



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Efeitos dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* (Jucá)
na inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e em conjugação de
plasmídeos de resistência em *Escherichia coli***

ANA RAFAELA SILVA DE MACEDO

AREIA/PB-BRASIL

Março/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Efeitos dos extratos etanólico e hidroetanólico de *Caesalpinia ferrea* (Jucá)
na inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e conjugação de
plasmídeos de resistência em *Escherichia coli***

Ana Rafaela Silva de Macedo

Orientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Emilia Naves Givisiez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do brejo paraibano.

AREIA/PB-BRASIL

Março/2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M141e Macedo, Ana Rafaela Silva de.

Efeitos dos extratos etanólico e hidroetanólico de *Caesalpinia ferrea* (jucá) na inibição de biofilme de *Staphalococcus aureus* e em conjugação de plasmídeos de resistência em *Escherichia coli* / Ana Rafaela Silva de Macedo. - Areia, 2018.

64 f.: il.

Orientação: Celso José Bruno de Oliveira. Coorientação:
Oliveiro Caetano de Freitas Neto,
Patricia Emilia Naves Givisiez.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal - saúde animal. 2. Fitoterápico. 3. Metabolitos secundários. 4. Planta medicinal. 5. Flavonoides. 6. Plasmídeo. I.

Oliveira, Celso José
Bruno de. II. Título.

UFPB/BC

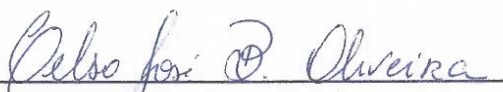
ANA RAFAELA SILVA DE MACEDO

EFEITOS DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HIDROALCÓOLICO DE CAESALPINEA FERREA (JUCÁ) NA INIBIÇÃO DE BIOFILME DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS E EM CONJUGAÇÃO DE PLASMÍDEOS DE RESISTÊNCIA EM ESCHERICHIA COLI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal do Brejo Paraibano.

APROVADA EM 28/03/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof.Dr. CELSO JOSÉ BRUNO DE OLIVEIRA

UFPB

Orientador



Dr. ANTÔNIO SÍLVIO DO EGITO

Examinador



Dra. RENATA MENDONÇA ARAÚJO

Examinadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e incentivo nessa longa caminhada de estudos. Pela saúde que dá a mim e a toda minha família. Aos meus pais Joao Batista e Maria Lucia pelo esforço para me manter esses dois anos de mestrado, pelo incentivo, amor e por me dar bons exemplos e educação. Aos meus irmãos pela amizade, amor e pelos momentos felizes que me proporcionam nesta vida desde pequeno.

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira, pela confiança em mim e no meu trabalho, pelo agradável convívio e pelo auxílio fornecido, sendo fundamental para a realização do trabalho.

À Prof. Dra. Renata Mendonça Araujo por me ceder e orientar no laboratório de química na extração dos extratos.

Às minhas amigas, Cristiane Ribeiro, Carla Caroline, Glycia Machado, Denise Cunha e a Priscylla Carvalho que estiveram sempre comigo em toda caminhada.

A todos do Laboratorio de Analises de protudos de Origem Animal, Alexandre, Nubia por me ajudar na elaboração da minha dissertação e principalmente a Pavlos por me ajudar sempre que eu precisei ate no final de semana.

À Capes (coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida durante todo o período de mestrado, o que possibilitou que me dedicasse exclusivamente á pesquisa e á escrita dessa dissertação

LISTA DE TABELAS

		Paginas
Tabela 1	Classificação taxonômica de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá).	15
Tabela 2	Principais atividades biológicas e composição química de diversas partes de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá).	16
Tabela 3	Substâncias isoladas de <i>Caesalpinia ferrea</i> com referência às partes das quais foram originadas.	17
Tabela 4	Cepas de <i>Staphylococcus spp.</i> produtoras de biofilmes oriundas de mini usinas de leite caprino no Estado da Paraíba.	43
Tabela 5	Perfil de resistência de bactérias isoladas de humanos utilizadas na transferência plasmidial de genes de resistência.	43
Tabela 6	Controle de antimicrobianos no teste de disco de difusão	45
Tabela 7	Rendimentos dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de <i>Caesalpinia férrea</i> (jucá) de acordo com três métodos de extração.	48
Tabela 8	Concentração inibitória mínima (MIC; mg/mL) dos extratos etanólico (EEMC) e hidroalcoólico (EHMC) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	50
Tabela 9	Médias dos halos de inibição (mm) dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) de acordo com o método de disco-difusão contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	51
Tabela 10	Efeitos dos extratos etanólico (EEMC) e hidroalcoólico (EHMC) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) sobre na produção de biofilme em <i>Staphylococcus aureus</i>	52
Tabela 11	Efeito dos extratos etanólico (EEMC) e hidroalcoólico (EHMC) da casca de <i>Caesalpinia ferra</i> (jucá) sobre a taxa de conjugação de plasmídeo de resistência em <i>Escherichia coli</i>	53

LISTA DE FIGURAS

		Paginas
Figura 1	Características morfológicas da árvore (A), da flor (B) e do fruto (C) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá)	14
Figura 2	Conjugação bacteriana	22
Figura 3	Etapas da formação do biofilme	24
Figura 4	Teste da atividade citotóxica de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) com <i>Artemia salina</i>	42
Figura 5	Curva concentração-resposta da mortalidade de <i>Artemia salina</i> ao extrato etanólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) após 24 horas.	49
Figura 6	Curva concentração-resposta da mortalidade de <i>Artemia salina</i> ao extrato hidroalcoólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> (jucá) após 24 horas	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Ampicilina
<i>acrAB-tolC</i>	Genes codificadores da Bomba de efluxo AcrAB-TolC, composta por um canal da membrana externa TolC, o transportador secundário AcrB localizado na membrana interna, e o AcrA periplasmático. O conjunto é capaz de transportar um conjunto diversificado de compostos com pouca similaridade química, conferindo resistência a um amplo espectro de antibióticos.
<i>acrR</i>	Repressor transcricional da bomba de efluxo de acridina <i>acrAB</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração bactericida mínima
CF	<i>Caesalpinia ferrea</i>
CF	Cefalotina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLO	Clorafenicol
CPD	Cefpodoxime
CRO	Ceftriazona
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
LAPOA	Laboratório de Análise de Produto de Origem Animal
LB	Luria Bertani
<i>mef</i>	Gene codificador da bomba de efluxo Mef, conferindo resistência a diferentes macrolídeos, mas não às lincosamidas e streptograminas
<i>msr</i>	Gene codificador de proteína hidrofílica (Msr) dos transportadores ABC responsáveis por resistência aos macrolídeos e estreptograminas
MH -	Ágar Muller Hilton
Nal	Ácido nalidíxico
OXA	Oxacilina
PEN	Penicilina

RI	Rifampicina
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
<i>tet</i>	Gene de resistência à tetraciclina
TET.	Tetraciclina
TSA	Tryptone Soya Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
<i>vga</i>	Gene codificador da proteína Vga, da família ABC-F, que confere resistência à estreptogramina através de proteção ribossomal em <i>Staphylococcus</i> spp.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.....	14
Metabólitos secundários e suas atividades antimicrobianas.....	19
Resistência antimicrobiana.....	20
Biofilmes microbianos.....	22
Bactérias formadoras de biofilmes.....	24
REFERÊNCIAS	26
CAPITULO I- Efeito dos extratos etanólico e hidroalcoólico de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. (jucá) em concentrações subinibitórias sobre a produção de biofilme em <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de conjugação de plasmídeos contendo genes de resistência em <i>Escherichia coli</i>	35
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	39
Material botânico.....	39
Métodos de extração – Preparo dos extratos etanólico e hidroalcoólico.....	39
Maceração.....	39
Turbolise.....	40
Soxhlet.....	40
Rendimentos dos extratos da casca de <i>Caesalpinia férrea</i> Mart	41
Avaliação da atividade citotóxica de <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart em <i>Artemia salina</i>	41
Avaliação microbiológica.....	42
Bactérias.....	42
Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
Determinação da atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão.....	44
Inibição da formação de biofilme por <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.....	45
Ensaio de inibição de conjugação de plasmídeos.....	46
ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

Efeitos dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* (Jucá) na inibição de biofilme de *Staphylococcus aureus* e em conjugação de plasmídeos de resistência em *Escherichia coli*

