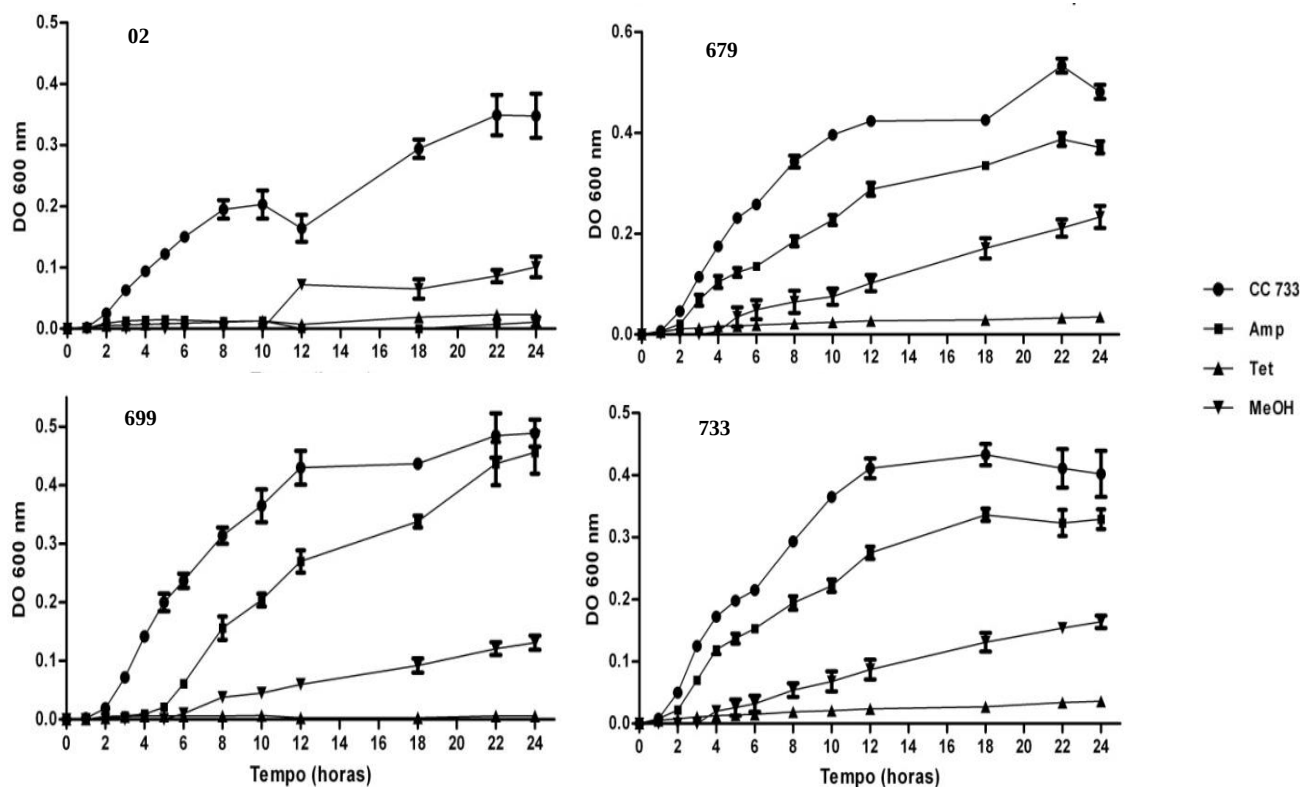
Tabela 4: Resultados da concentração inibitória mínima de folhas de *A. humile* contra cepas de *S. aureus* multirresistentes.

Cepas de <i>S. aureus</i>	AhE		AhM		Tetraciclina
	CMI (%)	(mg/mL)	CMI (%)	(mg/mL)	CMI (mg/mL)
02	50	2	90	2	0,1
679	70	2	90	2	0,03125
683	50	2	70	1	> 0,5
699	50	2	90	1	> 1
700	50	2	70	2	0,25
705	50	2	50	2	0,03125
709	50	2	50	1	0,0625
731	50	2	70	2	0,03125
733	50	2	90	2	0,03125

Legenda: CIM – concentração inibitória mínima em porcentagem dos extratos: acetato de etila (AhE), e metanólico (AhM), representados por CIM 50, 70 ou 90 por cento e sua respectiva concentração em miligrama por mL (mg/mL) sobre as cepas multirresistentes de *S. aureus*.

