



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LEILA MARIA DE SOUSA ANDRADE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INTRÍNSECA DE *Arrabidaea brachypoda* E
SUA AÇÃO MODULADORA DA RESISTÊNCIA A NORFLOXACINA EM
*Staphylococcus aureus***

TERESINA – PIAUÍ
FEVEREIRO/2019

LEILA MARIA DE SOUSA ANDRADE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INTRÍNSECA DE *Arrabidaea brachypoda* E
SUA AÇÃO MODULADORA DA RESISTÊNCIA A NORFLOXACINA EM
*Staphylococcus aureus***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto

TERESINA – PIAUÍ

FEVEREIRO /2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A553a Andrade, Leila Maria de Sousa.
Atividade microbiana intrínseca de Arrabidaea
brachypoda e sua ação moduladora da resistência a
norfloxacin em Staphylococcus aureus. / Leila Maria de
Sousa Andrade. - 2019.

67 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Teresina, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto”.

1. Ciências farmacêuticas. 2. Atividade Antimicrobiana.
3. Resistência Microbiana. 4. Arrabidaea brachypoda.
I. Título.

CDD: 615

LEILA MARIA DE SOUSA ANDRADE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INTRÍNSECA DE *Arrabidaea brachypoda* E
SUA AÇÃO MODULADORA DA RESISTÊNCIA A NORFLOXACINA EM
*Staphylococcus aureus***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto

Aprovada em 26 /02 /2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto (Orientador)
(Departamento de Parasitologia e Microbiologia - UFPI)

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho (Examinador Interno)
(Departamento de Bioquímica e Farmacologia - UFPI)

Prof.^a Dra. Érika de Araújo Abi-Chacra (Examinador Externo)
(Departamento de Parasitologia e Microbiologia– UFPI)

Prof.^a Dra. Cláudia Quintino da Rocha (Suplente)

(Departamento de Química – UFMA)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Prof.^a Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof.^a Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. André Luís Menezes de Carvalho

*Dedico essa conquista aos meus pais, fonte inesgotável de inspiração e amor, a vocês
que acreditam em mim até quando eu mesma não me julgo capaz.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Joseline, Marcelo, Kilson e Nilton, meus melhores amigos e principais influenciadores de vida.

Aos meus sobrinhos, minha alegria, para os quais desejo ser sempre um bom exemplo.

Aos meus cunhados e cunhadas pela torcida.

Às minhas avós *in memoriam* Mariah, e Lina Rosa pelo exemplo de conduta e força.

Ao meu marido Wesley, amor da minha vida, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto Federal do Piauí, pela parceria e torcida.

À Universidade Federal do Piauí e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), na pessoa do Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes, pela oportunidade de obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ao meu orientador, professor Dr. Humberto Medeiros Barreto, pela disponibilidade, paciência e generosidade ao compartilhar comigo seus conhecimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), em especial, ao Professor Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo, pelos incentivos e disponibilidade.

À Dra. Cláudia Quintino da Rocha pela imprescindível colaboração e atenção dedicada a esse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM) Andressa, Ayla, Luciana e Felipe pelo auxílio e parceria.

Aos meus colegas da turma PPGCF 2017, pelo apoio e prazeroso convívio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

E principalmente agradeço a Deus e à Maria Santíssima, por me abrirem tantas portas e me permitirem tamanha realização.

Muito obrigada a todos!

“A esperança tem duas filhas lindas, a indignação e a coragem; a indignação nos ensina a não aceitar as coisas como estão; a coragem, a mudá-las.”

(Santo Agostinho)

ANDRADE, Leila Maria de Sousa. Atividade antimicrobiana intrínseca de *Arrabidaea brachypoda* e sua ação moduladora da resistência a norfloxacina em *Staphylococcus aureus*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFPI. Teresina, PI, 2019, 67p.

RESUMO

Produtos de origem vegetal são uma das principais fontes de descoberta de novos fármacos. A enorme biodiversidade brasileira justifica o crescimento significativo dos estudos em busca de novas moléculas biotivas. O gênero *Arrabidaea* pertence à família Bignoniaceae, cujas espécies estão amplamente distribuída em regiões tropicais. *Arrabidaea brachypoda*, popularmente conhecida no Brasil como “cipó-uma”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo”, é um arbusto nativo do cerrado brasileiro, encontrado em vários estados, amplamente utilizado na medicina popular para o tratamento de doenças renais e dores articulares. Estudos comprovam atividades biológicas de suas folhas, raízes e caule. O presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico (FLAB-Et), da fração diclorometano (FLAB-DCM) e de seus compostos isolados contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*: as chalconas CH-1, CH-3, CH-4 e CH-5, e os flavonóides diméricos Braquidina A (BR-A) e Braquidina B (BR-B). Além disso, também pretendeu-se avaliar os efeitos destes produtos naturais e compostos isolados na atividade da Norfloxacina contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente às fluoroquinolonas devido à superexpressão da bomba de efluxo NorA (SA1199-B). Foram realizados ensaios de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra diferentes microrganismos. Os resultados indicaram que FLAB-Et, FLAB-DCM, CH-1, CH-4, CH-5 e BR-A não apresentaram atividade antimicrobiana intrínseca significativa (CIM \geq 1024 $\mu\text{g/mL}$) para nenhuma das cepas testadas. Somente CH-3 e BR-B demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans*. A adição do FLAB-ET, da FLAB-DCM, bem como dos compostos isolados CH-1, CH-3, CH-4, CH-5 e BR-B ao meio de cultura em concentrações subinibitórias provocou uma redução nas CIMs da Norfloxacina e do BrEt contra a linhagem SA1199-B, indicando que estes compostos naturais são moduladores da resistência às fluoroquinolonas. Além disso, BR-B foi capaz de inibir o efluxo de BrEt na cepa SA1199-B, confirmando que este composto é um inibidor de NorA. A BR-B isolada foi capaz de inibir um importante mecanismo de resistência prevalente em cepas de *S. aureus*, portanto seu uso em combinação com Norfloxacina pode ser considerado como uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo, tais como NorA.

Palavras-chave: *Arrabidaea brachypoda*; Atividade Antimicrobiana; Resistência Microbiana; Norfloxacina.

ANDRADE, Leila Maria de Sousa. Intrinsic antimicrobial activity of *Arrabidaea brachypoda* and its modulating action of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFPI. Teresina, PI, 2019, 67p.

ABSTRACT

Products of plant origin are one of the main sources of discovery of new drugs. The enormous Brazilian biodiversity justifies the significant growth of studies in search of new bioactive molecules. The genus *Arrabidaea* belongs to the family Bignoniaceae, whose species are widely distributed in tropical regions. *Arrabidaea brachypoda*, popularly known in Brazil as "cipó-uma", "dyer" or "beer of the field", is a native shrub of the Brazilian cerrado, found in several states, widely used in folk medicine for the treatment of renal diseases and pains articular. Studies prove the biological activities of its leaves, roots and stem. The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanol extract (FLAB-Et), dichloromethane fraction (FLAB-DCM) and its isolated compounds against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*: chalcones CH-1, CH-3, CH-4 and CH-5, and the dimeric flavonoids Brachydina A (BR-A) and Brachydina B (BR-B). In addition, it was also intended to evaluate the effects of these natural products and isolated compounds on the activity of Norfloxacin against strain of *Staphylococcus aureus* resistant to fluoroquinolones due to the overexpression of the NorA efflux pump (SA1199-B). Microdilution assays were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against different microorganisms. The results indicated that FLAB-Et, FLAB-DCM, CH-1, CH-4, CH-5 and BR-A showed no significant intrinsic antimicrobial activity ($MIC \geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$) for any of the strains tested. Only CH-3 and BR-B demonstrated antifungal activity against *Candida albicans*. The addition of FLAB-Et, FLAB-DCM, as well as the isolated compounds CH-1, CH-3, CH-4, CH-5 and BR-B to the culture medium in subinhibitory concentrations caused a reduction in the MICs of Norfloxacin and BrEt against strain SA1199-B, indicating that these natural compounds are modulators of resistance to fluoroquinolones. In addition, BR-B was able to inhibit efflux of EtBr in strain SA1199-B, confirming that this compound is an inhibitor of NorA. Isolated BR-B was able to inhibit an important mechanism of resistance prevalent in strains of *S. aureus*, so its use in combination with Norfloxacin can be considered as an alternative for the treatment of infections caused by strains of *S. aureus* that overexpress pumps of efflux, such as NorA.

Keywords: *Arrabidaea brachypoda*; Antimicrobial Activity; Microbial Resistance; Norfloxacin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fotografia de flores da *Arrabidaea brachypoda*.
..... 35
- Figura 2** - Estrutura química das chalconas isoladas da fração diclorometano da flor de *Arrabidaea brachypoda*, CH-1(A), CH-3 (B), CH-4(C) e CH-5(D).
.....44
- Figura 3** - Estrutura química das Braquidinas isoladas da fração diclorometano da flor de *Arrabidaea brachypoda*, BR-A (A) e BR-B (B).
.....45
- Figura 4** - CIMs de Norfloxacina (Nor) (A) e Brometo de Etídio (EtBr) (B) na ausência ou presença do extrato etanólico das flores de *A. brachypoda* (FLAB-Et), sua fração de partição de diclorometano (FLAB-DCM), e Clorpromazina (CPZ) contra SA1199-B. Cada resultado é a média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).
..... 49
- Figura 5** - CIMs de Norfloxacina (Nor) (A) e Brometo de Etídio (EtBr) (B) na ausência ou presença dos compostos isolados BR-A e BR-B, bem como Clorpromazina (CPZ) contra SA1199-B. Cada resultado é a média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).
.....50
- Figura 6** – CIMs da norfloxacina (Nor) (A) e do Brometo de Etídio (EtBr) (B) na ausência e na presença dos compostos CH-1, CH-3, CH-5, CH4 e CPZ (A) contra *S. aureus* SA1199-B. Cada resultado representa a média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).
..... 52
- Figura 7** - Efeito da BR-B no acúmulo de EtBr por *S. aureus* SA1199-B superexpressando norA. A suspensão bacteriana foi acrescida de EtBr (3 µg/ml) na presença ou ausência de BR-B ou CPZ em concentrações sub-inibitórias. A fluorescência final relativa foi calculada subtraindo todos os pontos pelo respectivo

controle (branco). Diferença na Fluorescência Final Relativa obtida na ausência ou presença de BR-B ou CPZ foi considerada como indicativa de inibição de efluxo.

..... **53**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Critérios para avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca de produtos de origem vegetal de acordo com a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

.....41

Tabela 2 – Média Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do Extrato Etanólico (FLAB-Et) e Fração Diclorometano (FLAB-DCM) da flor da *Arrabidaea brachypoda* contra os microrganismos.

.....46

Tabela 3 – Média das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos isolados Fração Diclorometano (FLAB-DCM) da flor da *Arrabidaea brachypoda* contra os microrganismos.

.....47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

BHI – Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM- Concentração Inibitória mínima

CCS – Centro de Ciências da Saúde

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

EHEC - *E. coli* enterohemorrágica

EIEC- *E. coli* enteroinvasiva

ETEC- *E. coli* enterotoxigênica

EaggEC- *E. coli* enteroagregativa

DHEC - *E. coli* associada à diarreia hemolítica

CDT – *E. coli* produtora de toxina citoletal

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

IRAS - Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde

OMS - Organização Mundial da Saúde

MSF- Grande família de facilitadores transmembrana (*Major facilitator superfamily*)

CPZ – Clorpromazina

EtBr – Brometo de Etídio

FLAB-Et- Extrato etanólico da flor da *Arrabidaea brachypoda*

FLAB-DCM- Fração diclorometano do extrato etanólico da flor da *Arrabidaea brachypoda*

BR-A – Brachydina A

BR-B – Brachydina B

H₂O – Água

µg – Microgramas

µL – Microlitros

mL- Mililitro

g – gramas

mm – milímetro

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography)

UVvis- Ultravioleta visível

DCM – Diclorometano

FIA – Análise por Injeção de Fluxo (Flow Injection Analysis)

ESI – Ionização Eletrospray (Ionization Eletrospray)

IT – Interface de Prisão de Íons (Ion Prison Interface)

MS – Espectro de Massa (Mass Spectrum)

V – Volt

AU - Unidade Arbitrária (Arbitrary Unit)

m – Metro

MeOH – Metanol

m/v – Massa/volume

NOR – Norfloxacin

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 Doenças infecciosas.....	22
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	24
3.1.3 <i>Candida albicans</i>	25
3.2 Resistência bacteriana	27
3.3 Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas	30
3.4 Produtos naturais	32
3.5 A família Bignoniaceae	33
3.6 O gênero <i>Arrabidaea</i>	34
3.7 <i>Arrabidaea brachypoda</i>	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Metodologia de obtenção de extrato, frações e compostos puros de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	37
4.1.1 Coleta do material botânico	37
4.1.2 Preparação do extrato etanólico	37
4.1.3 Obtenção da fração diclorometânica.....	37
4.1.4 Isolamento dos compostos	38
4.1.5 Identificação dos compostos	38
4.2 Linhagens microbianas e compostos químicos.....	39
4.3 Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)...	39
4.4 Avaliação da atividade moduladora da resistência às fluoroquinolonas.	41
4.5 Avaliação da atividade inibidora de bombas de efluxo	42
4.6 Ensaio de inibição do efluxo de Brometo de etídio.....	42
4.7 Análises estatísticas	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	55

7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: Inhibition of the6NorA efflux pump of <i>Staphylococcus aureus</i> by Brachyidin B from <i>Arrabidaea brachypoda</i>.....	68
ANEXO B – DRAFT DO ARTIGO SUBMETIDO AO PERÍODIO JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, QUALIS A2 NA ÁREA DE FARMÁCIA (FATOR DE IMPACTO: 3.885.....	69

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais representam importantes fontes de substâncias bioativas a partir das quais se torna possível o desenvolvimento de novos fármacos, que podem ser formulados com moléculas isoladas ou extratos vegetais padronizados (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Em toda sua extensão, o Brasil apresenta uma enorme e diversificada flora, sendo detentor da maior biodiversidade do mundo, contém um vasto repertório de plantas com usos medicinais, e princípios ativos ainda desconhecidos, o que justifica o crescente número de estudos de caracterização química e verificação de atividades farmacológicas visando à descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (BOLZANI, 1999). A pesquisa e o desenvolvimento de produtos fitoterápicos são crescentes em todo o mundo, autores brasileiros publicam milhares de artigos científicos por ano voltados a esse tema. (DUTRA *et al.*, 2016)

No entanto, países considerados megabiodiversos como Brasil, Colômbia, México, Panamá, Peru, Equador e Costa Rica são responsáveis por apenas 5% de todo o mercado de fitoterápicos, que tem grande expressão na Europa, sendo que cerca de 50% deste mercado concentra-se na Alemanha. (ALVES, 2013).