RESUMO GERAL

Caesalpinia ferrea Mart. (*Caesalpinioideae*), conhecida como jucá ou pau – ferro, é usada tradicionalmente na medicina popular devido a suas atividades antifúngica, antibacteriana, antiulcerogênica, anti-inflamatória e analgésica. Objetivou-se investigar o efeito antibacteriano dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart., em concentrações subinibitórias, sobre a inibição da formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* e sobre a taxa de conjugação plasmideal em *Escherichia coli*. Os extratos etanólico e hidroalcoólico foram extraídos por meio de três técnicas, sendo duas frias (maceração e turbolise) e uma quente (soxhlet). A inibição da formação de biofilme foi determinada *in vitro* em microplacas de poliestireno, utilizando-se cepas de *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilmes. O efeito de *Caesalpinia ferrea* Mart. sobre a taxa de conjugação de plasmídeos de resistência foi realizada utilizando-se as cepas *Escherichia coli* h2332 e *Escherichia coli* J62 como doadora e receptora, respectivamente. De maneira geral, foi possível observar que as bactérias Gram-positivas apresentam valores de MIC inferiores às bactérias Gram-negativas. Os extratos etanólico e hidroalcoólico apresentaram efeito significativo ($p < 0.05$) sobre a inibição da formação do biofilme em *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 1,16mg/mL, 0,582mg/mL, 0,388mg/mL e 0,291 mg/mL (25% CIM). A taxa de transferência plasmideal foi afetada por ambos os extratos (EEMC e EHMC) testados, sendo que para o extrato EEMC ocorreu redução ($p < 0.05$) de -4,24 na taxa de conjugação para as concentrações 2,34 e 1,17 mg/mL (25% e 12,5% da CIM). Em relação ao extrato EHMC, observou-se redução de -3,47 ($p < 0.05$) na taxa de conjugação na concentração de 2,34 mg/mL. Os extratos etanólico e hidroalcoólico apresentaram baixa toxicidade em larvas de *Artemia*, com dose letal 50% de 304,068 $\mu\text{g/ml}$ e 493,549 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Os resultados demonstraram que concentrações subinibitórias dos extratos etanólicos e hidroalcoólico, obtidos a partir da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart, reduziram a produção de biofilme em *Staphylococcus aureus* e a taxa de conjugação de plasmídeos de resistência em *E. coli*.

Palavras-chaves: Fitoterápico, metabolitos secundários, planta medicinal, flavanoides, plasmídeo.

Effects of ethanolic and hydroalcoholic extracts of *Caesalpinia ferrea* (Jucá) on the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm and on conjugation rate of plasmid conferring antimicrobial resistance in *Escherichia coli*

ABSTRACT

Caesalpinia ferrea Mart. (*Caesalpinoideae*), known as jucá or pau - ferro, is traditionally used in folk medicine due to its antifungal, antibacterial, antiulcerogenic, anti - inflammatory and analgesic activities. The objective of this study was to investigate the antibacterial effects subinhibitory concentrations of ethanolic and hydroalcoholic extracts from the bark of *Caesalpinia ferrea* Mart., on, on the biofilm production in *Staphylococcus aureus* and on the conjugation rate of plasmid conferring antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. The ethanolic and hydroalcoholic extracts were extracted by means of three techniques, two cold (maceration and turbolise) and one hot (soxhlet). Inhibition of biofilm production was determined *in vitro* using the 96-well microtiter plate. The effect of *Caesalpinia ferrea* Mart. on the conjugation rate of plasmids was performed using the strains *Escherichia coli* h2332 and *Escherichia coli* J62 as donor and recipient, respectively. In general, lower MIC values were observed for Gram-positive than Gram-negative bacteria. The ethanol and hydroalcoholic extracts had a significant effect ($p < 0.05$) on the inhibition of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*, at concentrations of 1,16 mg / mL, 0.582 mg / mL, 0.388 mg / mL and 0.291 mg / mL (25% MIC). The plasmideal transfer rate was affected by both extracts (EEMC and EHMC), and for the EEMC extract a reduction ($p < 0.05$) of -4.24 in the conjugation rate was observed for the concentrations 2.34 and 1, 17 mg / mL (25% and 12.5% of MIC). In relation to the EHMC extract, a reduction of -3.47 ($p < 0.05$) was observed in the conjugation rate at the concentration of 2.34 mg / mL. The ethanolic and hydroalcoholic extracts presented low toxicity in *Artemia* larvae, with a 50% lethal dose of 304,068 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 493,549 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively. The results showed that subinhibitory concentrations of ethanolic and hydroalcoholic extracts, obtained from *Caesalpinia ferrea* Mart bark, reduced the production of biofilm in *Staphylococcus aureus* and the conjugation rate of plasmids conferring antimicrobial resistance among *E. coli*.

Keywords: Phytotherapeutic, secondary metabolites, medicinal plant, flavanoids, plasmid.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem ganhado relevância global e representa uma das principais ameaças à humanidade, à medida que antimicrobianos outrora utilizados para o tratamento de infecções não são mais eficazes (WHO, 2015). A resistência antimicrobiana tem sido acelerada devido a má utilização das drogas antimicrobianas, havendo associação entre o uso de antimicrobianos e a maior frequência de resistência microbiana (LOUREIRO, 2016). Mecanismos de resistência já foram identificados e descritos para todas as classes de antibióticos atualmente utilizados na prática clínica e na medicina veterinária (WHITE; MCDERMOTT 2001). De acordo com Rapini et al., (2004), uma das maiores preocupações é a disseminação de genes de resistência entre microrganismos, através da transferência horizontal, como a conjugação.

Em busca de combater o problema da resistência bacteriana, há um número crescente de investigações sobre o potencial antimicrobiano de plantas utilizadas na medicina popular, como a copaíba (*Copaifera* spp.), aroeira (*Schinus terebinthifolius*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), romã (*punica granatum*), jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), neem (*Azadiracta indica*), alho (*Allium sativa*), goiaba (*Psidium guajava*) (GNAM; DEMELLO 1999, LIMA et al. 2006, SILVA et al. 2007, SILVA et al. 2008, PEREIRA et al. 2009).

Vários estudos sobre *Caesalpinia ferrea* Mart. (*Caesalpinoideae*), conhecida como jucá ou pau-ferro, comprovaram ações farmacológicas para tratamento de doenças infecciosas e não-infecciosas (BACCHI; SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995; XIMENES, 2004; CARVALHO ET AL., 1996; NAKAMURA ET AL. 2002A; NAKAMURA et al. 2002b). A ação antimicrobiana de *Caesalpinia ferrea* Mart já foi comprovada, com resultados promissores (PEREIRA et al. 2006). Por outro lado, pouco se conhece sobre os afeitos antimicrobianos associados ao seu uso em concentrações inibitórias. Nossa hipótese é que concentrações subinibitórias dos extratos de *Caesalpinia ferrea* Mart possam desencadear efeitos contra mecanismos fisiológicos de bactérias que estão associados à resistência a drogas antimicrobianas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos etanólico e hidroalcoólico proveniente da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart sobre a inibição da formação do biofilme em *Staphylococcus aureus* e a conjugação de plasmídeos que conferem resistência antimicrobiana, em *Escherichia coli*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Caesalpinia ferrea Mart.

A árvore *Caesalpinia ferrea* Mart (Figura 1) pertence à família *Leguminisae-Caesalpinioideae* (*Caesalpinaceae*) e encontra-se distribuída em todo Brasil, com maior predominância nas regiões Norte e Nordeste, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro (PETER et al., 2008). O jucá é uma planta arbórea, com ampla dispersão e tem uma baixa densidade populacional. Apresenta copa arredondada, fechada e densa, com altura média de 10 a 15 m, tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro com bifurcações. Sua casca é externamente acinzentada, lisa e fina, com manchas brancas irregulares, que se contrasta com partes mais escuras, as quais se renovam anualmente. Suas folhas são compostas, bipinadas; apresenta flores amarelas e brilhantes, pequenas, reunidas em panícula terminal de até 20 cm de comprimento.

Figura 1. Características morfológicas da Árvore (A), da flor (B) e do fruto (C) de *Caesalpinia ferrea* Mart (jucá).



Fonte: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br>

O seu fruto é um legume, chato, indeiscente, e escuro quando maduro (LORENZI, 2002). O jucá é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, quanto por fornecer forragem durante a seca aos animais (NASCIMENTO et al., 2002). A sua taxonomia é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Caesalpinia ferrea* (jucá).

	Taxonomia
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Fabales</i>
Família	<i>Fabaceae</i>
Subfamília	<i>Caesalpinioideae</i>
Gênero	<i>Caesalpinia</i>
Espécie	<i>Caesalpinia ferrea</i> ex Mart.