Pereira et al. (2011) considera extratos com alta atividade antimicrobiana, quando CIM < 5 mg/mL e mostrou que o extrato de folhas de *A. humile* coletadas no estado de Minas Gerais possui atividade antimicrobiana eficaz contra *S. aureus* (ATCC 12692), com CIM = 1 mg/mL, corroborando com os resultados obtidos pelo extrato AhM nesse estudo. Ferreira et al. (2012) mostraram que taninos isolados de folhas de *A. humile* foram capazes de inibir o crescimento de diferentes cepas: *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Liu et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana do ácido gálico frente *S. aureus*, o qual apresentou CIM e concentração bactericida mínima (CMB) de 2 e 8 mg/mL, respectivamente, evidenciando que metabólitos secundários possuem atividade antimicrobiana.

O crescimento das cepas 02, 679, 699 e 733 foi então avaliado durante as 24 horas, quando submetidas ao extrato AhM na concentração de 2 mg/mL, que inibiu 90% do crescimento destas cepas, comparados com os antibióticos, ampicilina e tetraciclina (no antibiograma as cepas são resistentes a ampicilina e sensíveis a tetraciclina). Comparando a OD₆₀₀ do controle de crescimento das bactérias e a OD₆₀₀ da bactéria submetida ao extrato, observa-se a inibição eficiente, principalmente na cepa 02, no qual o extrato é bactericida até 10 horas de crescimento bacteriano, e as cepas 679 e 699, no qual o extrato inibiu o crescimento durante as primeiras 4 h (Figura 3).



Figuras 3: Dados da curva de morte das cepas 02, 679, 699 e 733, submetidas ao extrato AhM durante as 24 horas de crescimento. Amp – ampicilina, Tet – tetraciclina, CC – controle de crescimento da cepa. AhM – extrato metanólico.

Os antimicrobianos a partir de produtos naturais são uma solução potencialmente interessante para o tratamento e prevenção da formação de biofilmes, particularmente por causa da provável não toxicidade (Liu et al., 2016). A atividade anti-formação do biofilme dos extratos das folhas de *A. humile* foi testada em cepas capazes de formar biofilme moderadamente ou fortemente (Tabela 5). O extrato AhM também foi eficaz na inibição da formação do biofilme inibindo de 40 a 80% a formação do biofilme das cepas de *S. aureus*, na concentração de 2 mg/mL e alguns na concentração de 0,2 mg/mL. O extrato AhE não é tão eficaz, porém o extrato AhW, que não apresentou nenhuma inibição do crescimento bacteriano, conseguiu inibir a produção do biofilme em algumas cepas, variando de 37 a 80%, na maior concentração testada e de 3 a 65% na menor concentração. Dias-Souza et al. (2016) analisaram a atividade antibiofilme de polpas comerciais de caju comercializadas no estado de Minas Gerais, e mostraram que a menor concentração que inibiu biofilme de *S. aureus* foi de 500 µg/mL.

Tabela 5: Resultados da anti-formação do biofilme de folhas de *A. humile* sobre as cepas multirresistentes de *S. aureus*.

Cepas de <i>S. aureus</i>	AhE (%)		AhM (%)		AhW (%)	
	2 mg/mL	0,2 mg/mL	2 mg/mL	0,2 mg/mL	2 mg/mL	0,2 mg/mL
02	89,2 ± 0,9	28,7 ± 1,0	68,9 ± 3,5	76,9 ± 2,1	80,7 ± 1,4	65,3 ± 9,1
671	69,5 ± 2,8	75,6 ± 0,8	48,6 ± 3,2	69,6 ± 1,5	59,1 ± 8,0	77,8 ± 3,7
700	IC	69,6 ± 4,0	62,5 ± 2,9	63,8 ± 3,4	52,1 ± 6,7	17,6 ± 5,8
705	IC	Nd	25,3 ± 6,9	Nd	55,1 ± 1,9	Nd
709	IC	nd	40,7 ± 7,0	Nd	52,3 ± 2,2	3,2 ± 1,3
726	IC	nd	42,5 ± 6,6	Nd	37,2 ± 6,1	Nd
731	IC	IC	76,3 ± 8,7	84,5 ± 0,9	IC	IC

Legenda: Anti-formação do biofilme em porcentagem dos extratos: acetato de etila (AhE), metanólico (AhM) e aquoso (AhW), representados em porcentagem de inibição nas concentrações determinadas em miligrama por mL (mg/mL) sobre as cepas resistente de *S. aureus* que formaram biofilme moderadamente ou fortemente. nd – não inibi a formação do biofilme, IC – amostra inibi o crescimento microbiano.