A manipulação de produtos fitoterápicos proporcionaria ao Brasil inúmeras vantagens, desde o aumento da sua autossuficiência, com redução de importações de medicamentos, facilitando o acesso da população a maior gama de opções e ainda fortaleceria as tradições populares. Porém, apenas 4,1% de todas as formas manipuladas no Brasil são fitoterápicos, devendo-se isso, em parte, à baixa credibilidade dos fitoterápicos dentre os prescritores (VIEIRA, 2010).

O cerrado (savana brasileira), uma das formações com maior biodiversidade no Brasil, mais de 10.000 espécies de plantas, têm experimentado forte desmatamento nas últimas décadas, correspondendo à 24% do território brasileiro, estende-se pelos estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rondônia, Tocantins e São Paulo (IBGE, 2019). Neste bioma as

famílias predominantes são Fabaceae, Asteraceae, Poaceae, Rubiaceae, Bignoniaceae, Myrtaceae, Malpighiaceae, Malvaceae e Apocynaceae (GOODLAND, 1979).

A família Bignoniaceae inclui cerca de 120 gêneros e 800 espécies, sendo encontradas no Brasil 350 espécies pertencentes a 32 gêneros (SOUSA, LORENZI, 2008). Constituída por trepadeiras, árvores e arbustos essa família tem como representantes mais populares os jacarandás (*Jacaranda brasiliana*) e ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *T. avellaneadae*) usados na construção civil, carpintaria e como plantas ornamentais devido à beleza de suas florações (LORENZI,1988).

A *Arrabidaea brachypoda* é um arbusto pertencente à família Bignoniaceae, nativo do cerrado brasileiro, abundantemente ramificado com flores em inflorescências terminais de cor rosa-púrpura conhecido popularmente como “tintureiro”, “cipó-una” e “cervejinha do campo” (ALCERITO *et al.*,2002).

O tratamento de infecções bacterianas corresponde a um dos maiores desafios para a medicina moderna, pois são responsáveis por um amplo número de casos de morbidade e mortalidade em todo o mundo, além de gerarem aumento de custos exorbitantes para a saúde (KOTLOFF *et al.*, 2013;WHO,2017).

Apesar da ampla gama de antibióticos atualmente disponíveis, nos últimos anos, o crescente isolamento de organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis tem sido preocupante, tornando-se uma ameaça global à saúde humana, provocando reações indesejáveis, aumentos nos custos com cuidados à saúde e prolongando a permanência hospitalar (JEAN; HSUEH, 2012; LIVERMORE, 2012; LAXMINARAYAN, 2014).

Doenças causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Escherichia coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas são adquiridas na comunidade e em hospitais do mundo todo (GADE, QAZI, 2013; UHLEMANN, 2014).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser intrínseca ao microrganismo ou adquirida por transmissão genética ou mutação, variando os mecanismos pelos quais os antibióticos se tornam ineficazes no combate a cepas bacterianas (KRUMENAUER *et al.*,2016; MARTINEZ BUITRAGO *et al.*,2014).

Dentre os principais mecanismos de resistência bacterianos destacam-se as bombas de efluxo, estas consistem em sistemas de extrusão que conferem às bactérias resistência a múltiplas drogas, podem estar presentes tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, esses sistemas comprometem as terapias clínicas com antimicrobianos disponíveis (RAO *et al.*, 2018).

A emergência e propagação de bactérias resistentes e o surgimento de novos mecanismos de resistência, devem ser efetivamente combatidos, para tanto, defende-se uma abordagem conjunta de segmentos governamentais e sociedade, envolvendo a necessidade de proposições políticas que fomentem os investimentos em pesquisa, aquisição de tecnologias e desenvolvimento de recursos humanos (BRASIL. ANVISA, 2017).

Alguns estudos demonstram ações biológicas e toxicidade dos extratos de *A. brachypoda*, porém todos os estudos realizados referem-se aos extratos das raízes, folhas e caule, nenhum estudo ainda avaliou as potenciais atividades dos compostos oriundos da flor dessa espécie. Considerando-se o vasto uso popular da *A. brachypoda* e a crescente preocupação com o avanço da resistência bacteriana aos antimicrobianos atualmente disponíveis, torna-se relevante um estudo sobre as propriedades antimicrobianas deste vegetal, especialmente de suas flores, considerando-se inclusive possíveis atividades moduladoras da resistência, não só do seu extrato etanólico, mas também sua fração diclorometano e compostos isolados. O presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico, fração diclorometano e compostos isolados da flor de *A. brachypoda*, bem como investigar seus efeitos moduladores sobre a atividade antibiótica contra cepas de *S. aureus* superexpressando genes que codificam proteínas de efluxo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade antimicrobiana de produtos naturais e de compostos isolados obtidos à partir da flor de *Arrabidaea brachypoda*, bem como avaliar o efeito destes na modulação da resistência à norfloxacina em uma linhagem de *Staphylococcus aureus* superprodutora da bomba de efluxo NorA.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico (FLAB-Et) e da fração diclorometano (FLAB-DCM) obtidos das flores de *Arrabidaea brachypoda* contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de chalconas e braquidinas isoladas da fração FLAB-DCM contra as espécies *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.
- Avaliar o efeito modulador da resistência à norfloxacina do FLAB-Et, da FLAB-DCM, bem como dos seus compostos isolados em uma linhagem de *S. aureus* que superexpressa a bomba de efluxo NorA.
- Avaliar a ação inibidora da bomba de efluxo NorA do FLAB-Et, da FLAB-DCM, bem como dos seus compostos isolados, através de ensaios de modulação da resistência ao brometo de etídio em uma linhagem de *S. aureus* superprodutora de NorA.
- Validar a ação inibidora da bomba de efluxo NorA da Braquidina B através de ensaios de inibição do efluxo de brometo de etídio em uma linhagem de *S. aureus* superprodutora de NorA.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Doenças infecciosas

Datam do século III d.c. relatos de Galeno sobre as doenças infecciosas, onde o médico grego referia-se a “sementes da doença” em um contexto de contágio e transmissão. Em carta papal de João XXII em 1374, este faz referência a uma “horível semente de dissensão soprada no exterior pelo hálito pestilento de Satanás” (NUTTON,1983). Só, à partir de 1676, quando Antonie Leuwenhoek observou pela primeira vez “animalículos” com seu microscópio, foi admitida a hipótese da existência de vida microscópica, nascia aí a microbiologia como ciência (CUSTER, 2014).

O século XIX foi especialmente marcante no que tange à descoberta de patógenos de grande importância; foi quando Albert Neisser descobriu o gonococo, Armauer Hansen o bacilo da hanseníase, Pasteur descobriu o estreptococo e o estafilococo, Karl Joseph Ebert descobriu o bacilo do tifo, Kock descobriu os agentes causadores da tuberculose e da cólera, Albert Frankel descobriu o bacilo do tétano, Theodor Escherich identificou o bacilo coli e Anton Weichselbaum descobriu o agente causador da meningite (GORDON, 1997). Em meados de 1929, foi descoberta a penicilina, o primeiro antibiótico que modificaria o panorama das doenças infecciosas até então sem tratamento. (ROCHA et al.,2011a)

Nos últimos anos, os tratamentos das doenças infecciosas enfrentam um grave problema, pois a resistência bacteriana aos antibióticos tem aumentado rapidamente em todo o mundo, essa situação desafia a medicina e a indústria farmacêutica, neste contexto, pesquisas buscam novos tratamentos e estratégias para superar a resistência bacteriana. (SWIETNICKI, 2018) As novas pesquisas baseiam-se na descoberta de antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes dos já existentes, sejam para reduzir o potencial patogênico pela inibição dos fatores de virulência ou que atuem como adjuvantes junto a fármacos já disponíveis, inibindo o mecanismo de resistência (SALAM, QUAVE, 2018).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, atualmente o gênero é constituído por 33 espécies, das quais 17 podem ser encontradas em amostras biológicas humanas (CHA *et al.*, 2019). Em geral, os microrganismos deste gênero fazem parte da microbiota humana normal, especialmente da pele (BROWN *et al.*, 2014). A espécie de maior interesse médico atualmente é *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva de formato esférico, frequentemente relacionada a infecções variadas em humanos, principalmente aquelas adquiridas em ambientes hospitalares (BROWN *et al.*, 2014; KONEMAN *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2007).

O *S. aureus* é um microrganismo amplamente distribuído, capaz de resistir à baixas temperaturas e à dessecação, tem como seu principal reservatório o homem, podendo ser colonizador de diversas partes do corpo, tais como a pele, intestinos, garganta e principalmente nas fossas nasais sem, no entanto, causar sintomas (CARVALHO *et al.*, 2005).

As infecções por *S. aureus* variam desde infecções simples de pele (relativamente benignas) como espinhas, celulites, furúnculos a doenças sistêmicas mais graves (potencialmente fatais) como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (TONG *et al.*, 2015). *S. aureus* é também a bactéria mais comum em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas (KALINKA, 2014). Destaca-se também sua importância como maior causadora de sepse em pacientes hospitalizados por queimadura (MACEDO; CASTRO, 2018).

Pouco após a introdução da penicilina na prática clínica, as cepas de *S. aureus* desenvolveram resistência a esse antibiótico devido à produção de betalactamase, enzima que inativa a molécula do antimicrobiano, a taxa de resistência em 1959 já era de 80%, e estendia-se a amoxicilina e ampicilina (NOVICK, 1999). A resistência antimicrobiana em *S. aureus* tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias (BERNARD *et al.*, 2004).

Em 1960, foi descoberta a meticilina, a primeira penicilina semi-sintética, não susceptível à betalactamase, e logo depois foram descobertas as cefalosporinas, porém logo em 1970 foram identificadas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e também aos outros betalactâmicos, incluindo as cefalosporinas, o que limitou o

tratamento das infecções estafilocócicas a vancomicina, apesar de sua toxicidade (SANTOS *et al.*, 2007). No entanto, logo foram isoladas cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) em diversas partes do mundo, começando pelo Japão em 1997, no Brasil em 2000, e EUA em 2002 (BADDOUR; ABUELKHEIR; FATANI, 2006; TIWARI; SEN, 2006). Neste contexto de desenvolvimento progressivo de resistência aos antimicrobianos disponíveis, tornou-se um desafio para a medicina o tratamento de infecções por MRSA e VRSA (WHO, 2017a; WHO, 2017b).

Levantamentos feitos no Brasil entre 2012 e 2015 apontam o *S. aureus* como um dos patógenos mais prevalentes em infecções hospitalares, sobretudo em Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) de todo o país, além disso, 60% dos isolados demonstraram resistência à oxacilina (BRASIL. ANVISA, 2016).

Em pesquisa realizada no Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, dentre as bactérias Gram-positivas causadoras de Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS), o patógeno mais isolado em culturas no período de janeiro de 2015 a julho de 2016, foi *S. aureus* (SOARES *et al.*, 2017). No Brasil, MRSA está relacionado como um dos mais frequentes patógenos em infecções hospitalares. (ALMEIDA; FARIAS, 2015)

As cepas MRSA estão na lista de prioridades apontadas pela Organização Mundial da Saúde, como uma dos patógenos para os quais devem ser voltadas as atenções em termos de pesquisa e desenvolvimento de alternativas terapêuticas (WHO, 2017b).

3.1.2 *Escherichia coli*

A família Enterobacteriaceae é o maior e mais heterogêneo grupo de bacilos Gram-negativos de importância clínica (MURRAY; POSENTHAL; PFALLER, 2015). *Escherichia coli* é o mais comum e importante membro deste grupo, fazendo parte da microbiota humana, porém sendo causa frequente de infecções oportunistas. (GALLEGO-MALDONADO *et al.*, 2019)

E. coli é a maior causa de gastroenterites em humanos em países subdesenvolvidos, especialmente em crianças, sendo apontada como uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade do mundo (KOTLOFF *et al.*, 2013). Sete sorogrupos de *E. coli* são responsáveis pelas gastroenterites em humanos: *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *E. Coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. Coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. Coli* associada à diarreia hemolítica (DHEC) e *Escherichia coli* produtora de toxina citoletal (CDT) (KAPER, 1994;CROXEN *et al.*, 2013).