Fonte: Lorenzi (1998)

No ano de 2009, a *Caesalpinia ferrea* Mart. passou por uma reclassificação, sendo conhecida como *Libidibia ferrea* (QUEIROZ, 2009). Nesse estudo optamos por preservar a nomenclatura original para facilitar a comparação dos dados farmacológicos e químicos da literatura.

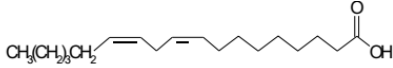
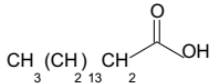
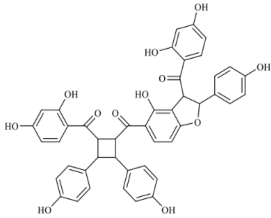
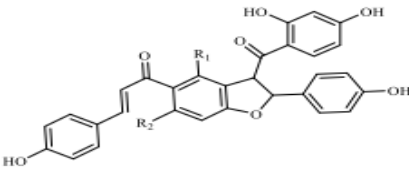
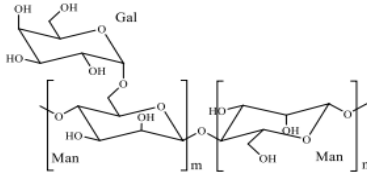
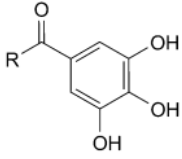
Vários estudos descrevem as ações farmacológicas de extratos e de substâncias isoladas de *Caesalpinia ferrea* Mart., que tem sido utilizada há anos por suas atividades antimicrobiana (SAMPAIO et al., 2009) e quimiopreventiva do câncer (NAKAMURA et al., 2002), analgésica e anti-inflamatória (CARVALHO et al., 1996; PEREIRA et al., 2012), cicatrizante (OLIVEIRA et al., 2010), antiulcerogênica (FALCÃO et al., 2008; BACCHI; SERTIE, 1994).

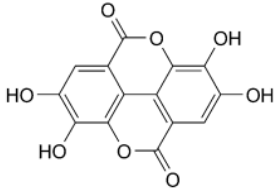
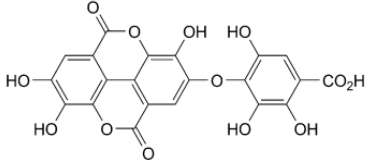
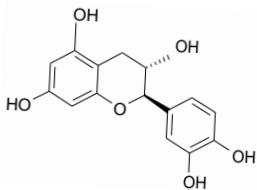
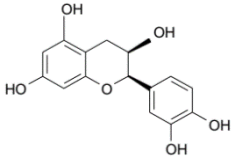
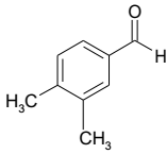
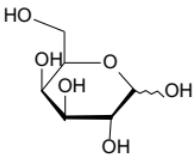
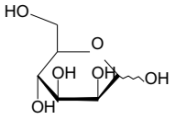
A Tabela 2 apresenta referências sobre a composição química e as atividades biológicas de diversas partes de *Caesalpinia ferrea* Mart. Na Tabela 3 encontram-se as estruturas das substâncias isoladas de *Caesalpinia ferrea* Mart e as partes da planta das quais se originaram.

Tabela 2. Principais atividades biológicas e composição química de diversas partes de *Caesalpinia ferrea* (júcá).

Parte da planta	Atividade Biológica	Composição Química	Referencias
Caule/Lenho	Antiulcerogênica, antioxidante e inibitória da topoisomerase II humana.	Paufferol A, B e C e ácido gálico.	Bacchi; Sertie, 1994; Bacchi et al., 1995; Gonzalez, 2005; Nozaki et al., 2007; Ohira et al., 2013.
Cascas ç	Cicatrizante, desobstruente, regula a absorção de glicose no fígado e músculos, propriedades hipoglicêmicas e induz a hipotensão e vasodilatação.	Taninos, ácido gálico, ácido elágico, catequina e epicatequina.	Corrêa, 1984; Menezes et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Vasconcelos et al., 2011.
Vagem	Anti-inflamatório, antimicrobiano e antitumoral.	Lectina.	Ximenes, 2004; Pereira et al., 2012; Freitas et al., 2012.
Fruto	Anticancerígena, anti-inflamatória, antibacteriana, analgésica, antioxidante, antimicrobiana e inibidor aldose redutase.	Ácido elágico, ácido gálico e galato de metila.	Carvalho et al., 1996; Ueda et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Sudhakar et al., 2006; Sampaio et al., 2009, Vasconcelos et al., 2011; Silva et al., 2011; Lima et al., 2012; Tomaz et al., 2013.
Folhas	Antiulcerogênica, antialérgica, antioxidante, antihistamínica, antimicrobiana e	Galato de metila, ácido gálico, lectina, lupeol, α -amirina e flavonoides (quercetina, isoorientina, vitexina e orientina).	Bacchi; Sertie, 1994; Bacchi et al., 1995; Coelho, 2004; Gonzalez, 2005; Ferreira, 2011; Port's, 2011.
Sementes	Antiviral e inibidor de tripsina.	Galactomanana (galactopirranose e manopirranose).	Souza et al., 2010; Bariani et al., 2012; Lopes et al., 2013; Gallão et al., 2013
Caule/Lenho	Antiulcerogênica, antioxidante e inibitória da topoisomerase II humana.	Paufferol A, B e C e ácido gálico.	Bacchi; Sertie, 1994; Bacchi et al., 1995; Gonzalez, 2005; Nozaki et al., 2007; Ohira et al., 2013.

Tabela 3. Substâncias isoladas de *Caesalpinia férrea* (jucá) com referência às partes das quais foram originadas.

Componente	Molécula	Parte da planta	Referências
Ácido linoleico		Folha Semente	Dias et al., 2013 Sawada et al., 2014
Ácido palmítico		Folha Semente	Dias et al., 2013 Sawada et al., 2014
Paufferol A		Casca/caule	Nozaki et al., 2007
Paufferol B, C	 B. R1= OH, R2=H C. R1=H, R2=OH	Casca/caule	Ohira et al., 2013
Galactomanana		Semente	Souza et al., 2010
Ácido Gálico		Fruto	Nakamura et al., 2002

Ácido elágico		Semente	Ueda et al., 2001
2- (2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) - ácido elágico		Fruto	Ueda et al., 2001
Catequina		Casca/caule	Vasconcelos et al., 2011; Araújo et al., 2014
Epicatequina		Casca/caule	Vasconcelos et al., 2011
3,4-Dimetilbenzaldeído		Folha	Dias et al., 2013
D-galactose		Semente	Lopes et al., 2013
D-manose		Semente	Lopes et al., 2013

Metabólitos secundários e suas atividades antimicrobianas

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007). Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (CHAMPE et al., 2008). Os metabólitos são divididos em primários e secundários.

Os metabólitos primários são fundamentais para a matéria viva, sendo responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento dos organismos (DEMAIN, 2000; DEWICK, 2002). Os metabólitos secundários exercem uma função específica na interação do organismo com o ambiente, sendo interpretados como a integração química entre o organismo e outros seres vivos (BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001). Por serem um fator de interação química, os metabólitos secundários, na maioria das vezes, apresentam atividades biológicas. Muitos desses compostos são importantes na área farmacêutica, pois apresentam novas moléculas que possam vir a ser uma fonte promissora de novos medicamentos úteis para a medicina humana ou veterinária (SANTOS, 2003; HAIDA et al., 2007).

As via metabólica secundária dos vegetais dão origem a várias classes de compostos, tais como flavonoides, alcaloides, isoflavonóides, cumarinas, taninos, glicosídeos e poliacetilenos, que são específicos em determinadas famílias, gênero ou espécie da planta, até pouco tempo suas funções eram desconhecidas (PIASECKA; JEDRZEJCZAK-REY; BEDNAREK, 2015)

Um estudo fitoquímico preliminar da casca do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart revelou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (GONZALEZ et al., 2004). Além disso, ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido elágico também foram identificados por HPLC (VASCONCELO et al., 2011). Pauferrol A, um único derivado de chalconas foi isolado das hastes e a estrutura foi determinada como sendo trímero

chalcone fundido por um anel de ciclobutano (NOZAKI et al., 2007). Dímeros de chalconas, paufferol B e paufferol C também foram isolados (OHIRA et al., 2013).