Microscopia eletrônica

O efeito dos extratos AhM e AhW foi avaliado em duas cepas de *S. aureus*, a 02 e a 731 (ATCC e MDR, respectivamente) através da microscopia eletrônica de varredura. É possível observar que o controle de crescimento mostra a aderência do biofilme, evidenciado colonização e camadas celulares sobre a lâmina (Figura 4). Quando comparado com as cepas submetidas aos extratos é possível observar a diminuição da adesão microbiana. A cepa 731 quando submetida ao extrato aquoso, não obteve crescimento, através do método do cristal violeta, sendo possível observar este resultado também através da microscopia (Figura 4F). Esses dados comprovam a atividade antibiofilme dos extratos de folhas de *A. humile*, mostrados anteriormente e corroboram com achados de Brambilla et al. (2017) que observaram a diminuição do biofilme de *S. aureus* MRSA e MSSA quando administrados o extrato diclorometano de *Piper regnellii*, confirmados pela microscopia eletrônica.

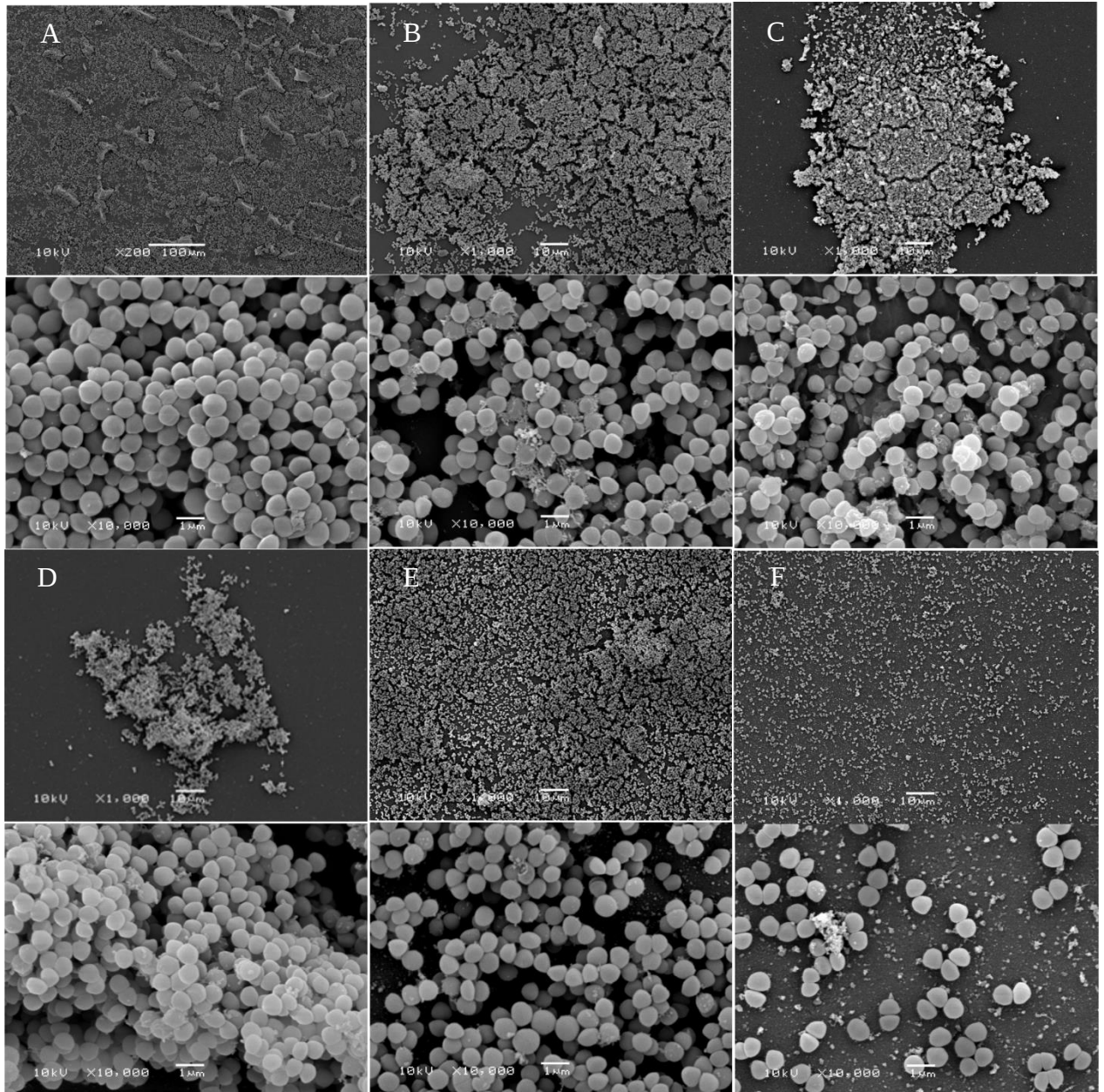


Figura 4: Microscopia eletrônica das cepas 02 e 731, submetidas aos extratos AhM e AhW. Cada letra é composta de duas imagens representando o aumento de x1.000 e o de x10.000. A – Controle de crescimento da cepa 02, B – Cepa 02 submetida ao extrato AhM, C - Cepa 02 submetida ao extrato AhW, D - Controle de crescimento da cepa 731, E - Cepa 731 submetida ao extrato AhM e F – Cepa 731 submetida ao extrato AhW.