As infecções por *E.coli* não estão restritas ao trato gastrointestinal, são também importantes patógenos causadores de meningite, seps e principalmente infecções do trato urinário (MURRAY; POSENTHAL; PFALLER, 2015; FENG; HAWKS, 2018).

Escherichia coli é a enterobactéria mais frequentemente isolada de pacientes hospitalizados, chamando atenção a grande quantidade de cepas que apresentam resistência às fluoroquinolonas (GARCIA *et al.*, 2018). Estudos realizados no Brasil destacam a resistência de *E. coli* (9,7%) aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de amplo espectro (de terceira e quarta gerações) (BRASIL.ANVISA, 2017).

Em estudo realizado nos meses de janeiro de 2015 a julho de 2016, foram identificados 29 casos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) por *E. coli*, dentre 147 casos estudados no Hospital Universitário (UFPI) em Teresina, Piauí; caracterizando este patógeno como o segundo mais prevalente causador destas infecções no referido hospital, ficando atrás apenas de *Klebsiella pneumoniae* (SOARES *et al.*, 2017).

3.1.3 *Candida albicans*

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota de humanos e animais, podendo colonizar diversas partes do corpo, principalmente cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário. Em determinadas circunstâncias, relacionadas ao comprometimento imunológico, podem causar infecções (HÁ; WHITE, 1999). As espécies deste gênero são as maiores causadoras de infecções fúngicas, produzem

infecções que variam de doenças mucocutâneas de baixa gravidade a processos invasivos que podem envolver praticamente qualquer órgão (PAPPAS *et al.*, 2004).

É comum a colonização oral de pacientes HIV-positivos e transplantados por espécies de *Candida*, sendo a espécie mais prevalente *Candida albicans* (GOULART *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). As cepas de *C. albicans* destacam-se por serem as maiores causadoras de candidíase invasiva, sendo responsáveis por 50 a 70% dos casos (ARENDRUP, 2010). Dentre as IRAS causadas por fungos, *C. albicans* é um dos patógenos mais prevalentes em pacientes internados, sua ocorrência destaca-se principalmente entre pacientes de UTI's, sendo responsável por 6,7% das infecções submetidas à cultura (SANTOS *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2017).

A frequência de infecções por *Candida*, candidíases, tem aumentado nos últimos anos, esse crescimento tem relação direta com o aumento da população de risco, que inclui receptores de transplantes, pacientes com câncer e HIV-AIDS (ARENDRUP, 2010; GOULART *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). Nos Estados Unidos da América, são a quarta maior causa de infecções sanguíneas em ambiente hospitalar (KETT; AZOULAY; ECHEVERRIA, 2011). Um estudo realizado em um hospital público brasileiro demonstrou que espécies do gênero *Candida* são a oitava maior causa de infecções sanguíneas, destacando-se *C. albicans* como a espécie mais isolada, correspondendo a 59% dos casos de candidemia (FRANÇA *et al.*, 2008).

Testes de susceptibilidade antifúngica de espécies de *Candida* isoladas de pacientes diabéticos em uma unidade de saúde, demonstraram a alta prevalência de resistência de *C. albicans* aos antifúngicos, dentre as espécies isoladas esta foi a única resistente a todos os antifúngicos testados; voriconazol, lanconazol, caspofunina, anfotericina B, itraconazol, cetoconazol, posaconazol e fluconazol (HEDAYATI *et al.*, 2018) Outro fator que favorece a patogenicidade de *C. albicans* reside em sua alta capacidade de formar biofilmes, propiciando sua persistência e facilitando sua colonização, invasão e disseminação (RUIZ, 2006).

3.2 Resistência bacteriana

Um grande problema de saúde pública no mundo, a resistência bacteriana, é favorecida pelo uso, em grande escala, das mais diversas classes de antibióticos disponíveis, principalmente para combater IRAS, uma realidade muito prevalente nos serviços de saúde brasileiros (BRASIL. ANVISA, 2017).

Os primeiros medicamentos desenvolvidos para tratar doenças bacterianas foram as sulfonamidas na década de 1930 e a penicilina que chegou ao mercado uma década depois. Esta foi acidentalmente descoberta em meados de 1929 por Alexandre Fleming, que ganhou o prêmio Nobel de Medicina, pelo grande feito (PASQUALE; TAN, 2005) (ROCHA *et al.*, 2011a).

A descoberta dos antibióticos revolucionou os tratamentos das doenças infecciosas, referidas até então como incuráveis, houve uma intensa busca e intensificação das pesquisas por novas substâncias com poderes de cura para as infecções, de fato, as décadas de 40, 50 e 60 foram muito produtivas no que diz respeito ao lançamento de novos antibióticos, várias moléculas foram descritas e rapidamente incorporadas à prática clínica (BUTLER, BUSS, 2006).

O uso abusivo da penicilina após a segunda guerra mundial proporcionou o surgimento das primeiras cepas Gram-positivas resistentes à penicilina. Nos anos seguintes os antibióticos lançados no mercado, como análogos da penicilina (meticilina e cefalosporinas), além das tetraciclina e eritromicina, aos poucos foram perdendo eficácia contra cepas de estafilococos e estreptococos infecciosos. Em 1956, foi descoberta a vancomicina, esta surge como uma promessa devido a sua excelente performance frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), porém, em 1988 foi registrado o primeiro caso de resistência a vancomicina (SILVERMAN; HOLLADAY, 2014).

A diminuição do repertório de drogas eficazes no combate às infecções causa um aumento na mortalidade e custos dos tratamentos de pacientes acometidos por bactérias resistentes, o que gera uma necessidade de busca por novas alternativas terapêuticas, uma vez que já foram identificadas cepas resistentes a todas as drogas

atualmente disponíveis. Pesquisadores apontam o risco da falta de insumos terapêuticos para tratamento de infecções bacterianas como o maior problema de saúde do século, caracterizando-se como um problema mundial, que acomete todos os países, desenvolvidos ou não (KRUMMENAUER *et al.*, 2016).

Do ponto de vista epidemiológico, microrganismos resistentes são aqueles que apresentam resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos. Laboratorialmente, resistência é quando uma bactéria cresce *in vitro* na presença de um antibiótico em concentrações séricas (SIEGEL *et al.*, 2007). Resistência microbiana pode ser entendida como aquisição de mecanismos através dos quais bactérias conseguem inibir a ação dos antimicrobianos, conseguindo multiplicar-se mesmo em altas concentrações de antibióticos (MENDES; SILVA; CAVALCANTI, 2015).

A resistência bacteriana é um fenômeno inevitável e irreversível, uma vez que se desenvolve naturalmente devido à capacidade inerente às bactérias de sofrerem adaptação às mudanças. O uso irracional e indiscriminado dos antimicrobianos, que fomentam a resistência bacteriana, não está restrito apenas às ações da medicina humana e veterinária, mas também à agricultura e indústria de alimentos, onde são usados para aumentar a estabilidade dos produtos (SANTOS, 2004).

Como um fenômeno natural, a resistência é uma consequência de mutações em micróbios que são selecionados por sua vantagem competitiva frente às cepas não mutadas, o uso de antibióticos, especialmente em doses sub-ótimas ajudam nessa seleção gradual. Os genes de resistência podem ser carreados como elementos cromossômicos, e cada vez mais, como extracromossômicos (plasmidiais) transmissíveis. Esses genes de resistência, por exemplo, EUA 300 de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA), ST131 de *Escherichia coli* e ST258 de *Klebsiella* são disseminados rapidamente em todo o mundo. Essa disseminação é facilitada pela transmissão interespecífica de genes, falta de saneamento e higiene em comunidades e hospitais, e a crescente frequência de transmissão global, de viagens, comércio e doenças (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

Os avanços científicos nas áreas da saúde nos últimos anos acrescentaram à prática médica procedimentos que aumentam a sobrevivência de pacientes gravemente enfermos, por outro lado, o manejo destes pacientes e a realização de procedimentos os

expõem cada vez mais às IRAS. São admitidas como IRAS todas as infecções adquiridas após a admissão do paciente na unidade hospitalar, relacionadas a procedimentos realizados ou à permanência deste na instituição, mesmo que os sintomas manifestem-se somente após a alta do paciente (PEREIRA, 2016). Pacientes em unidades de terapia intensiva são particularmente mais vulneráveis às IRAS (KRUMMENAUER *et al.*, 2016).

Levantamentos feitos em 2015 demonstram que no Brasil ocorrem em média 23 mil mortes por ano em decorrência de infecções hospitalares, sendo que esse número pode ser ainda maior, tendo em vista as subnotificações em UTI's hospitalares. Os patógenos mais frequentes em pacientes adultos nas UTI's brasileiras são: *Klebsiella pneumoniae*, seguido de *Staphylococcus Coagulase Negativo* (SCoN) , *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* . Quanto ao perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos, entre os cocos Gram-positivos a resistência à oxacilina foi observada em 74,9% das amostras em SCoN e 57,4% das amostras de *S. aureus* e a resistência à vancomicina foi registrada em 28,8% dos *Enterococcus spp.* (BRASIL, ANVISA, 2016).

Neste contexto, também vale ressaltar que a diminuição da eficácia dos antibióticos atualmente disponíveis ameaça a saúde também na perspectiva das intervenções médicas desenvolvidas à sombra dos antibióticos, como grandes cirurgias, transplantes, tratamentos agressivos contra cânceres, e procedimentos avançados em terapia intensiva (CARS, *et al.*,2018).

Novos mecanismos de resistência aos antimicrobianos estão emergindo e se espalhando globalmente, ameaçando a capacidade de tratamento de doenças infecciosas, culminando em prolongamento de doenças, incapacitação e morte, além de elevar os custos relativos à saúde (WHO, 2017a).

Desde 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) fomenta programas e implementa estratégias à fim de conter o fenômeno da resistência aos antimicrobianos, seja pelo controle no uso dos antimicrobianos atualmente disponíveis, seja no incentivo às pesquisas em busca de novas alternativas (WHO, 2017a). As novas pesquisas baseiam-se na descoberta de antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes dos já existentes, sejam para reduzir o potencial patogênico pela inibição dos fatores de

virulência ou que atuem como adjuvantes junto a fármacos já disponíveis, inibindo seus mecanismos de resistência (SALAM, QUAVE, 2018).

3.3 Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas exibem atividade antibacteriana dependente de concentração, sua ação intracelular é resultado da inibição da atividade de duas enzimas essenciais para os processos de replicação, transcrição e recombinação, dentre outros processos. São elas DNA girase e Topoisomerase IV que exercem fundamental controle topológico sobre o DNA cromossomal (MAXWELL, 1992; DRLICA; ZHAO, 1997).

A descoberta da primeira quinolona, o ácido nalidíxico, ocorreu em 1962 como um subproduto na pesquisa antimalárica, em seguida outras quinolonas foram obtidas por modificações estruturais em seu núcleo básico. As fluoroquinolonas têm uma estrutura básica de 4-ácido quinolona-3-carboxílico, todas têm um grupo COOH na posição 3, um grupo CO na posição 4 e um F na posição 6. Na norfloxacin, a adição de um grupo piperazina na posição 7 resulta em uma melhor ação contra bactérias Gram-negativas e estafilococos (BOPHALE, 2014).

Os antibióticos quinolônicos são referidos na literatura como uma verdadeira desventura, apoiados no fato de serem substâncias sintéticas, ou seja, que não são encontradas na natureza, acreditava-se que esses medicamentos seriam imunes à resistência bacteriana, porém 30 anos após sua introdução generalizada, a resistência às quinolonas é uma epidemia (RUIZ; PONS; GOMES, 2012). Estudos genômicos completos sugerem que a resistência às quinolonas foi um fator crucial na evolução de MRSA em hospitais (HOLDEN *et al.*, 2013).

Os mecanismos de resistência às quinolonas podem ser resultado de mutações em uma ou ambas as enzimas, DNA-girase ou topoisomerase IV; ou a expressão diferencial de mecanismos de efluxo; (GUAN *et al.*, 2013). A resistência bacteriana mediada por bombas de efluxo resultam da atividade de proteínas de membrana que promovem o efluxo de antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular por

meio de transporte ativo, ou seja, com gasto de energia (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007).

Sistemas de efluxo são conhecidos desde 1980, quando foram caracterizadas formas de resistência bacteriana às tetraciclinas mediadas por plasmídeo que não inativavam as moléculas do antimicrobiano, no entanto, a resistência estava associada a uma diminuição do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana (MC MMURRY; PETRUCCI; LEVI, 1980). A resistência a diversos fármacos, incluindo tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrolídeos, e beta-lactâmicos pode ser mediada por um mecanismo de bomba de efluxo (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As bombas de efluxo podem ser específicas para o transporte de um substrato ou para substratos diversos e estruturalmente diferentes. A inibição das bombas de efluxo bacterianas pode melhorar a eficácia de antimicrobianos clinicamente relevantes pelo aumento da susceptibilidade à droga e diminuição da seleção de estirpes resistentes (BROWN; DEMETER; TURNER, 2019). Essa inibição pode ser conseguida de diferentes formas: (a) inibição do transporte do antimicrobiano através da membrana, (b) inibição da interação entre as subunidades da bomba, (c) inibição do mecanismo energético que dirige o efluxo do antimicrobiano ou (d) inibição da expressão dos genes que codificam a bomba (BRUNS *et al.*, 2017).

A bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* é um membro da *Major Facilitator Superfamily* (MSF) pertencendo ao grupo das antiportas dirigidas por prótons, possuindo uma série de substratos, tais como fluoroquinolonas hidrofílicas, tetrafenilfosfônio, puromicina, cloranfenicol, verapamil, omeprazol, reserpina, compostos de aminas quaternárias, e corantes como o brometo de etídio (THAI *et al.*, 2015).. Inibidores de NorA são apontados como potencializadores da eficácia de antimicrobianos tais como fluoroquinolonas quando testados em combinação (SILVA *et al.*, 2015; CIRINO *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016)

Diversos estudos demonstraram a atividade moduladora de NorA à partir de produtos naturais, como flavonoides C-glicosilados (SIVA *et al.*, 2015) diversos óleos essenciais (CIRINO *et al.*, 2014) compostos extraídos de algas marinhas (SILVA *et al.*, 2013) além de substâncias semi-sintéticas como as riparinas (COSTA *et al.*, 2016).

3.4 Produtos naturais

Desde os tempos antigos, o homem encontra cura para suas doenças em remédios naturais, as plantas usadas para esta finalidade são conhecidas como plantas medicinais. Estas contêm compostos químicos oriundos do metabolismo vegetal que possuem propriedades biológicas benéficas à saúde (SAUCEDA, 2011).

No nordeste brasileiro, ainda é bem comum o uso tradicional de plantas medicinais como alternativa terapêutica, os curandeiros detentores de louvável conhecimento a cerca das plantas medicinais, são popularmente conhecidos por “raizeiros”, a etnofarmacologia emprega os conhecimentos populares como base para possíveis investigações de vegetais na busca por novos medicamentos (AGRA *et al*; 2008).

A etnofarmacologia, através da cultura e do conhecimento milenar, serve de ferramenta para a descoberta de novos recursos farmacológicos, reduzindo o tempo e custo de triagem farmacológica e tóxica, pois permite conciliar o conhecimento empírico de uma população aos conhecimentos científicos (LEITÃO e OLIVEIRA, 2014).

Nos últimos anos, foi possível observar o crescente interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente vegetais, para usos farmacêuticos, neste contexto, tornou-se mais comum o uso de medicamentos fitoterápicos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010). O interesse em produtos medicinais de origem vegetal, fitoterápicos, aumentou significativamente nos últimos anos em todo o mundo, inclusive em países europeus e nos Estados Unidos da América, o mercado global para esta classe de medicamentos, movimentava mais de 20 bilhões de dólares anuais (CALIXTO, 2000).

O campo de pesquisas mais relevante do Brasil está relacionada à sua riqueza vegetal, o Brasil é detentor da maior biodiversidade do mundo, uma pesquisa realizada entre os anos de 2011 e 2013 revelou que neste período, pesquisadores brasileiros publicaram mais de dez mil artigos científicos sobre este tema (DUTRA *et al.*, 2016).

Em geral, no Brasil, os estudos sobre plantas medicinais são realizados com extratos brutos, e poucos trabalhos investigam sua toxicidade e mecanismos de ação,

apesar de muitas publicações nesta área, muito poucas plantas brasileiras são submetidas a ensaios clínicos bem controlados, dessa forma, poucos medicamentos foram desenvolvidos e aprovados pela agência nacional reguladora, a Anvisa. O mercado de fitoterápicos no Brasil ainda é muito pequeno, representando apenas 5% de todos os medicamentos comercializados (DUTRA *et al.*,2016).

O Ministério da Saúde elaborou, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, tendo como objetivo principal proporcionar à população brasileira o acesso seguro e desenvolver o uso racional e sustentável das plantas medicinais, tendo em vista também o conseqüente desenvolvimento industrial do setor de fitofármacos (BRASIL, 2006).

Neste contexto, os produtos de origem vegetal têm destaque como fonte de compostos com ação antimicrobiana, provavelmente, devido à evolução de metabólitos secundários biologicamente ativos que conferem vantagens seletivas aos organismos que as produzem, além disso produtos naturais são detentores de um elemento de complexidade estrutural necessário para interação e inibição de diversos alvos proteicos (BUTLER; BUSS, 2006).

Dessa forma, cada vez mais estudos são desenvolvidos com vistas à descoberta de novas substâncias de origem vegetal com ação antimicrobiana ou sinérgica aos antimicrobianos atualmente disponíveis, uma vez que bactérias resistentes aos tratamentos convencionais são cada vez mais frequentes, dessa forma as plantas representam uma importante fonte de possíveis alternativas antimicrobianas. A literatura sobre testes para a ação antimicrobiana de produtos vegetais é ampla, incluindo um número crescente de publicações por ano (SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

3.5 A família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae é amplamente distribuída nas regiões próximas aos trópicos e regiões subtropicais, com algumas espécies em climas temperados, sendo sua maior diversidade encontrada na região norte da América do Sul, seguida pela América Central e América do Norte (FISHER *et al.*,2004). Tratando-se de um grupo bastante

diversificado morfológicamente, subdivide-se em 120 gêneros e 800 espécies de arbustos, árvores e trepadeiras (LORENZZI,1988).

Gentry (1980) dividiu a família em oito tribos, diferindo principalmente na estrutura do ovário e caracteres de frutas: Tecomeae, Oroxyleae, Bignonieae, Eccremocarpeae, Turretiae, Coleae, Crescentiae e Schlegelieae.

Algumas espécies têm importância econômica ligada à extração da madeira, e outras cultivadas como plantas ornamentais (GENTRY, 1980). A família tem como representantes mais populares os jacarandás (*Jacaranda brasiliana*) e ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *T. avellaneadae*) usados na construção civil, carpintaria e como plantas ornamentais devido à beleza de suas florações (LORENZI,1988)

Várias espécies são relatadas como fontes de compostos ativos contra doenças como câncer, diabetes, sífilis, malária, hepatite, raiva e leishmaniose (GENTRY, 1980).

3.6 O gênero *Arrabidaea*

As plantas do gênero *Arrabidaea*, integrante da tribo Bignonieae possui mais de 70 espécies (GENTRY,1980); ocorrendo na América Tropical da porção sul do México ao centro brasileiro (COSTA; LIMA,1989). No Brasil, a maioria das espécies de *Arrabidaea* é tipicamente encontrada na região dos cerrados, porém algumas espécies podem ser encontradas nas regiões semidesérticas do Nordeste ou até mesmo na região amazônica (NORONHA, 1964).

Diversas espécies deste gênero há muito são utilizadas na medicina popular, destacando a espécie *Arrabidaea chica*, variadas são as ações biológicas a elas atribuídas, anti-inflamatória, antitumoral, fungicida, tripanossomicida dentre outras (PAULETTI; BOLZANI; YOUNG 2003; ALCERITO *et al.*,2002; BARBOSA *et al.*,2008). Tais propriedades medicinais são devidas à variedade de metabólitos presentes nestes vegetais, como: lignanas, xantonas, triterpenos, flavonóides, iridóides, naftoquinonas, ácidos cinâmicos e benzóicos (OLIVEIRA *et al.*,1990).

3.7 *Arrabidaea brachypoda*

A Bignoniaceae *Arrabidaea brachypoda*, popularmente conhecida no Brasil como “cipó-uma”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo”, é um arbusto nativo do cerrado brasileiro, abundantemente ramificado, apresentando altura média entre 1,0 e 2,0 metros com folhas e flores em inflorescências terminais na cor rósea-púrpura (LORENZI; SOUSA,1995). Raízes e folhas de *A. Brachypoda* são amplamente utilizadas na medicina tradicional no Sudeste e Nordeste do Brasil para doenças renais e dores articulares (ALCERITO *et al.*,2002; RODRIGUES *et al.*,2006). (**Figura 1**)

Figura 1. Fotografia de flores da *Arrabidaea brachypoda*.



Fonte: Garcia, 2008

Estudos com ratos e camundongos avaliaram o tradicional uso da *A. brachypoda*, o extrato etanólico de sua raiz demonstrou ação antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação crônica e aguda (ROCHA *et al.*, 2011b). A ação antiulcerogênica do extrato hidroetanólico da raiz de *A. brachypoda* foi demonstrada *in vivo* pela redução da profundidade de modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos (ROCHA *et al.*, 2017). Pesquisas com extrato da folha da *A. brachypoda* verificaram ação leishmanicida *in vitro* de frações com baixa toxicidade. As frações ativas, bem como o extrato bruto não demonstraram ação antioxidante, o que

favorece a ação anti-leishmania por não interferir nos mecanismos de ação dos macrófagos (PEREIRA, 2012).

À partir do extrato da raiz da *A. brachypoda* foram isolados flavonóides diméricos com ação antichagásica. Estes apresentaram ação antitripomastigota do *Trypanosoma cruzi*, inibindo o processo de invasão do parasita e seu desenvolvimento intracelular, e um deles ainda foi capaz de reduzir a parasitemia no sangue de camundongos infectados com o protozoário causador da doença de chagas (ROCHA *et al.*, 2014). Um triterpeno extraído da raiz da *A. brachypoda* desenvolveu ação antiinflamatória em diferentes modelos de inflamação induzida em pata de rato, subsidiando informações prévias referentes ao seu uso tradicional (ROCHA *et al.*, 2015). A fração diclorometano do extrato da raiz da *A. brachypoda* é capaz de reduzir a atividade nociceptiva nas fases inicial e tardia, aliviando a dor aguda por um mecanismo relacionado aos receptores opióides em modelos experimentais de dor em camundongos (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Ensaio prévios foram realizados à fim de avaliar os efeitos tóxicos dos componentes do extrato etanólico da raiz da *A. brachypoda* frente a células de mamíferos, na ocasião foram usados macrófagos extraídos do exsudato peritoneal de camundongos, demonstrando a baixa citotoxicidade de BR-A e BR-B com LC-50 maior que 20 μ M e 15,6 μ M, respectivamente (ROCHA, *et al.*, 2014). Também não foram demonstradas alterações toxicológicas à partir da administração oral da fração diclorometano do extrato etanólico de suas raízes à camundongos, mesmo após exposição por longos períodos (RODRIGUES *et al.*, 2017). Estudos anteriores sobre a atividade estrogênica da BR-A e BR-B não relatam atividade significativa. (REZENDE *et al.*, 2017) Porém, a fração aquosa oriunda do extrato das folhas do referido vegetal foi considerada mutagênica quando avaliada pelo Teste de Ames e com baixa atividade estrogênica pelos testes de RYA (NOGUEIRA, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Metodologia de obtenção de extrato, frações e compostos puros de *Arrabidaea brachypoda*

4.1.1 Coleta do material botânico

As flores foram coletadas nas regiões de cerrado do estado brasileiro de Minas Gerais, município de João Pinheiro (latitude - 17° 44' 33" Sul e longitude - 46° 10' 21", 765 m de altitude), em junho de 2016. Foram secas a sombra e moídas com auxílio do moedor a faca, obtendo-se o pó vegetal. A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Uma excicata (n ° 17.935) foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

4.1.2 Preparação do extrato etanólico

A obtenção de extrato, fração e isolamento dos compostos foi realizado no laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos da Universidade Federal do Maranhão sob orientação e supervisão da professora Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

A extração foi feita pelo método exaustivo de percolação a álcool etílico 70% e todo extrato obtido foi concentrado através da utilização do evaporador rotativo, resultando no extrato bruto das flores de *A. brachypoda* (FLAB-Et). Este, por sua vez, passou pelo processo de liofilização e permaneceu em pó para melhor conservação e manutenção da integridade do material.

4.1.3 Obtenção da fração diclorometânica

Uma parte do extrato obtido foi pesada e dissolvida em solução de água-metanol (7:3). Em seguida, utilizou-se 25mL de diclorometano para incorporar na solução

previamente preparada, obtendo-se duas fases de solução. Esse procedimento foi realizado três vezes, utilizando um intervalo de 24 horas entre cada coleta e permitiu a obtenção da fração diclorometânica que foi seca com o auxílio de um secador (FLAB-DCM).

4.1.4 Isolamento dos compostos

A fração diclorometânica (1,5 g) foi purificada em uma coluna de vidro, preenchida com um adsorvente, sílica gel 60 (0,063- 0,200 mm). O empacotamento da coluna foi realizado com hexano e em seguida ocorreu à injeção da amostra no topo da coluna. Um gradiente de polaridade crescente de solventes foi usado como fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. No total foram obtidas 300 frações que em seguidas foram agrupadas por cromatografia em camada delgada de acordo com a semelhança do perfil. As mesmas foram pesadas e analisadas por HPLC-UV/vis. Este procedimento permitiu o isolamento de 6 compostos da fração DCM.

4.1.5 Identificação dos compostos

Os experimentos de espectrometria de massa foram realizados em LCQ Equipamento de frota (Thermo Scientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). A matriz estudada foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3 e MS^n) foi realizada em uma interface de prisão de íon (IT). O modo positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e para os demais experimentos multi estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; Voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. Um gás de arraste (N_2) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e o gás de colisão foi o hélio (He). A aquisição da faixa foi m/z 100-2000. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, MA) foi usado para adquirir e processar os dados.

4.2 Linhagens microbianas e compostos químicos

Os testes de verificação de atividade antimicrobiana intrínseca dos compostos extraídos das flores da *Arrabidaea brachypoda* foram realizados contra cepas microbianas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231. Além das cepas padrão, também determinou-se a CIM dos referidos compostos contra *S. aureus* que superexpressam bombas de efluxo NorA (SA1199-B). (KAATZ, SEO, RUBLE, 1993)

As cepas bacterianas foram mantidas em ágar Brain Infusion Heart (BHI, Himedia, Índia) inclinados a 4 °C, e antes do ensaio as células foram cultivadas durante uma noite a 37 °C em Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Índia). O ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Himedia, Índia) foi usado para manutenção da cepa de levedura que também foi mantida em inclinada a 4 °C e antes do ensaio as células foram cultivadas por 24 h a 37 °C em Caldo Sabouraud Dextrose (SDB, Himedia, Índia). O antimicrobiano norfloxacin (Nor), e o corante brometo de etídio (EtBr), bem como a clorpromazina (CPZ) foram obtidos da Sigma Chemical Corp., St. Louis. Nor, EtBr e CPZ foram dissolvidos em água estéril.