Os principais mecanismos de ação desses compostos naturais são a desintegração da membrana citoplasmática, fluxo de elétrons, desestabilização da força próton motriz (FPM), coagulação do conteúdo da célula e transporte ativo. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004). Devido ao crescimento e desenvolvimento na área de fitoterápicos, vários pesquisadores identificaram mecanismos de ação de alguns compostos sobre microrganismos. Os flavonóides são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta à infecção microbiana, e tem como mecanismo de ação inibir a capacidade do complexo de proteínas extracelular de se aderir à parede celular bacteriana (KUMAR; PANDEY, 2013). Em relação aos taninos, o seu mecanismo de ação está relacionado com três características geral a complexação com íons metálico, habilidade de complexar com outras bactérias, e a capacidade de inativar o transporte de enzimas e proteínas para celular bacteriana (DONATINI et al., 2009). Já os alcalóides atuam na integridade da membrana externa e citoplasmática, agindo em lipopolissacarídeos e provocando a despolarização e vazamento de conteúdo citoplasmático, ocasionado a susceptibilidade do DNA bacteriano (CUSHNIE; CUSHNIE; LAMB, 2014).

Resistência antimicrobiana

A antibioticoterapia é muito utilizada em diversos tratamentos contra infecções bacterianas, tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. Atualmente, existem várias drogas de diversas classes disponíveis no mercado, constituindo-se nas principais alternativas associadas ao tratamento de infecções (MOTA et al., 2005).

O principal problema no uso de antimicrobianos é a resistência bacteriana às drogas utilizadas. A resistência antimicrobiana refere à capacidade da bactéria de se multiplicar na presença de concentrações de antibióticos que geralmente seriam eficazes contra elas, requerendo, portanto, concentrações bastante superiores para gerar algum efeito bactericida ou bacteriostático (DAVIES, 2010).

As bactérias apresentam vários mecanismos de resistência a drogas antimicrobianas que podem ser intrínsecos ou adquiridos. Esses mecanismos ocorrem através de alteração de permeabilidade da membrana citoplasmática da bactéria às moléculas do antibiótico, bombas de efluxo capazes de eliminar a droga para o meio extracelular ou alteração do alvo da molécula.

A alteração da permeabilidade está associada principalmente às bactérias Gram negativas, por possuírem porinas na sua membrana, as quais servem como canais de entrada dos nutrientes e outros elementos para o interior da célula. Modificações genéticas dessas proteínas acarretam na diminuição de entradas desses compostos no interior da bactéria, tornando-as resistentes (ZAMAN et al., 2017).

A bomba de efluxo é um mecanismo dependente de proteínas da membrana da célula bacteriana que exporta os antibióticos para o meio extracelular, mantendo as concentrações do interior em níveis baixos. Este mecanismo de resistência pode ocorrer contra todas as classes de antibióticos, atingindo principalmente as fluoroquinolonas, macrolídeos e tetraciclina (DZIDIC et al., 2008), e pode estar presente tanto em bactérias Gram positivas quanto em bactérias Gram negativas. São vários os genes de resistência que codificam diferentes transportadores de antibióticos, tais como os genes *vga*, *mef* e *msr* em cocos Gram positivos resistentes a macrolídeos, estreptogramina B e lincosamina. O gene *tet* está relacionado à resistência a tetracilinas, e o gene *acrR* que codifica o sistema de efluxo *acrAB-tolC*, encontrado em *Escherichia coli* e em outras bactérias (BAPTISTA, 2013).

As alterações genéticas do alvo podem ser originadas de uma mutação cromossômica ou pela aquisição de plasmídeos de resistência. Essa resistência é mediada por mutações e geralmente simples, isto é, atinge apenas um antibacteriano. Quando mediada por fator R (plasmídeo), pode ser simples, mas na maioria das vezes é múltipla, tornando a bactéria resistente a dois ou mais antimicrobianos. Isso se deve à presença de genes de resistência, para diferentes antibióticos, em um só plasmídeo (BLANCO et al., 2016).

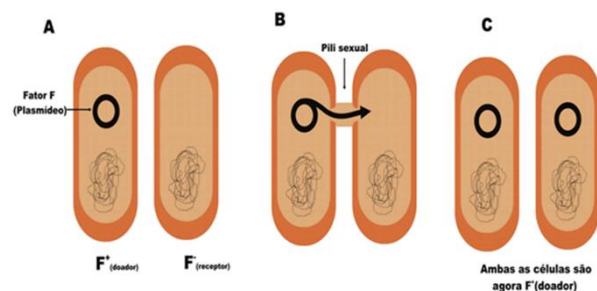
A resistência adquirida, decorrente da aquisição de material genético, pode ocorrer através de três mecanismos: transformação, transdução ou conjugação. Esses mecanismos envolvem elementos genéticos móveis como plasmídeos, elementos transponíveis (transposons) e fagos transdutores. A transformação é o processo em que o DNA do meio ambiente, liberado por uma célula bacteriana passivamente após a morte ou lise, é absorvido por células bacterianas e incorporado (LORENZ; WACKERNAGEL, 1994; MATSUI et al., 2003; KELLY et al., 2008).

A transdução é um processo de transferência mediada por bacteriófagos, os quais injetam seu material genético, que se estabiliza, seja formando um elemento de replicação autônoma ou por integração no DNA bacteriano, podendo dirigir a produção de novas partículas

fágicas. Deste modo, o plasmídeo bacteriano ou o DNA genômico de diferentes comprimentos podem ser transferidos de uma bactéria para outra, dependendo do fago envolvido.

A conjugação é um processo de transferência de material genético unidirecional, entre duas células (Figura 2), através de fímbria ou pilus sexual de uma bactéria doadora para uma bactéria receptora. Essa habilidade de uma bactéria conjugar é codificada por um plasmídeo, que são chamados plasmídeos F, termo derivado de “fertilidade” ou plasmídeo conjugativo. Os plasmídeos são segmentos de DNA com fita dupla e auto replicantes, podendo se transferir genes funcionais a outras bactérias por um canal proteico (fímbria) (CALHAU et al., 2013). A bactéria receptora, ao adquirir o plasmídeo que pode conter determinados genes de resistência (plasmídeo R), passa a expressar novas característica, tornando-se normalmente resistentes ao aumento da pressão seletiva a uma determinada droga ou várias drogas, tornando-se multirresistente (ANDRUP; ANDERSEN 1999).

Figura 2. Conjugação bacteriana.



Fonte: wesleibio 2015

Biofilmes microbianos

Nos ambientes naturais, os microrganismos não existem apenas de forma isolada, mas crescem e sobrevivem em comunidades organizadas, podendo formar agregados celulares em suspensão ou até películas em superfícies (SHARMA; ANAND, 2002). As comunidades bacterianas que desenvolvem na fase de interfaces como sólido-líquido, líquido-líquido, ou interfaces ar-líquidos, são chamadas de biofilmes (JENKINSON; LAPPINSCOTT, 2001). O biofilme é definido como comunidades funcionais de microrganismo aderidos a uma superfície biótica, cujas células estão envolvidas por uma matriz de exopolímeros (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003). Para se considerar que as células aderidas constituem um biofilme, Andrade et al, (1998) sugerem que seja necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas

por cm^2 , enquanto Ronner e Wong (1993) e Wirtanen et al (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , respectivamente.

Descobertas notáveis ocorreram na investigação dos biofilmes devido à aplicação de tecnologias microscópicas e moleculares. Diante disso, os biofilmes passaram a ser observados com um sistema biológico de alto nível de organização, onde as bactérias apresentam-se em comunidade estruturada, coordenadas e funcionais (DAVEY; O'TOOLE, 200).

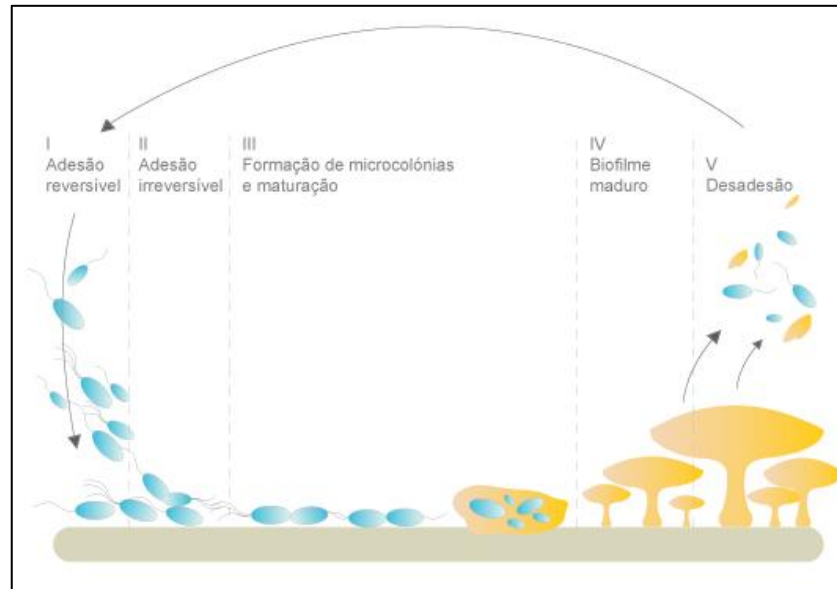
Os biofilmes são contituidos por microrganismos que crescem inclusos em uma matriz, formando agregados de microcolônias intercaladas com microcanais que fornecem nutrientes, oxigênio e remoção dos resíduos (O'GARA; HUMPHERYS, 2001; ILYIANA et al., 2004). O principal componente estrutural do biofilme são substâncias poliméricas extracelulares ou matriz. A matriz é constituída por vários componentes, tais como exopolissacarídeo (EPS), proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias (ILYINA et al., 2004).