CONCLUSÃO

As cepas de *S. aureus*, apresentam multirresistencia a antibióticos e também se mostraram produtoras de biofilme, conferindo ainda mais resistência. Os extratos de *A. humile* são eficientes contra as cepas bacterianas testadas, dentre eles o extrato AhM é o mais eficaz para inibir o crescimento microbiano e o extrato AhM e AhW contra a aderência das cepas para formação do biofilme, podendo essa atividade estar ligada aos compostos fenólicos presentes já descritos em alguns trabalhos. Estudos dessas atividades com compostos isolados da planta, assim como a atuação deles juntamente com antibióticos são necessários para melhor entendimento desta eficiência.

REFERÊNCIAS

- Abee, T., et al. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 172–179.
- Andrade Filho, N.N., et al. (2010). Toxicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* para *Bemisia tuberculata*. *Ciência Rural*, 40(8), 1689–1694.
- Becker, K., Hu, Y., & Biller-Andorno, N. (2006). Infectious diseases - A global challenge. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(4–5), 179–185.
- Bilal, M., et al. (2017). Macromolecular agents with antimicrobial potentialities : A drive to combat antimicrobial resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 554–574.
- Brambilla, L.Z.S., et al. (2017). Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 112–117.
- Butler, M.S., Blaskovich, M.A., & Cooper, M.A. (2013). Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *The Journal of antibiotics*, 66(10), 571–91.
- Costerton, J.W. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(1999), 1318–1322.
- Dias-Souza, M.V., et al. (2016). Antibiofilm activity of cashew juice pulp against *Staphylococcus aureus*, high performance liquid chromatography/diode array detection and gas chromatography-mass spectrometry analyses, and interference on antimicrobial drugs. *Journal of Food and Drug Analysis*, (November), 1–8.
- Ferreira, P. R, et al. (2012). Antibacterial activity tannin-rich fraction from leaves of *Anacardium humile*. *Ciência Rural*, 42(10), 1861–1864.
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–33.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., & Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872–4.
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R.J. (2015). The re-emergence of natural products for

- drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111–129.
- Huber, M.M., & Huber, T.W. (1989). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to lysostaphin. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(5), 1122–1124.
- Jin, Z., et al. (2017). Antimicrobial activity of saponins produced by two novel endophytic fungi from *Panax notoginseng*. *Natural Product Research*, 6419 (February).
- Koneman E.W., Allen S.D. & Janda, W.M. (2001). Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido (5.ed.). Rio de Janeiro: MEDSi.
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K.P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 171–178.
- Liu, M., et al. (2016). The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food Control*, 1–6.
- Luiz-ferreira, A., et al. (2012). Antiulcerogenic activity of the aqueous fraction of *Anacardium humile* St . Hil (Anacardiaceae), 6(40), 5337–5343.
- Mack, D. (1996). The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear [beta]-1,6-linked glycosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.*, 178(1), 175–183.
- Magiorakos, A.P., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- Murphy Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Pereira, E., et al. (2011). In vitro Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. *Planta Medica*, 77(4), 401–404.
- Porto, K.R.D.A., et al. (2008). Atividade larvícida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(6), 586–589.
- Silva-Luz, C.L., & Pirani, J.R. (2010). Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobra>>

Acesso em: 6 de novebro de 2016.

- Soberón JR, et al. (2017). Antifungal activity and cytotoxicity of extracts and triterpenoid saponins obtained from the aerial parts of *Anagallis arvensis* L. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Stepanovic, S., et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891–899.
- Trentin, D.D.S., Giordani, R.B., & Macedo, A.J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. *Revista Liberato*, 14(22), 113–238.
- Trentin, D.D.S., et al. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 327–335.
- Urzêda, M.A., et al. (2013). Evaluation of the hypoglycemic properties of *Anacardium humile* aqueous extract. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*.
- Zapotoczna, M., O'Neill, E., & O'Gara, J.P. (2016). Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS Pathogens*, 12(7), 1–6.

ANEXO C – Parecer de aprovação do comitê de ética



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 124/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Rafael Matos Ximenes**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.039016/2016-08

Certificamos que a proposta intitulada “**Potencial antioxidante e hepatoprotetor do extrato metanólico das folhas de *Anacardium humile* St. Hil (Anacardiaceae) da Caatinga de Pernambuco**”, registrada com o nº **23076.039016/2016-08**, sob a responsabilidade de Prof. **Rafael Matos Ximenes** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 31/03/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss
Nº de animais	45
Peso/Idade	25-35g/60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos/CB/UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