4.3 Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Soluções estoques do extrato etanólico, da fração diclorometano, e dos compostos isolados da fração diclorometano da flor da *A. brachypoda* foram preparadas por dissolução de 10.000 µg de cada extrato e frações em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), iniciando-se, por tanto com uma concentração de 10.000 µg/mL (100 mg/mL). Para o preparo da solução teste, diluiu-se a solução estoque em água destilada esteril em uma quantidade suficiente para atingir uma concentração de 1024 µg/mL. Soluções estoques de Brometo de Etídio (EtBr), e do antibiótico norfloxacin, foram preparadas em água destilada esteril para uma concentração final de 256 µg/mL. Testes controle avaliaram a interferência do solvente DMSO no crescimento dos microrganismos em questão comprovando que nas concentrações testadas o mesmo não apresenta atividade antimicrobiana.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pelo ensaio de microdiluição em caldo BHI (JAVADPOUR et al., 1996). A suspensão microbiana foi preparada à partir da inoculação de colônias, cultivadas em placas de Petri, em 3,0 mL de caldo BHI (Himedia, Índia) em tubo Falcon, seguida de incubado a 37°C por 24 h. Partindo desta cultura, foi preparada a suspensão bacteriana padronizada em salina 0,85% estéril para uma densidade equivalente a 0,5 na escala Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Da suspensão microbiana, foram retirados 100 µL e adicionados a um eppendorf contendo 900 µL de caldo BHI. A mistura do eppendorf foi então distribuída na placa de titulação, 100 µL em cada poço, no sentido alfabético (A–H). Posteriormente, foram realizadas as microdiluições usando 100 µL das soluções teste anteriormente referidas (concentrações de 1024 µg/mL) nos poços de A a G (concentrações 512 a 8 µg/mL), tomando-se o cuidado de homogeneizar a solução por 3 vezes antes da transferência para o poço seguinte. O último poço (H) não foi submetido à titulação, servindo este como controle positivo de crescimento microbiano. Uma fileira de poços distribuída apenas com caldo BHI (sem inóculo e sem o produto-teste) foi usada como controle negativo de crescimento (controle da contaminação do meio e/ou das microplacas). As placas foram incubadas a 37°C por 24h.

A leitura do teste, determinação da CIM, foi realizada mediante adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina sódica a 0,01% (m/v em água destilada estéril) em cada poço, exceto para os ensaios com cepas fúngicas, e repouso de 1 hora em temperatura ambiente. Levou-se em consideração a mudança de coloração de azul para rosa, indicava a ocorrência de crescimento bacteriano devido à redução da resazurina (PALOMINO et al., 2002; MANN; MARKHAN, 1999). Definiu-se a CIM como a menor concentração em que não se observou crescimento do microrganismo. Os ensaios foram realizados para cada cepa e para cada substância testada em triplicata. Como não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, no presente estudo foram adotados os critérios previamente estabelecidos por Holetz et al. (2002) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Critérios para avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca de produtos de origens vegetais de acordo com a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)	Atividade Inibitória
$\leq 100 \mu\text{g/mL}$	Boa
100 a 500 $\mu\text{g/mL}$	Moderada
500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$	Fraca
$>1000 \mu\text{g/mL}$	Ausente

Fonte: HOLETZ et al., (2002).

4.4 Avaliação da atividade moduladora da resistência às fluoroquinolonas

A avaliação da ação moduladora dos produtos em questão, FLAB-Et, FLAB-DCM e compostos isolados de FLAB-DCM, chalconas e braquidinas, foi realizada em triplicada, avaliando-se a interferência das substâncias na CIM do antibiótico frente a cepas de *S. aureus* que superexpressam proteínas específicas de efluxo. As CIMs dos antibióticos foram determinadas na presença e na ausência de concentrações subinibitórias de cada produto teste (CIM/8 e CIM/4). Da mesma forma que no ensaio para determinação da CIM, foi preparada uma suspensão bacteriana padronizada em salina para uma densidade equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, 100 μL dessa suspensão foram transferidos para a um eppendorf contendo 900 μL de BHI e o produto teste em concentrações subinibitórias (CIM/8 e CIM/4). Após esse procedimento, a referida mistura foi distribuída (100 μL por poço) em placas de microdiluição no sentido numérico (1-12). Posteriormente, procedeu-se a microdiluição de 100 μL da Norfloxacin (256 $\mu\text{g/mL}$) nos poços de 1 a 11 tomando-se o cuidado de homogeneizar a solução por 3 vezes antes da transferência para o poço seguinte. O último poço (12) não foi submetido ao processo de microdiluição do antibiótico, servindo este como controle positivo de crescimento bacteriano. As placas de microtitulação foram incubadas a 37°C por 24 h e as leituras foram realizadas com resazurina conforme descrito anteriormente.

Experimentos controle também foram realizados com a Clorpromazina (CPZ) em concentrações subinibitórias nas mesmas condições relatadas acima para os

produtos testados. A clorpromazina é um inibidor conhecido de bombas de efluxo bacterianas (NEYFAKH, BORSCH, KAATZ, 1993).

4.5 Avaliação da atividade inibidora de bombas de efluxo

Na avaliação do efeito inibitório das bombas de efluxo, foram realizados ensaios de modulação conforme descrição anterior substituindo-se o antibiótico por solução aquosa de Brometo de etídio (EtBr) na concentração inicial de 256 µg/mL. O uso do EtBr para este ensaio é justificado pelo fato já conhecido de as bombas de efluxo constituírem o único mecanismo de resistência conhecido para essa substância (MARKHAM *et al.*, 1999). A ocorrência de efeito modulador da resistência ao EtBr pelos produtos testes em concentrações subinibitórias, seria uma indicação de que os mesmos podem conter fitoquímicos inibidores de bombas de efluxo. Também foram realizados ensaios controle substituindo os produtos testes por Clorpromazina (CPZ) (NEYFAKH, BORSCH, KAATZ, 1993).

4.6 Ensaios de inibição do efluxo de Brometo de etídio

Para validar a atividade inibidora de NorA da Braquidina B (BR-B) foi realizado um método semi-automatizado (KAATZ *et al.*, 2000). A cepa SA-1199B foi cultivada em 2,0 mL de caldo BHI até que a população bacteriana atingisse uma densidade óptica de 600 nm. Em seguida esta suspensão foi centrifugada a 5.000 g por cinco minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 2,0 mL de salina. As suspensões bacterianas foram homogeneizadas em vórtex e transferidas para uma placa de 96 poços seguida pela adição de solução salina contendo EtBr (3,0 µg/mL) e e BR-B (128 µg/mL MIC 1/8) ou clorpromazina (16 µg/mL CIM 1/4). Uma suspensão bacteriana contendo somente EtBr (3,0 µg/mL) foi usada como controle positivo. O branco para cada teste foi preparado em solução salina. A fluorescência relativa relacionada à acumulação de EtBr pela bactéria foi lida no termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System™ (Applied Biosystems) após 60 min. A fluorescência relativa final (FFR) das amostras foi calculada pela subtração dos valores dos respectivos brancos. Diferenças de FFR entre os poços com os compostos testados e os do controle positivo foram consideradas indicativas de atividade inibidora do efluxo de EtBr.

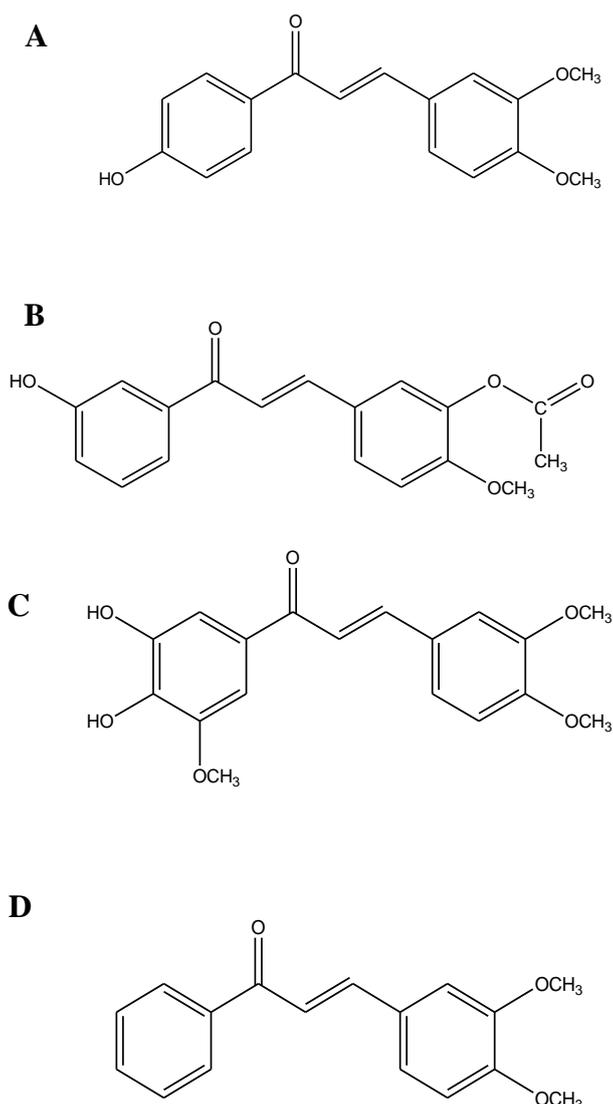
4.7 Análises estatísticas

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram normalizados pelo cálculo da média geométrica das CIMs. O erro padrão e o desvio padrão da média geométrica foram determinados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 7.00. A ocorrência de diferenças entre o tratamento com antibiótico (ou EtBr) isoladamente ou associados aos produtos testados foram examinadas através da análise de variância de uma etapa (ANOVA). As diferenças mencionadas acima foram analisadas pelo pós-teste de Bonferroni e foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

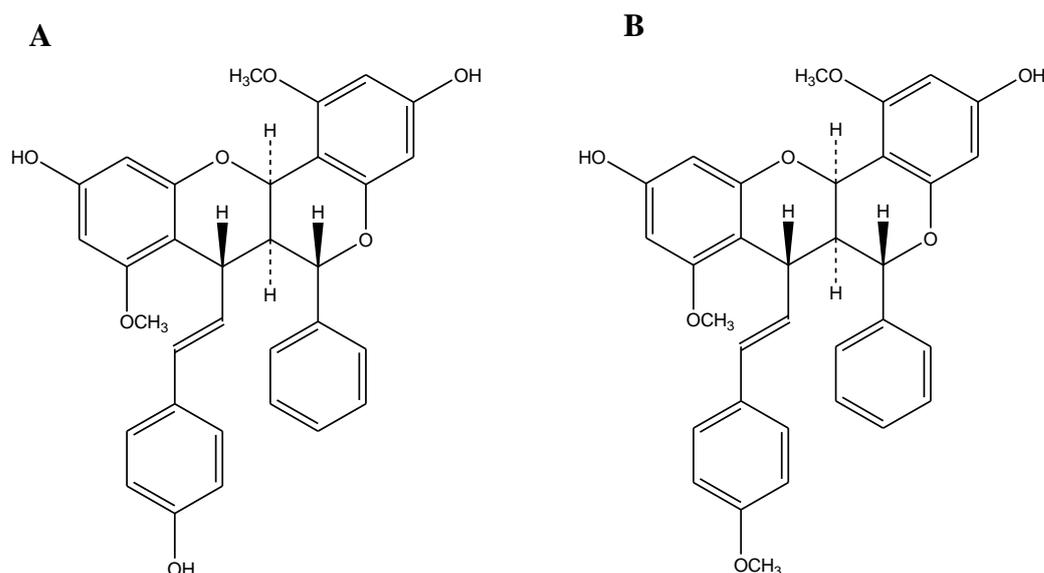
Dentre as substâncias isoladas à partir da fração diclorometano (FLAB-DCM) das flores de *A. brachypoda*, foram identificadas quatro chalconas; CH-1 (3-(3,4-dimethoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)propan-1-ona), CH-3 (Derivado de 3-(3,4-dimethoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)propan-1-ona), CH-4 (3-(3,4-dimethoxyfenil)-1-fenilpropan-1-ona) e CH-5 (Derivado de 3-(3,4-dimethoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)propan-1-ona) (**Figura 2**) e dois flavonoides diméricos, as braquidinas A e B (BR-A e BR-B) (**Figura 3**).

Figura 2 - Estrutura química das chalconas isoladas da fração diclorometano da flor de *Arrabidaea brachypoda*, CH-1(A), CH-3 (B), CH-4(C) e CH-5(D).



Chalconas são compostos fenólicos de origem natural ou sintética muito reportados na literatura por suas inúmeras atividades biológicas que vão desde atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais e até antidepressivas (SUE *et al.*, 2012; JAIN *et al.*, 2009; RAMIREZ *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura química das Braquidinas isoladas da fração diclorometano da flor de *Arrabidaea brachypoda*, BR-A (A) e BR-B (B).