A composição da matriz extracelular é complexa e varia entre diferentes espécies bacterianas ou mesmo dentro da mesma espécie, e de acordo com diferentes condições ambientais. Apesar da heterogeneidade, o exopolissacarídeo é considerado componente essencial da matriz, embora, algumas proteínas de superfície exercem papel crucial na adesão inicial das células microbianas às superfícies (LASA; PENADÉS, 2006).

Exopolissacarídeos determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano (TIELKER et al., 2005). O EPS contribui para a maior parte do volume de um biofilme, sendo responsável por sua propriedade macroscópica viscosa (STEPHENS, 2002). Ademais, age como adesivo e barreira defensiva, protegendo a célula a resistir a condições de estresse múltiplo, tais como a exaustão de nutrientes e água, a presença de biocidas, outros agentes antimicrobianos e condições ambientais diversas (KIVES et al., 2006).

Os processos de formação do biofilme incluem (Figura 3) : (i) pré-adesão, onde os microrganismos planctônicos são estimulados através de fatores como temperatura, pH e disponibilidade de nutriente, (ii) o transporte das células planctônicas para a superfície, (iii) adesão reversível e a interação da célula com a superfície, acarretando em colonização inicial, com forças atrativas e repulsivas, e (iv) adesão irreversível, caracterizada pela presença de micro colônias e aumento da produção de EPS, além da produção de moléculas para a sinalização célula-célula dentro do biofilme, influenciando seu crescimento (OULAHAL et al., 2008).

Figura 3. Etapas da formação do biofilme.



Fonte: ulisboa 2013

Bactérias formadoras de biofilmes

Em condições favoráveis, alguns microrganismos podem ser capazes de formar biofilme (McLandsborough et al., 2006). O microrganismo mais frequentemente associado à formação de biofilmes são as bactérias, sendo que algumas delas apresentam maior potencial. O primeiro relato sobre a formação de biofilme envolveu *Salmonella* aderida às superfícies na indústria de alimentos (Duguid et al., 1996). Dentre as bactérias frequentemente associadas aos biofilmes, destaca-se *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), uma bactéria Gram positiva, mesófila, que apresenta crescimento numa ampla faixa de temperatura e, frequentemente, encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas e animais saudáveis. Entretanto, pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção até doenças graves.

Na formação do biofilme, *S. aureus* se adere facilmente sobre superfícies bióticas ou abióticas. A bactéria é frequentemente encontrada no leite e em superfícies em contato com o alimento. Lira et al. (2015) identificaram que, de 60 *S. aureus* isolados na cadeia de produção de leite de cabra, 27 eram produtores de biofilme e foram isolados de diferentes fontes, como leite, mão do manipulador e tanque onde o leite era armazenado.

O *S. aureus* está envolvido em diversas infecções intramamárias de fêmeas em lactação, sendo o principal agente causador da mastite em bovinos (CARDOSO et al., 2000). Essa espécie bacteriana é responsável por diversas infecções crônicas ou agudas. O leite contaminado ou seus derivados podem representar sério problema de saúde pública (MATSUNAGA et al., 1993; ICHIKAWA et al., 1996). Isso se deve, em virtude de algumas cepas desse microrganismo poderem produzir uma grande variedade de toxinas extracelulares e de fatores de virulência. As exotoxinas são produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas e decorrem da multiplicação e do metabolismo desses microrganismos. São classificadas em três tipos, de acordo com o local de ação: neurotoxinas, que interferem na transmissão normal de impulsos nervosos; citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro afetando as suas funções; e as enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal, ocasionando distúrbios digestivos (TORTORA et al., 2002).

As enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus* pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas associadas com intoxicações alimentares e diversas formas de alergias (BALABAN; RASOOLY, 2000). Cinco enterotoxinas estafilocócicas EE clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são as causas mais comuns de intoxicação alimentar. Além disso, dezesseis novos tipos de EE ou superantígenos (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU e SEV) também foram descritos e avaliados (KIM et al., 2011). Essas enterotoxinas são proteínas simples, estáveis ao aquecimento (100°C por 30 minutos) e principalmente resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, e não são inativadas totalmente pelo processo de pasteurização (OMOE et al., 1994).

Diante dos perigos associados a microrganismos resistentes a antimicrobianos e sua presença na cadeia alimentar, há necessidade premente de buscar alternativas que reduzam a disseminação de resistência. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart, em concentrações subinibitórias, na produção de biofilme produzido por *Staphylococcus aureus* e na conjugação de plasmídeos contendo genes de resistência em *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J.; BRIDGENAM, T. A.; ZOTTALA, E. A, Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods, **Journal of Food Protection**, [s.l.], v.61, p.833-838, 1998.
- ANDRUP, L.; ANDERSEN, K. A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, [s.l.], v. 145, p.2001-2009, 1999.
- BACCHI, E. et al. Antiulcer Action and Toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 61, p.204-207, 1995.
- BACCHI, E.; SERTIÉ, J. Antiulcer Action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in Rats. **Planta Medica**, [s.l.], v. 60, p.118-120, abr. 1994.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.1-10, 2000.
- BALBACH, A. **As Plantas que curam**. Editora Missionária, São Paulo, 2a ed., 1972.
- BAPTISTA, M, G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, 2013.
- BARIANI, A. et al. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 38, p. 131-138, 2012.
- BLANCO, P. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, [s.l.], v. 4, p.14-19, 2016.
- BORGES, Maria de Fatima et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 38, p.1431-1438, ago. 2008.

BRIZUELA, María Antonieta et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 15, p.69-74, 1998.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 94, p.223-253, 2004.

CALHAU, V. et al. Prevalent combination of virulence and plasmidic-encoded resistance in ST 131Escherichia colistrains. **Virulence**, [s.l.], v. 4, p.726-729, 2013.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de Staphylococcus aureus isoladas de mastite bovina, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v.52, p.7-10, 2000.

CARVALHO, J. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of Caesalpinia ferrea crude extract. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 53, p.175-178, 1996.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. 7 ed. Rio de Janeiro: **Vozes**; 2008.

CRISAN, I. et al. Natural própolis extract nivcrisol in the treatment of acute and chronic rihnopayngitis in children. **Romanian Journal of Virology**, [s.l.], v.46, p.115-133, 1995.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal Of Antimicrobial Agents**. [s.l.], v. 26, p.343-356, 2005.

CUSHNIE, T. P. T.; CUSHNIE, B; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.377-386, 2014.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Moelecular Biology Reviews**, [s.l.], v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.417-433, 2010.

DEMAIN, A. L. **Indiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future**. In: LUIJENDIJK, T.J.C. Ed. Years of Natural Products Research Past, Present and future. 1ª e.d. Leiden: Phytoconsult, p. 119-136, 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. London: John Wiley & Sons, 2002.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v.13, p.16-34, 2000.

DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, p.89-94, 2009.

DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in salmonellae. **The Journal Of Pathology And Bacteriology**, [s.l.], v. 92, p.107-137, 1966.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, [s.l.], v. 46, p. 11-21, 2008.

FERREIRA, M. C. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 126, p. 159- 175, 2009.

FREITAS, A. C. C. et al. Biological Activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferreav. parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2012, p.1-7, 2012.

GALLÃO, M. I. et al. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 47, p. 58- 62, 2013.

GNAM, S. O.; DEMELLO, M. T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. **Journal of Ethno-Pharmacology**, [s.l.], v.40, p.70-89, 2004.

GONZALEZ F. G.; BARROS S. B. M.; Bacchi E. M. 2004. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. Anais IX Semana da Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 40 (Supl 1): 79.

GONZALEZ, F. G. *Estudo farmacognóstico e farmacológico de Caesalpinia ferrea Martius*. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HAIDA, K. S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, [s.l.], v. 11, p. 185-192, 2007.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v.97, p. 1027-1031, 2002.

ICHIKAWA, M.; ICHIKAWA, T.; MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin1, and coagulase type of Staphylococcus aureus strains isolated from bovines and humans in the same district. **Journal of Animal Science and Technology**, [s.l.], v.67, p.780-786, 1996.

ILYINA, N.; BJARNSHOLT, T.; ROMANOVA, Y. M.; GINTSBURG, A. L. Biofilms as mode of existence of bacteria in external environment and host body: the phenomenon, genetic control, and regulation systems of development. **Russian Journal of Genetics**, [s.l.], v.40, p.1189-1198, 2014.

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOOT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v.9, p.9-10, 2001.

KIM, N.H.; YUN, A.-R.; RHEE, M.S. Prevalence and classification of toxigenic Staphylococcus aureus isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v.111, p.1456-1464, 2011.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated-EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v.52, p. 123-127, 2006.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2013, p.1-16, 2013.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. **The paradigm of secondary metabolism. Plant. Physiology**, [s.l.], v. 125, n.3, p. 58-60, 2001.

LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bab: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, [s.l.], v. 157, p. 99-107, 2006.

LIMA, M. R. F.; BATTISTIN, A.; CASRAGNA, A. V.; NIURA, A. H.; WITT, M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, [s.l.], v.35, p.371-376, 2005.

LIMA, S. M. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s.l.], v. 22, p. 169-175, 2012.

LIRA, M. C. et al. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, [s.l.], v. 10, p.932-938, 2016.

LOPES, Nayara et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 60, n.3, p.93-99, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3º ed Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 351p.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [s.l.], v. 34, p.77-84, 2016.

MATSUNAGA, T. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated from Peracute, Acute and Chronic Bovine Mastitis. **The Journal Of Veterinary Medical Science**, [s.l.], v. 55, p.297-300, 1993.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 47, p.41-47, 2007.

MOTA R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO. W, J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multiresistência bacteriana.

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, [s.l.], v. 42, p. 465-470, 2005.

NAKAMURA, E. S. Cancer chemopreventive effects of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, [s.l.], v.177, p.119-24, 2002.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v.50, p. 582-587, 2001.

OHIRA, S. et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 54, p.5052-5055, 2013.

OLIVEIRA, G. P. et al. Antimicrobial activity in vitro of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* L. against microorganisms of the oral cavity. **Revista Fitos**, [s.l.], v. 8, p.73-160, 2013.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHAINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v.246, p.191-198, 2005.

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, [s.l.], v. 19, n.2, p. 178- 185, 2008.

PAIVA, W. S. et al. Atividade antibacteriana da casca do jucá (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz), frente a *staphylococcus* spp. isolados do leite de cabras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.141-146, 2015.

PEREIRA, L. P. et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential antiinflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 139, n.3, p. 642-648, 2012.

PETERS, V. M.; SOUZA, S. O.; CARVALHO, J. C. T.; BORGES, L. V.; GUERRA, M. O. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. **Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas**, [s.l.], v.7, p.268-272, 2008.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **New Phytologist**, [s.l.], v. 206, p.948-964, 2015.

PORT'S, P. S. *Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira*. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

QUEIROZ LP. Leguminosa da caatinga. Feira Interactions in Biofilms. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v.9, p. 859-871, 2002.

RAPINI, L. S. TEIXEIRA, J. P. MARTINS, N. E. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v.56, p.130-133, 2004.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. I. Biofilm development na santizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v.56, p.750-758, 1993.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3^oed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 403-434, 2003.

SHARMA, M.; ANANND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 19, p. 627-636, 2002.

SILVA, L. C. N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 49, p. 2222-2228, 2011.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l.], v.43, p.573-583, 2010.

STEPHENS, C. Microbiology: breaking down biofilms. **Current Biology**, [s.l.], v.12, p. 132-134, 2002.

SUDHAKAR, M. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 77, p. 378-380, 2006.

TIELKER, D.; HACKER, S.; LORIS, R.; STRATHAMANN, M.; WINGENDER, J.; WILHELM, S.; ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. *Pseudomonas aeruginosa* lectin Lec B is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. **Microbiology**, [s.l.], v.151, p.1313-1323, 2005.

TOMAZ, K. L. R.; ABRANTES, M. R.; ROCHA, M. O. C. et al. Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadoras de mastite bovina. **Acta Scientia Veterinariae**, [s.l.], v.41, n.1, p.1143, 2013.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. 827p

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 8, p. 377-381, 2001.

VASCONCELOS, C. F. B. et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 137, p.1533-1541, 2011.

WHITE, D.g.; MCDERMOTT, P.f. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 84, p.151-155, 2001.

WIRTANEN, G.; SALO, S.; HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbiological evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v.59, p.727-733, 1996.

WORLD, H. O. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Evaluation of certain veterinary drug residues in food WHO Technical Report Series 954]. Geneve: **Who Library Cataloguing in Publication Data**; 2009. 135p.

XIMENES, N. C. A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem da *Caesalpinia ferrea* (CfePL): aplicação biológica**. 2004. 53p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife.

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial Activity of Perilla Seed Polyphenols against Oral Pathogenic Bacteria. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 66, p.921-924, 2002.

ZACCHINO, S.; YUNES, R.; CECHINEL, V.; ENRIZ, R. D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J. C. **The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall.** In: Mahendra Rai, Donatella Mares (Eds.) *Plant Derived Antimycotics*, Haworth Press (New York), 2003.

ZAMAN, S.; HUSSAIN, M.; NYE R, et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, [s.l.], v. 9, p. 443-67, 2017.

Efeito dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* Mart. (jucá) em concentrações subinibitórias sobre a produção de biofilme em *Staphylococcus aureus* e taxa de conjugação de plasmídeos contendo genes de resistência em *Escherichia coli*.

Resumo

Caesalpinia ferrea Mart. (Caesalpinoideae), conhecida como jucá ou pau – ferro, é usada tradicionalmente na medicina popular devido a suas atividades antifúngica, antibacteriana, antiulcerogênica, anti-inflamatória e analgésica. Objetivou-se investigar o efeito antibacteriano dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart., em concentrações subinibitórias, sobre a inibição da formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* e sobre a taxa de conjugação plasmideal em *Escherichia coli*. Os extratos etanólico e hidroalcoólico foram extraídos por meio de três técnicas, sendo duas frias (maceração e turbolise) e uma quente (soxhlet). A inibição da formação de biofilme foi determinada *in vitro* em microplacas de poliestireno, utilizando-se cepas de *Staphylococcus aureus* formadoras de biofilmes. O efeito de *Caesalpinia ferrea* Mart. sobre a taxa de conjugação de plasmídeos de resistência foi realizada utilizando-se as cepas *Escherichia coli* h2332 e *Escherichia coli* J62 como doadora e receptora, respectivamente. De maneira geral, foi possível observar que as bactérias Gram-positivas apresentam valores de MIC inferiores às bactérias Gram-negativas. Os extratos etanólico e hidroalcoólico apresentaram efeito significativo ($p < 0.05$) sobre a inibição da formação do biofilme em *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 1,16mg/mL, 0,582mg/mL, 0,388mg/mL e 0,291 mg/mL (25% CIM). A taxa de transferência plasmideal foi afetada por ambos os extratos (EEMC e EHMC) testados, sendo que para o extrato EEMC ocorreu redução ($p < 0,05$) de -4,24 na taxa de conjugação para as concentrações 2,34 e 1,17 mg/mL (25% e 12,5% da CIM). Em relação ao extrato EHMC, observou-se redução de -3,47 ($p < 0,05$) na taxa de conjugação na concentração de 2,34 mg/mL. Os extratos etanólico e hidroalcoólico apresentaram baixa toxicidade em larvas de *Artemia*, com dose letal 50% de 304,068 $\mu\text{g/mL}$ e 493,549 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Os resultados demonstraram que concentrações subinibitórias dos extratos etanólicos e hidroalcoólico, obtidos a partir da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart, reduziram a produção de biofilme em *Staphylococcus aureus* e a taxa de conjugação de plasmídeos de resistência em *E. coli*.