As braquidinas A e B (BR-A, BR-B) foram identificados pela primeira vez na fração diclorometano das raízes de *A. brachypoda*. (ROCHA *et al.*, 2014). No presente estudo, estes dois flavonoides diméricos foram também isolados a partir da fração diclorometano das flores de *A. brachypoda*, o que é uma evidência de que elas não são componentes exclusivos das flores, mas provavelmente poderiam ser encontradas em outras partes da planta.

Valores de concentrações inibitórias mínimas encontrados para FLAB-Et e FLAB-DCM mostraram que estes produtos naturais não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações clinicamente relevantes testadas ($CIM \geq 1024 \mu\text{g/mL}$) contra as linhagens Gram-positivas, Gram-negativa e fúngica (Tabela 2). Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, um estudo anterior demonstrou que o extrato hidroalcoólico das raízes de *A. brachypoda* apresentou atividade contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 (ROZATTO, 2012). Por outro lado,

este autor verificou também que o extrato etanólico obtidos das folhas e caule desta planta foram inativos contra *Escherichia coli*, *Salmonella. setubal*, *Candida albicans* e *Helicobacter pylori*. (citar as espécies de microrganismos testadas). (ROZATTO, 2012).

Tabela 2 – Médias das concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do Extrato Etanólico (FLAB-Et) e Fração Diclorometano (FLAB-DCM) da flor da *Arrabidaea brachypoda* contra os microrganismos.

Linhagens microbianas	CIM (µg/mL)	
	FLAB-Et	FLAB-DCM
<i>S. aureus</i> SA1199-B	≥1024	≥1024
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥1024	≥1024
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≥1024	≥1024
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	≥1024	≥1024

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, CCS, UFPI, 2018.

Os resultados dos testes para avaliação da atividade antimicrobiana das chalconas e braquidinas isoladas à partir da fração diclorometano, chalconas e brachidinas demonstraram ausência de atividade intrínseca contra as linhagens Gram-positivas e Gram-negativa, enquanto que os compostos CH-3 e BR-B mostraram atividade contra *Candida albicans*, com valores de CIM de 512 µg/mL e 181 µg/mL, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Médias das concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos isolados Fração Diclorometano (FLAB-DCM) da flor da *Arrabidaea brachypoda* contra os microrganismos.

Linhagens microbianas	CIM (µg/mL)					
	CH-1	CH-3	CH-4	CH-5	BR-A	BR-B
<i>S. aureus</i> SA1199-B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≥1024	512	≥1024	≥1024	≥1024	181

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, CCS, UFPI, 2018.

Vários estudos demonstram a importância das chalconas na defesa dos vegetais contra patógenos fúngicos (RAO *et al.*, 1994; RIMENEZ *et al.*, 2014; THIRUNARAYANAN, VANANGAMUDI, 2014). A chalcona CH-3 apresentou ação antifúngica contra *C. albicans*, outras chalconas são citadas na literatura por suas ações antifúngicas e também por combaterem a formação de biofilmes fúngicos (SANTANA *et al.*, 2015; RAMIREZ *et al.*, 2012). A ação fungicida das chalconas pode estar relacionada à lesão celular pela formação de reativos de oxigênio ou por inibir seus processos antioxidativos (KACHADOURIAN, DIA, 2006), também é sabido que as chalconas podem induzir a morte celular programada em eucariotos, como demonstrado com o protozoário *Plasmodium falciparum* (SHARMA *et al.*, 2012).

Embora não existam estudos prévios relacionando a atividade antifúngica da BR-B, os flavonóides 3', 4'-dihidroxi-5,6,7- trimetoxiflavona, circitrol, circimaritina e hispidulina isolados das folhas de *A. brachypoda* exibiram atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* (ALCERITO, 2002). Além disso, um estudo anterior verificou que a BR-B extraída das raízes de *A. brachypoda* demonstrou uma atividade significativa *in vitro* contra outro patógeno eucariótico, o protozoário *Trypanosoma cruzi*. (ROCHA *et al.* 2014).

A atividade moduladora de FLAB-Et, FLAB-DCM, chalconas e braquidinas, na resistência à Norfloxacin foi avaliada usando SA1199-B superexpressando o gene que codifica a bomba NorA, que confere resistência às fluoroquinolonas hidrofílicas por meio do efluxo ativo com força próton-motriz com gasto de energia (KAATZ *et al.*, 1995). Os resultados mostraram que o FLAB-Et e o FLAB-DCM aumentaram a atividade da Norfloxacin contra a cepa SA1199-B (**Figuras 4**).

O FLAB-DCM exibiu efeito modulatório superior ao verificado para o extrato bruto, diminuindo a CIM para Norfloxacin em até 64 vezes (de 64 para 1 µg / mL). Este resultado indica uma maior concentração de compostos atuando como moduladores da resistência à norfloxacin na fração de partição. O efeito modulatório demonstrado pelo FLAB-DCM foi maior do que o verificado para o CPZ, um conhecido inibidor da bomba de efluxo (EPI) (NEYFAKH *et al.*, 1993). Estes resultados sugerem a presença de compostos capazes de modular a resistência às fluoroquinolonas em *S. aureus* superexpressando NorA.

Efeitos semelhantes foram encontrados para o ensaio de modulação com EtBr em substituição ao antibiótico. O EtBr é um conhecido substrato de NorA. A resistência mediada por bombas de efluxo é o único mecanismo conhecido de resistência a esse corante intercalante de DNA (MARKHAM *et al.*, 1999). Este resultado é uma indicação de que a modulação da resistência a drogas por FLAB-Et e FLAB-DCM pode dever-se à presença de inibidores de NorA, levando ao acúmulo dos antibióticos nas células bacterianas.

Para investigar se os compostos isolados das flores de *A. brachypoda* poderiam estar relacionadas com o efeito modulador verificado tanto para FLAB-Et quanto para FLAB-DCM, os testes de modulação da resistência à norfloxacin foram realizados com as chalconas e as braquidinas.

Os resultados mostraram que a BR-A isolada não potencializou as atividades de norfloxacin ou EtBr contra a cepa SA1199-B, sendo assim excluída como um potencial agente modulador (**Figura 5**). Por outro lado, a BR-B apresentou atividade moduladora semelhante à apresentada pela CPZ reduzindo a CIM da Norfloxacin em até 4 vezes (de 64 para 16 µg/mL) contra SA1199-B (**Figura 5**). Além disso, a BR-B também foi capaz de modular a resistência ao EtBr, indicando que esta braquidina poderia ser um dos inibidores de NorA presentes nos produtos naturais testados.

Figura 4 - CIMs de Norfloxacin (Nor) (A) e Brometo de Etídio (EtBr) (B) na ausência ou presença do extrato etanólico das flores de *A. brachypoda* (FLAB-Et), sua fração de partição de diclorometano (FLAB-DCM), e Clorpromazina (CPZ) contra SA1199-B. Cada resultado é a média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

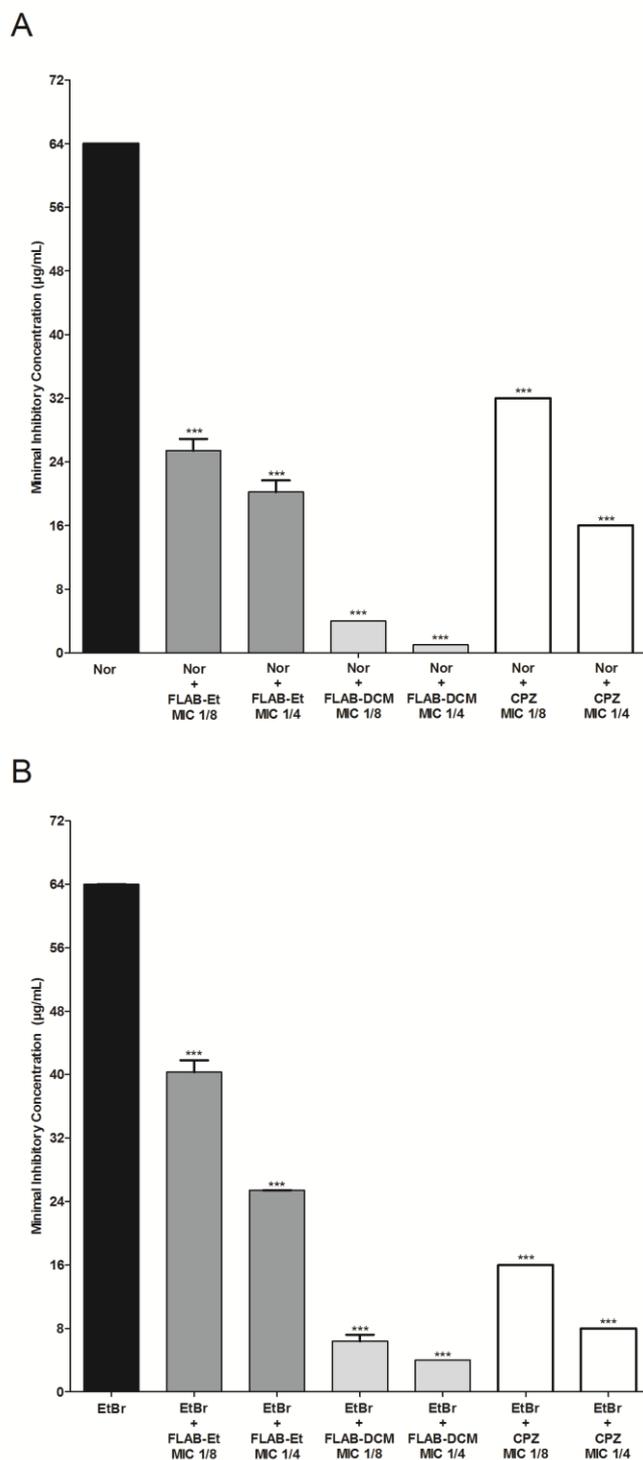
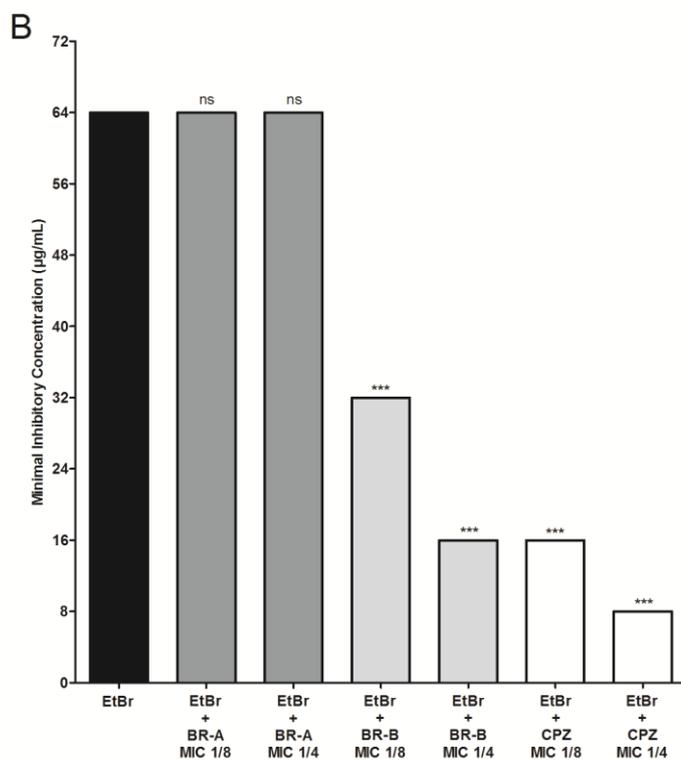
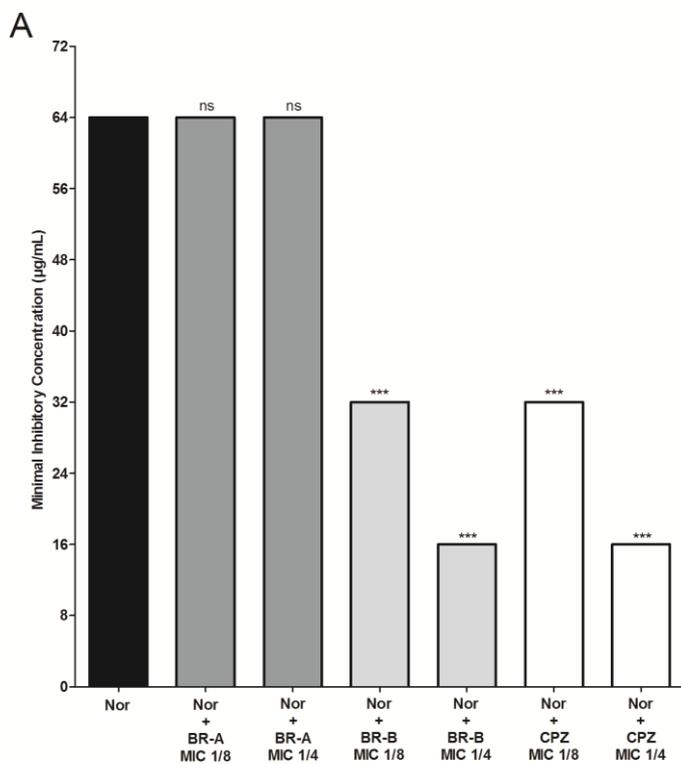


Figura 5 - CIMs de Norfloxacin (Nor) (A) e Brometo de Etídio (EtBr) (B) na ausência ou presença dos compostos isolados BR-A e BR-B, bem como Clorpromazina (CPZ) contra SA1199-B. Cada resultado é a média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).