Palavras-chaves: Fitoterápico, metabólitos secundários, planta medicinal, flavanoides, plasmídeo

Effects of subinhibitory concentrations of ethanolic and hydroalcoholic extracts of *Caesalpinia ferrea* Mart. on the production of biofilm by *Staphylococcus aureus* and conjugation rates of plasmids conferring antimicrobial resistance in *Escherichia coli*

ABSTRACT

Caesalpinia ferrea Mart. (Caesalpinoideae), known as jucá or pau - ferro, is traditionally used in folk medicine due to its antifungal, antibacterial, antiulcerogenic, anti - inflammatory and analgesic activities. The objective of this study was to investigate the antibacterial effects subinhibitory concentrations of ethanolic and hydroalcoholic extracts from the bark of *Caesalpinia ferrea* Mart., on, on the biofilm production in *Staphylococcus aureus* and on the conjugation rate of plasmid conferring antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. The ethanolic and hydroalcoholic extracts were extracted by means of three techniques, two cold (maceration and turbolise) and one hot (soxhlet). Inhibition of biofilm production was determined *in vitro* using the 96-well microtiter plate. The effect of *Caesalpinia ferrea* Mart. on the conjugation rate of plasmids was performed using the strains *Escherichia coli* h2332 and *Escherichia coli* J62 as donor and recipient, respectively. In general, lower MIC values were observed for Gram-positive than Gram-negative bacteria. The ethanol and hydroalcoholic extracts had a significant effect ($p < 0.05$) on the inhibition of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*, at concentrations of 1,16 mg / mL, 0.582 mg / mL, 0.388 mg / mL and 0.291 mg / mL (25% MIC). The plasmideal transfer rate was affected by both extracts (EEMC and EHMC), and for the EEMC extract a reduction ($p < 0.05$) of -4.24 in the conjugation rate was observed for the concentrations 2.34 and 1, 17 mg / mL (25% and 12.5% of MIC). In relation to the EHMC extract, a reduction of -3.47 ($p < 0.05$) was observed in the conjugation rate at the concentration of 2.34 mg / mL. The ethanolic and hydroalcoholic extracts presented low toxicity in *Artemia* larvae, with a 50% lethal dose of 304,068 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 493,549 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. The results showed that subinhibitory concentrations of ethanolic and hydroalcoholic extracts, obtained from *Caesalpinia ferrea* Mart bark, reduced the production of biofilm in *Staphylococcus aureus* and the conjugation rate of plasmids conferring antimicrobial resistance among *E. coli*.

Key words: Phytotherapeutic, secondary metabolites, medicinal plant, flavanoids, plasmid

INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é, atualmente, uma das principais ameaças à saúde pública global (WHO, 2015). Trata-se de um problema de difícil solução, em decorrência da complexidade epidemiológica. Nesse contexto, destaca-se o fenômeno de transferência horizontal dos genes de resistência, através de mecanismos como conjugação, transformação, transdução e transposição (EXNER et al., 2017). A disseminação de plasmídeos que codificam genes de resistência às beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL), por exemplo, é capaz de conferir resistência a cefalosporinas de terceira geração e a todos os beta-lactâmicos (ROSSOLINI et al., 2008), geralmente observadas em Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (PATERSON; BONOMO, 2005). As cefalosporinas são drogas antimicrobianas de elevada importância clínica na medicina humana e veterinária (WEGENER, 2003; BUSH et al., 2010) e os fenótipos de resistência a múltiplos fármacos mediados por plasmídeos são responsáveis por desencadear resistência a antibióticos em tratamento de doenças infecciosas (KUMAR et al., 2013).

A formação de biofilme também constitui um importante mecanismo utilizado pelas bactérias que favorece a resistência aos antibióticos. Os biofilmes são comunidades de células bacterianas que podem ser encontradas fixadas a superfícies bióticas ou abióticas (BAZZAZ et al., 2010) e protegidas por uma matriz extracelular composta principalmente de exopolissacarídeo (GOMASE; LINN, 2012). A formação do biofilme garante que as bactérias sobrevivam em ambientes hostis, através de modificações fisiológicas e de comportamento (SIMÕES et al., 2010). Quando as bactérias se fixam e se multiplicam na forma de biofilme, tornam-se mais resistentes a antibióticos, biocidas e outras substâncias físicas e químicas (LIRA et al., 2013). A transferência de genes resistências pelo mecanismo de conjugação é favorecida pela formação do biofilme, devido principalmente, à proximidade espacial das bactérias e as condições ambientais favoráveis dentro do biofilme (MATEO; VERA, 2004).

Alguns agentes sintéticos de cura de plasmídeos, ou seja, capazes de reverter a resistência, tais como brometo de etídio e laranja de acridina, não são adequados para aplicação terapêutica devido à sua natureza tóxica. Existe, portanto, a necessidade de investigar compostos alternativos no combate à disseminação da resistência antimicrobiana (SPENGLER et al., 2006; STAVRI et al., 2007). Neste contexto, os produtos derivados de plantas vêm sendo propostos como candidatos potenciais de drogas para combater os mecanismos de resistência bacteriana (HOLLANDER et al., 1998), sejam através da reversão de resistência ou inibição da transferência horizontal dos genes que conferem resistência, ou mesmo através da inibição de formação de biofilme.

Caesalpinia ferrea Mart. (Caesalpinoideae), conhecida como jucá ou pau-ferro, é usada tradicionalmente na medicina popular para tratamento de afecções bronco-pulmonares, diabetes, reumatismo, câncer, distúrbios gastrintestinais, diarreia, inflamação e dor (BALBACH, 1972; BACCHI et al. 1995; CARVALHO et al. 1996; NAKAMURA et al. 2002; OLIVEIRA, 2008). Pesquisas mostram que o jucá possui atividade antifúngica e antibacteriana (LIMA et al., 1997; XIMENES, 2004), antiulcerogênica (BACCHI; SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995) e anti-inflamatória, bem como, propriedades analgésicas (CARVALHO et al., 1996). A *Caesalpinia ferrea* Mart é uma espécie rica em metabólitos secundários tais como; flavonoides, taninos, saponinas, esteroides, cumarinas e compostos fenólicos (WYREPKOWSKI et al., 2014). Estes compostos, portanto, são utilizados para o tratamento de várias doenças. Até o presente momento, não há informações científicas sobre o efeito do extrato da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart sobre a taxa de conjugação de plasmídeos contendo genes de resistência e sobre a produção de biofilme por microrganismos.

O presente estudo objetiva investigar os efeitos dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart, em concentrações subinibitórias, sobre a

inibição da formação de biofilme em *Staphylococcus aureus* e da taxa de conjugação de plasmídeos contendo genes de resistência em *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

A casca de *Caesalpinia ferrea* Mart foi coletada no dia 23 de junho de 2017 na Fazenda Santana, localizada no município de Passagem no estado do Rio Grande do Norte, com as seguintes coordenadas geográficas: altitude entre 200 a 207 metros, longitude 35° 22' 35.0'' e latitude 6°15' 47,4'', e depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com o número de tombo UFRN00024864.

Após a coleta, o processo de secagem da amostra (casca do caule) foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal da UFPB (LAANA). A casca foi seca em estufa de circulação forçada de ar (Dellta equipamentos para Laboratório) durante 72 horas. Posteriormente, o material foi processado no moinho de faca tipo wille Tecnal (Tecnal Equipamentos para laboratórios) até a granulometria de 20 mesh.

Métodos de extração – Preparo dos extratos etanólico e hidroalcoólico

A obtenção dos extratos vegetais foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Realizou -se três tipos de extração, sendo duas extrações a frio (maceração e tubolise) e uma extração a quente (soxhlet).

Maceração

Através deste método de extração foram obtidos os extratos brutos de *Caesalpinia ferrea* Mart., denominados extrato etanólico maceração casca (EEMC) e extrato hidroalcoólico maceração casca (EHMC). Foram adicionados cerca de 45 g do material vegetal triturado (casca do caule) em um béquer (600 mL), onde se verteu 200 mL de etanol para o extrato etanólico.

Para o extrato hidroalcoólico, utilizou-se uma proporção de 70/30% (70% de etanol puro e 30% de água destilada). O béquer tampado foi então mantido durante 7 dias em condições ambientais.

Após esse período, a solução foi filtrada vertida em balão de fundo redondo, e levada ao rotoevaporador (Fitsom) com pressão reduzida, à temperatura de 78°C e 35 rpm. Em seguida, essa solução foi resuspendida em metanol e desidatada em um novo béquer (tarado e pesado), o qual foi conduzido a uma placa secadora, onde permaneceu até ocorrer a secagem completa do extrato. Por fim, o béquer (250 mL) contendo o extrato seco foi selado, pesado para obter a massa do extrato, identificado e armazenado em temperatura ambiente até ser utilizado nos ensaios microbiológicos.