Os ensaios de modulação realizados com as chalconas CH-1, CH-3, CH-4 e CH-5 isoladas da FLAB-DCM, demonstraram que os compostos exerceram atividade moduladora da resistência dependente de concentração, uma vez que reduziram CIM tanto para o antibiótico norfloxacina quanto para o corante EtBr, porém essas ações foram menores ou iguais ao controle positivo. Dentre estes compostos, o que demonstrou melhor efeito modulador foi a chalcona CH-4 seguido pelos chalconas CH-5, CH-3 e CH-1 (**Figura 6**).

Todos os compostos isolados de FLAB-DCM demonstraram atividade moduladora menor que FLAB-DCM, o que nos leva a crer que os compostos agem sinergicamente entre si e/ou com outros componentes minoritários na modulação tanto do antimicrobiano norfloxacina quanto do EtBr.

Esta não é a primeira vez que se verifica atividade moduladora de *A. brachypoda*, uma vez que esta atividade foi demonstrada pelo método *checkerboard* atividade sinérgica entre o extrato hidroalcoólico de sua raiz e a amoxicilina, diminuindo a CIM do referido antibiótico de forma significativa frente a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ROZATTO, 2012).

O melhor efeito modulador verificado para a BR-B, motivou a realização de ensaios de inibição de efluxo à fim de comprovar a inibição de NorA por BR-B, levando ao acúmulo de EtBr em células da cepa SA1199-B. Nestes ensaios, o sinal de fluorescência emitido pelo EtBr intercalado na hélice dupla do DNA bacteriano foi monitorado na ausência e na presença de BR-B. Os resultados mostraram que a adição de BR-B em concentrações sub-inibitórias causou um acúmulo intracelular de EtBr na cepa SA1199-B, evidenciado por um aumento no sinal de fluorescência (**Figura 7**). O efeito inibitório apresentado pela BR-B foi maior do que o verificado para CPZ no presente estudo, assim como para outros inibidores de NorA (COSTA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014; BRINCAT *et al.*, 2011).

Figura 6 - CIM da norfloxacina (Nor) na ausência e na presença dos compostos CH-1, CH-3, CH-5, CH4 e CPZ (A), CIM do brometo de etídio (EtBr) na ausência e na presença dos compostos CH-1,CH-3,CH-5,CH-4 e CPZ (B) contra *S. aureus* SA1199-B (norA). Cada resultado representa a média geométrica de três experimentos simultâneos. (***) Valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

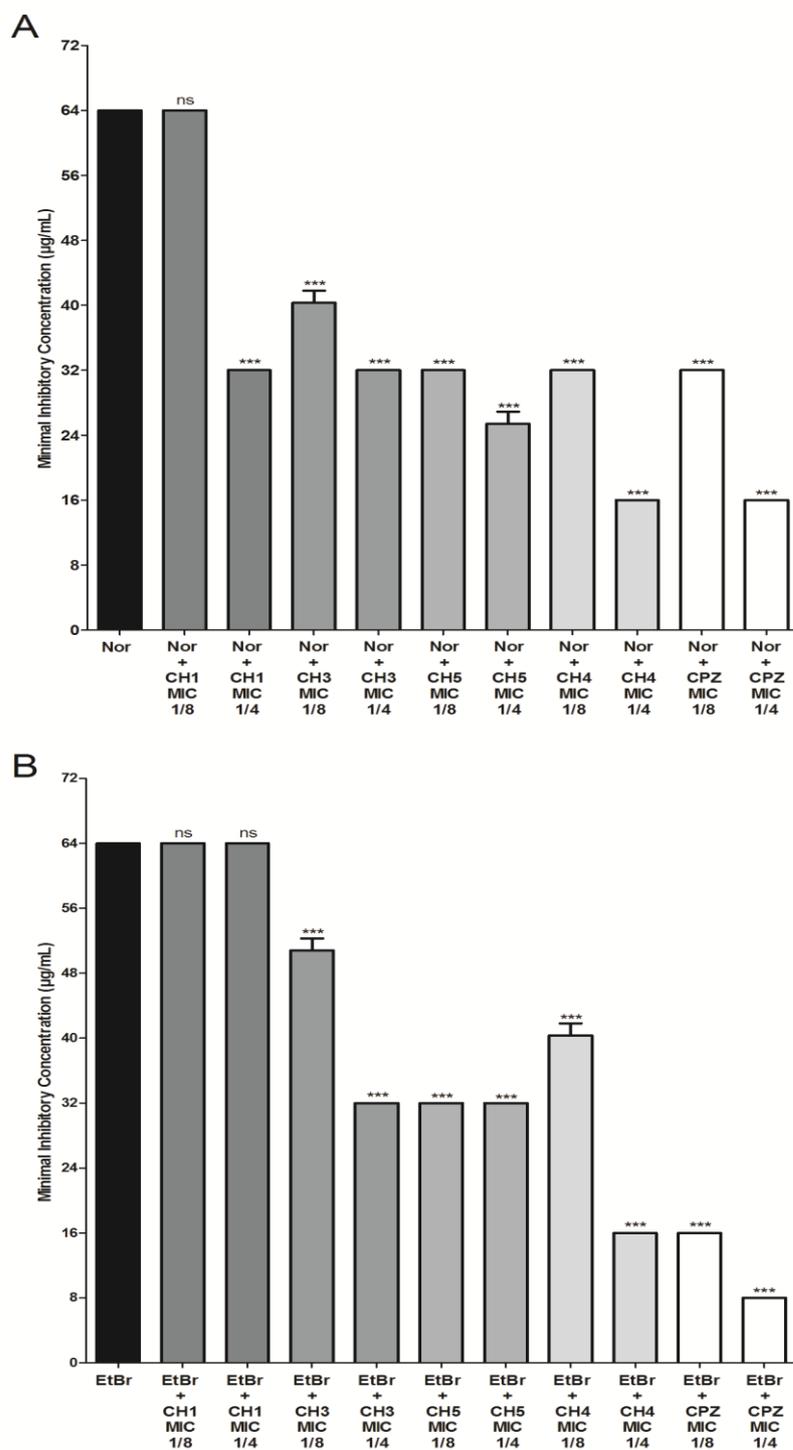
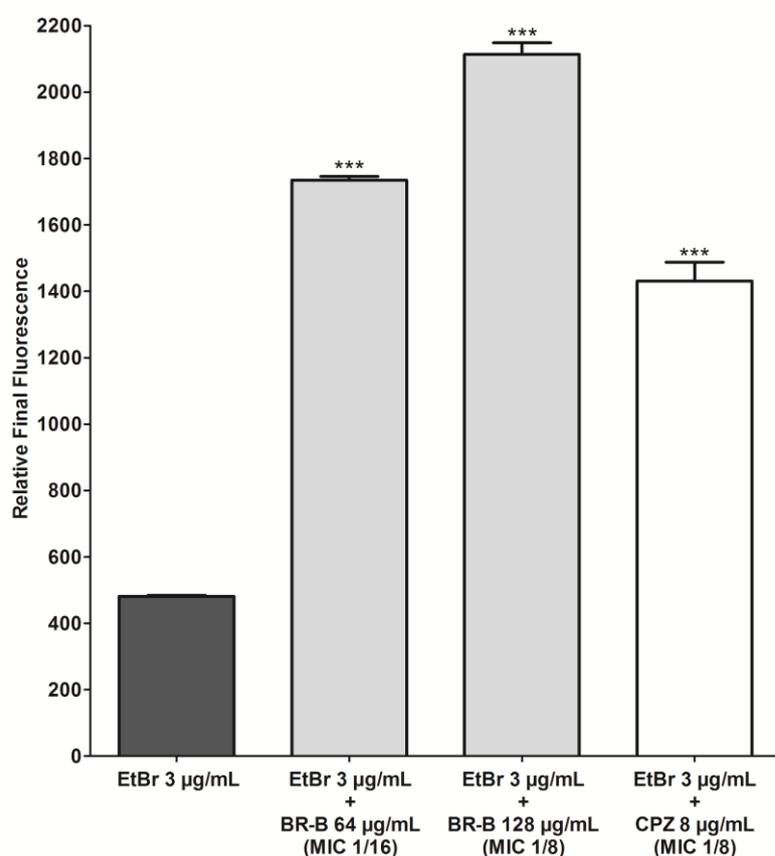


Figura 7. Efeito da BR-B no acúmulo de EtBr por *S. aureus* SA1199-B superexpressando norA. A suspensão bacteriana foi carregada com EtBr (3 µg / ml) na presença ou ausência de BR-B ou CPZ em concentrações sub-inibitórias. A fluorescência final relativa foi calculada subtraindo todos os pontos pelo respectivo controle em branco. Diferença na Fluorescência Final Relativa obtida na ausência ou presença de BR-B ou CPZ foi considerada como indicativa de inibição de efluxo.



Como pode ser observado na Figura 3, BR-A e BR-B são flavonoides diméricos que diferem apenas na posição C-4 pela presença de um grupo hidroxila em BR-A enquanto BR-B exibe um grupo metoxila. Assim, a substituição da hidroxila pelo grupo metoxila no C-4 foi crítica para o efeito modulador apresentado pela BR-B. Um estudo anterior forneceu evidências de que a presença de grupos metoxílicos é uma característica importante de potenciais inibidores de bombas de efluxo (FELICETTI *et al.*, 2018). A inibição de NorA pela Riparin-B foi fortemente influenciada pela dimetoxilação da porção fenetilo em vez da hidroxilação da parte benzamida (COSTA *et al.*, 2016). Outro estudo prévio verificou que a adição de grupos metoxila aumentou a lipofilicidade das flavononas estudadas e que o composto tetrametoxilado apresentou

um maior efeito modulatório na resistência à Norfloxacin em SA1199-B do que outros compostos di- ou trimetoxilados (MAIA *et al.*, 2011).

Este trabalho demonstra a possibilidade de uso de substâncias oriundas da flor *A. brachypoda* no desenvolvimento futuro de novas alternativas para o tratamento antimicrobiano contra *S. aureus* multirresistentes, especialmente BR-B como um adjuvante da norfloxacin no tratamento de infecções causadas por este patógeno.

6. CONCLUSÃO

FLAB-DCM e FLAB-Et não apresentaram atividade antimicrobiana intrínseca contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Os compostos CH-3 e BR-B de FLAB-DCM apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*. FLAB-Et e principalmente FLAB-DCM foram capazes de potencializar a atividade antibiótica da norfloxacinina contra SA1199-B, os compostos CH-1, CH-3, CH-4, CH-5 e BR-B também demonstraram essa ação, porém todos foram menos significativos que FLAB-DCM, sendo BR-B o composto com ação mais pronunciada, isso demonstra que os compostos podem agir sinergicamente entre si ou com compostos minoritários para a modulação da atividade antimicrobiana. O presente estudo também demonstrou a capacidade do composto BR-B de aumentar o acúmulo de BrEt no interior da célula bacteriana indicando que o composto presente nas flores de *A. Brachypoda* é um EPI potencialmente aplicável como adjuvante da Norfloxacinina no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes às fluoroquinolonas pela superexpressão de NorA.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Em posse dos dados já consolidados, pretende-se futuramente avaliar a capacidade de inibição de outras bombas de efluxo por BR-B, realizar testes que verifiquem suas essas ações *in vivo*, bem como aprofundar os estudos físico-químicos da referida molécula a fim de desenvolver uma formulação farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. de F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ALCERITO, T. et al. Foliar epicuticular wax of Arrabidaea brachypoda: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 7, p. 677-683, 2002

ALVES, L. F. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.

ARENDRUP, Maiken C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current opinion in critical care**, v. 16, n. 5, p. 445-452, 2010.

BADDOUR, M. M.; ABUELKHEIR, M.; FATANI, A. J. Trends in antibiotic susceptibility patterns and epidemiology of MRSA isolates from several hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 1, p. 30, 2006.

BARBOSA, W. L. R. et al. Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.

BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. **Journal of microbiological methods**, v. 57, n. 2, p. 231-239, 2004.

BHOPALE, G. M. Importance of fluoroquinolones in human healthcare: a comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutical Science Reserch**, v. 5, p. 5097-5103, 2014.

BOLZANI, S. Vda et al. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 181-187, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: **Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à**

Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. Dezembro, 2016.

BRASIL, ANVISA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde.** Maio, 2017.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar.** São Paulo: Santos, 2010.

BRINCAT, Jean Pierre et al. Discovery of novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 1, p. 354-365, 2010.

BROWN, A. F. et al. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 507, 2014.

BROWN, D.; DEMETER, M.; TURNER, R. J. Prevalence of Multidrug Resistance Efflux Pumps (MDREPs) in Environmental Communities. In: **Microbial Diversity in the Genomic Era.** Academic Press, 2019. p. 545-557.

BRUNS, M. M. et al. Modulation of the multidrug efflux pump EmrD-3 from *Vibrio cholerae* by *Allium sativum* extract and the bioactive agent allyl sulfide plus synergistic enhancement of antimicrobial susceptibility by *A. sativum* extract. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 8, p. 1103-1112, 2017.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12.** AMGH Editora, 2012.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics?. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 919-929, 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of medical and Biological research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARS, O. et al. Meeting the challenge of antibiotic resistance. **Bmj**, v. 337, p. a1438, 2008.

CARVALHO, C. E. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Journal Pediatrics**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CHA, Y. et al. Characterization and Genome Analysis of *Staphylococcus aureus* Podovirus CSA13 and Its Anti-Biofilm Capacity. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 54, 2019.

CIRINO, I. C. S. et al. The essential oil from *Origanum vulgare* L. and its individual constituents carvacrol and thymol enhance the effect of tetracycline against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 60, n. 5-6, p. 290-293, 2014.

COSTA, C. P. R.; LIMA, A. E. Brazilian-Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products. **Rio de Janeiro**, 1989

COSTA, L. M. et al. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1312-1322, 2016.

CUSTER, C.S. History of food Microbiology. (**ABrief**), USDA FSIS, Bethesda, USA 2014.

DRLICA, K., ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and molecular biology reviews** 61.3 (1997): 377-392.

DZIDIĆ, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FELICETTI T. et al. 2-Phenylquinoline *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors: Evaluation of the Importance of Methoxy Group Introduction. **Journal Medicinal Chemistry**. 2018; 61:7827-8848.

FENG, F.; HAWKS, H. J. Recurrent Urinary Tract Infection Care: Integrating Complementary And Alternative Medicine. **Urologic Nursing**, v. 38, n. 5, 2018.

FISCHER, E.; THEISEN, I. & LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. In: KUBITZKI, K. & KADEREIT, J. W. The families and genera of vascular plants. Heidelberg, v. 7, p. 9-98. 2004

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, Flávio de. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-8, 2008.

GADE, N. D.; QAZI, Mohiuddin S. Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections: where do we stand?. **Journal of Laboratory physicians**, v. 5, n. 2, p. 109, 2013.

GALLEGO-MALDONADO, G. et al. Bacterial multiresistance: Therapeutic challenge in renal transplantation. **Universidad y Salud**, v. 21, n. 1, p. 72-87, 2019.

GARCIA, F. **Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas.** 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GARCÍA, J. et al. Genes qnr en Enterobacteriaceae aisladas en un hospital de Venezuela. **Revista chilena de infectología**, v. 35, n. 2, p. 147-154, 2018.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae-part I (Crescentieae and Tourrettieae). *Flora neotropica Mon.*, No. 25, 130pp. **Includes notes on anatomy (from literature), inflorescences, floral morphology, pollen, chemotaxonomy, chromosome nos., evolution, pollination, distribution, uses. Main part taxonomic. Floral morphology, General article Review article, Bignoniaceae, Pollen (PMBD, 185702564),** 1980.

GOODLAND, R. JA; FERRI, M. G. Ecologia do cerrado. In: **Ecologia do cerrado.** EDUSP/Itatiaia, 1979.

GORDON, R. A assustadora história da Medicina. **Ediouro Publicações.** Rio de Janeiro (RJ) 1997

GOULART, L. S. et al. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 3, 2018.

GUAN, X. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance—current knowledge and future perspectives. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 1, p. 20-30, 2013.

HA, K. C.; WHITE, T. C. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 763-768, 1999.

HEDAYATI, M. T. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 542-545, 2018.

HOLDEN, MTG et al. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. **Genome research**, 2013.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores.** São Carlos: EduFSCar, 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) Mapa de biomas do Brasil. IBGE, Rio de Janeiro. ftp://geofp.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/estudos_ambientais/biomas/documentos/Sintese_Descricao_Biomas.pdf. Acesso em: 27 de setembro de 2018.

JAVADPOUR, M.M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

JAIN, S.; CHOURASIA, O. P. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of 3-Indolyl Chalcones. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 4133, 2009.

JEAN, S.; HSUEH, P. High burden of antimicrobial resistance in Asia. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n. 4, p. 291-295, 2011.

JIMENEZ C.M. et al. Isolation, identification and usefulness of antifungal compounds from *Zuccagnia punctata* for control of toxigenic ear rot pathogens. **Natural Products Communications**. v. 9. p. 1461-1464. 2014.

KAATZ, Glenn W.; SEO, Susan M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2650-2655, 1995.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086-1094, 1993.

KACHADOURIAN R., DIA B.J. Depleção de glutatona induzida por flavonóides: implicações potenciais para o tratamento do câncer. **Free Radical Biology e Medicine**. v. 41, p. 65-76, 2006.

KALINKA, J. et al. *Staphylococcus aureus* isolates from chronic osteomyelitis are characterized by high host cell invasion and intracellular adaptation, but still induce inflammation. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1038-1049, 2014.

KAPER, J. B. Molecular pathogenesis of enteropathogenic *Escherichia coli*. In: Molecular genetics of bacterial pathogenesis. **American Society of Microbiology**. p. 173-195, 1994.

KETT, D. H. et al. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Critical care medicine**, v. 39, n. 4, p. 665-670, 2011.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. cap. 11, parte 1 Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001.

KRUMMENAUER, E. C. et al. **Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas no ambiente hospitalar**. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 3, jul. 2016.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance the need for global solutions. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEITÃO, S. G.; OLIVEIRA, D. R. The modern pharmacognosy and the ethnopharmacological approach on natural products research. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 97-98, 2014.

LIVERMORE, D. M. Fourteen years in resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 39, n. 4, p. 283-294, 2012.

LORENZI, H. SOUZA, HM de. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. **Nova Odessa, Brazil: Editora Plantarum 720p.-col. illus.. Por Geog**, v. 4. 1995

MACEDO, K. C. S. de; CASTRO, C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 4, p. 173-177, 2018.

MAIA G. L. A. et al. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson Modulate Bacterial Drug Resistance. **Molecules**. v.16. p. 4828-4835. 2011.

MANN, C.M.; MARKHAN, J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MARKHAM, P.N. et al. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2404-2408, 1999.

MAXWELL, A. The molecular basis of quinolone action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 409-414, 1992.

MCMURRY, L.; PETRUCCI, R. E.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 77, n. 7, p. 3974-3977, 1980.

MENDES, C. B. N. M.; SILVA, S. de S.; CAVALCANTI, R. L. **Intervenção de excelência: atuação do farmacêutico na padronização de antimicrobianos frente às comissões de controle de infecção relacionada a assistência à saúde**. Revista Presença, v. 1, n. 3, p. 40-64, 2015.

MENEZES, J. M. R.; PORTO, M. L. S.; PIMENTA, C. L. RM. Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 204-207, 2016.

- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 8 ed. P.251-255. Elsevier Health Sciences, 2015.
- NEYFAKH, A. A.; BORSCH, C. M.; KAATZ, G. W. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 128-129, 1993.
- NOGUEIRA, C. H. Avaliação da mutagenicidade e da estrogenicidade dos extratos etanólicos padronizados, frações e substâncias isoladas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau. 2015. 73 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.
- NORONHA, H. A propósito dos cipós medicinais do Brasil. **Rev. Bras. Farm**, p. 151-159, 1964.
- NOVAES, P. et al. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochemistry reviews**, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013.
- NOVICK, R. P. Pathogenicity factors and their regulation. **Gram-positive pathogens**, p. 392-407, 1999.
- NUTTON, V. The seeds of disease: an explanation of contagion and infection from the Greeks to the Renaissance. **Medical history**. v.27, n.1, p. 1-34, 1983.
- OLIVEIRA, A. B de et al. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. **Química nova**, v. 13, n. 4, p. 302-307, 1990.
- PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161-189, 2004.
- PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Chemical constituents of *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.
- PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.
- PASQUALE, T. R.; TAN, J. S. Nonantimicrobial effects of antibacterial agents. **Clinical infectious diseases**, v. 40, n. 1, p. 127-135, 2005.
- PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**. v. 4, n. 1, p. 70-77, fev. 2016.

PEREIRA, I. de O. Determinação da atividade leishmanicida, antiproteolítica e antioxidante de *Arrabidaea brachypoda*. 2012. 99 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

RAMÍREZ ESCOBEDO, M. E. et al. Síntesis y actividad biológica de chalconas. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**. v. 43, n. 4.p. 7-14. 2012.

RAO, G.P. et al. Efficacy of chalcone, hydrazide and oxadiazole derivatives against fungal pathogens of sugarcane. **Sugar Cane**. v. 5. p.17-22. 1994.

RIBEIRO, P. R. et al. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1237-1240, 2011.

RICE, L., BONOMO, R. (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. em Viclor Lorian, M. D. (Eds), **Antibiotics in Laboratory Medicine** 5ª ed. p. 441-476. Nova Iorque.2005.

ROCHA, C. Q da. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.(b)

ROCHA, C. Q da. et al. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Journal of natural products**, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014.

ROCHA, C. Q. da et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93-105, 2017.

ROCHA, C. Q. da et al. Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 228-232, 2015.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, p. 111-118, 2011.(a)

RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian Indians to Central Nervous System disturbances: a bibliographical approach. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 211-244, 2006.

RODRIGUES, V. P. et al. Involvement of Opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2304, 2017.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***.100 f. Dissertação de

Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

RUIZ, F. J. G.; ZAITZ, C. Estudo retrospectivo correlacionando a frequência de isolamento de leveduras do gênero *Candida* ao estado imunológico de pacientes em hospital geral: análise de cinco anos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 64, n. 1, p. 2, 2007.

RUIZ, J.; PONS, M. J.; GOMES, C.. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 40, n. 3, p. 196-203, 2012.

SALAM, A. M.; QUAVE, C. L. Opportunities for plant natural products in infection control. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 189-194, 2018.

SAIER JR, M. H.; PAULSEN, I. T. Phylogeny of multidrug transporters. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2001. p. 205-213.

SANTANA, D. P. et al. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.

SANTOS, A. L. dos et al. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007

SANTOS, N. de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SANTOS, A. V. et al. Perfil epidemiológico da sepse em um hospital de urgência. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2015.

SANTOS, S. b. dos et al. Presence of *Candida spp.* and candidiasis in liver transplant patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 356-361, 2018.

SAUCEDA, E. N. R. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. **Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible**, v. 7, n. 1, p. 153-170, 2011

SHARMA N. et al. Híbridos de estilbeno-chalcona: projeto, síntese e avaliação como uma nova classe de arcabouços antimaláricos que desencadeiam a morte celular por meio da apoptose específica do estágio. **Journal Medicinal Chemistry**. v. 55, p. 297-311, 2012.

SIEGEL, J. D. et al. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. **American journal of infection control**, v. 35, n. 10, p. S165-S193, 2007.

SILVA, H. T. D. et al. Potencial de compostos fenólicos como antimicrobianos e/ou moduladores da resistência em *Staphylococcus aureus*. 2015.72f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SILVA, M. M.; QUEIROZ, L. P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Serie Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1/2, p. 3–21, 2003.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, S. M. P. de M. et al. Potencial antibacteriano e modulador de resistência a drogas de extratos e constituintes de algas marinhas em *staphylococcus aureus*. 2013.83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The organic chemistry of drug design and drug action**. Academic press, 2014

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SOARES, S. G. S. C. et al. Characterization of infections related to health care in a teaching hospital in Northeastern Brazil/Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em um hospital de ensino do Nordeste do Brasil/Caracterización de las infecciones.. **Revista de Enfermagem da UFPI**, v. 6, n. 2, p. 37-43, 2017.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica sistemática: **guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2008.

SUI, Xin et al. Synthesis and studies on antidepressant activity of 2', 4', 6'-trihydroxychalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 7, p. 1290-1296, 2012.

SWIETNICKI, W. Recent advances in antibacterial drug development. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 9, p.26501-26505, 2018.

TIWARI, H. K.; SEN, M. R.. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious diseases**, v. 6, n. 1, p. 156, 2006.

THAI, K. et al. Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 135-155, 2015.

THIRUNARAYANAN G., VANANGAMUDI G. Synthesis, spectral studies, antimicrobial and insect antifeedant activities of some substituted styryl 42 - fluorophenyl ketones. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 1055-1064, 2014.

TONG, S. Y.C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

UHLEMANN, A. C. et al. Evolution of community-and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, genetics and evolution**, v. 21, p. 563-574, 2014.

VIEIRA, S.C.H. et al. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antibacterial agents in clinical development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. 2017.a

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. In: **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017**. 2017.b

ZHANG, J. et al. (2014) Non-antibiotic agent ginsenoside 20(S)-Rh2 enhanced the antibacterial effects of ciprofloxacin in vitro and in vivo as a potential NorA inhibitor. **European Journal Pharmacology**, v. 740, p. 277-284, 2014.

ZIMMERMANN, Saskia et al. Optimized efflux assay for the NorA multidrug efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Journal of microbiological methods**, v. 142, p. 39-40, 2017.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO: Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Brachydin B from *Arrabidaea brachypoda*.

15/02/2019

ScholarOne Manuscripts



Journal of Natural Products

[Home](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Natural Products

Manuscript ID

np-2019-00143n

TitleInhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Brachydin B from *Arrabidaea brachypoda***Authors**

Andrade, Leila
de Oliveira, Aylla Beatriz
Leal, Antonio Linkoln
Portela, Ana Lurdes
Oliveira, Felipe
Lima Neto, José
Siqueira Júnior, José
Katz, Glenn
da Rocha, Cláudia
Barreto, Humberto

Date Submitted

14-Feb-2019

[Author Dashboard](#)

ANEXO B – DRAFT DO ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, QUALIS A2 NA ÁREA DE FARMÁCIA (FATOR DE IMPACTO: 3.885

Submitted to Journal of Natural Products

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Brachyidin B from *Arrabidaea brachypoda*

Journal:	<i>Journal of Natural Products</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Andrade, Leila; Universidade Federal do Piauí de Oliveira, Aylla Beatriz; Universidade Federal do Piauí Leal, Antonio Linkoln; Universidade Federal do Piauí Portela, Ana Lurdes; Universidade Federal do Maranhão Oliveira, Felipe; Universidade Federal do Piauí Lima Neto, José; Universidade Federal do Piauí Siqueira Júnior, José; Universidade Federal da Paraíba Kaatz, Glenn; JD Dingell VAMC, da Rocha, Cláudia; Universidade Federal do Maranhão Barreto, Humberto; Universidade Federal do Piauí,

SCHOLARONE™
Manuscripts