Turbolise

Com este método de extração foram obtidos os extratos brutos de *Caesalpinia ferrea* Mart, o Extrato Etanólico Turbolise Casca (EETC) e o Extrato Etanólico Turbolise Casca (EHTC). Foram adicionados cerca de 45 g do material vegetal triturado (casca do caule) no copo de liquidificador (1000 mL) juntamente com 200 mL de etanol puro para o extrato etanólico. Para o extrato hidroalcoólico utilizou-se uma proporção de 70/30% (70% etanol puro e 30% água destilada). O aparelho de liquidificador (Mondial) realizou 1000 rpm durante 5 minutos, e isso foi repetido 10 vezes. Após esse período, a solução foi filtrada e processada de modo idêntico ao descrito para a técnica de maceração.

Soxhlet

Através deste método de extração foram obtidos os extratos brutos de *Caesalpinia ferrea* Mart, o Extrato Etanólico Soxhlet Casca (EESC) e o Extrato Hidroalcoólico Soxhlet Casca (EHSC). Os extratos foram preparados em extrator tipo Soxhlet com etanol (100% puro) para o extrato etanólico e uma proporção de 70/30 (70% de etanol puro e 30% de água destilada)

no extrato hidroalcoólico. Foram adicionados 45 g do material vegetal (casca do caule) envolvido em um papel filtro (Whatman) e, então, acondicionados no interior da parte extratora do aparelho de Soxhlet, que foi acoplado a um balão de fundo redondo (500 mL) contendo 200 mL dos respectivos solventes. O sistema foi deixado em manta de aquecimento (Nalgon) a 100°C, por 8 horas. Após este período a solução foi processada de modo idêntico ao descrito para a técnica de maceração.

Rendimentos dos extratos da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart

Após a obtenção dos extratos, o procedimento para cálculo do rendimento foi a partir da pesagem dos frascos de vidro vazios, seguido da pesagem após evaporação do solvente, quantificando, dessa forma, a massa seca do extrato bruto. A determinação do percentual de rendimento (%) de cada extrato seco foi realizada utilizando a equação 1:

$$\% R = \text{mes} / \text{mpc} \times 100 \quad (1)$$

Na qual;

% R = Percentual de rendimento

mes = Massa do extrato sólido

mpc = Massa do pó da casca da *H. bracteatus* (base seca)

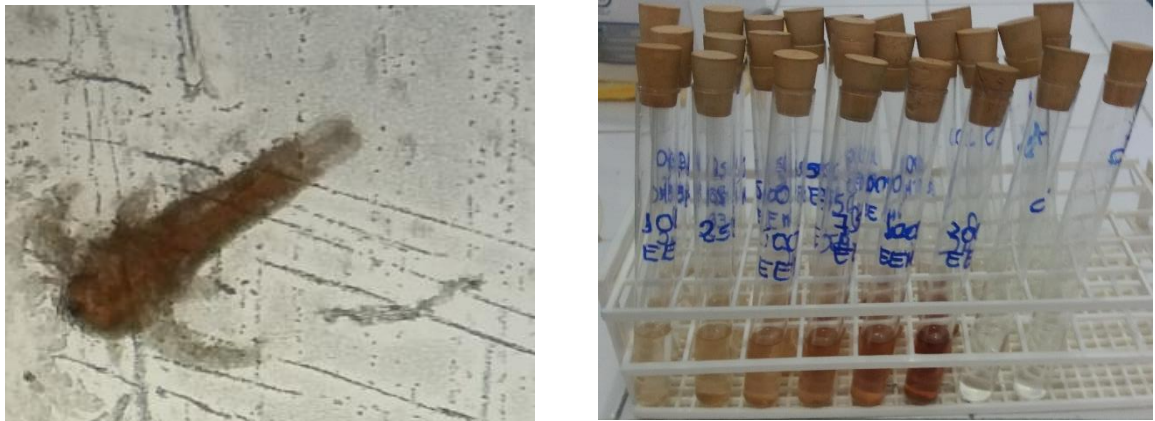
Avaliação da atividade citotóxica de *Caesalpinia ferrea* Mart em *Artêmia salina*

A metodologia utilizada foi de Meyer e colaboradores (1982), com adaptações. Preparou-se uma solução salina (com sal grosso e água mineral) na concentração de 30g de sal para 1l de água. Utilizou-se 70 mg de ovos de *Artêmia salina*, que foram colocados para eclodir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25 °C.

Após a eclosão dos ovos, cerca de dez larvas de *Artêmia salina* foram transferidas com uma micropipeta para tubos de ensaio contendo solução salina e a amostras a serem testadas em diferentes concentrações (Figura 4). O teste foi acompanhado de controle negativo para cada substância a ser testada só com 5 ml de água salina e para o controle positivo 4 ml de água

salina + 1 ml de DMSO 10% (Dimetil Sufóxido-Neon). As substâncias testadas foram os extratos etanólicos e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* Mart nas concentrações 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 µg/mL. Cada concentração testada foi realizada em triplicata. A determinação da toxicidade foi realizada por meio do percentual de mortalidade das larvas e corrigida através da Fórmula de ABBOTT (1925).

Figura 4. Teste da atividade citotóxica de *Caesalpinia ferrea* (jucá) com *Artêmia salina*.



Fonte: Macedo 2018

Avaliação microbiológica

Bactérias

No presente estudo foram utilizadas 11 cepas bacterianas, compreendendo cinco cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) isoladas de miniusinas de leite caprino e quatro cepas de bactérias Gram negativas (gêneros *Salmonella*, *E. coli* e *Klebsiella*), pertencentes ao banco de isolados do Laboratório de Análise de Produto de Origem Animal (LAPOA), da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas foram previamente confirmadas como produtoras de biofilme em teste de espectrofotometria em

microplacas de poliestireno (LIRA et al., 2015). As características dos isolados *Staphylococcus aureus* utilizados no presente estudo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Cepas de *Staphylococcus spp.* produtoras de biofilmes oriundas de mini usinas de leite caprino no Estado da Paraíba.

Bactérias	Origem	Produção de biofilme	Genes de resistência	
			ACR	icaD
<i>S. aureus</i> (590) ^a	Leite de tanque	*	-	+
<i>S. aureus</i> (313) ^a	Leite pasteurizado	**	-	-
<i>S. aureus</i> (235) ^a	Leite cru	**	-	+
<i>S. aureus</i> (1340) ^a	Mão de manipulador	*	-	+
<i>S. aureus</i> (1338) ^a	Mão de manipulador	*	+	+

*Forte produtora de biofilme; **fraca produção de biofilme; (+) positivo para o gene de resistência; (-) negativo para gene de resistência; a- *Staphylococcus aureus* do banco de dados do LAPOA, ACR e icaD- genes de resistência.

A avaliação do efeito antibacteriano da casca da planta *Caesalpinia ferrea* Mart sobre a taxa de conjugação foi realizada utilizando as cepas *Escherichia coli* h2332 (estirpe doadora) e a *Escherichia coli* J62 como receptora, ambas cedidas pelo Prof. Paul Barrow, da Universidade de Nottingham (UK). O perfil de resistência das cepas a antibióticos está identificado na Tabela 5.

Tabela 5. Perfil de resistência de bactérias isoladas de humanos utilizadas na transferência plasmidial de genes de resistência.

Bactéria	Resistência a antibiótico	ESBL
<i>Escherichia coli</i> h2332	AM, CF, CXM, CPD, CTX, NAL, SXT e TET	CTX-M e TEM-1
<i>Escherichia coli</i> J62	NAL e RI	

AM, ampicilina; CF- cefalotina; CPD- cefpodoxime; CTX-cefotaxima; CXM- cefuroxima; NAL- ácido nalidixíco; RI- rifampicina; SXT- trimetoprim-sulfametoxazol; TET-tetraciclina; CTX-M e TEM-1- genes de beta-lactamase.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos foram determinadas pelo método de microdiluição em placas de 96 poços utilizando-se caldo BHI (Himedia), segundo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015).

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas. Em seguida, determinou-se a MIC através da aplicação de 20 µL de solução aquosa estéril de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% (TTC) em todos os poços. Após aplicação da solução aquosa, o tempo para reação foi de 30min. Os poços que apresentaram a cor avermelhada foram considerados positivos, enquanto os negativos procederam-se o plaqueamento em placas de Petri contendo ágar TSA - Tryptone Soya Agar (Himedia®) e incubou-se em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas. Transcorrido o tempo de incubação, procedeu-se a avaliação da concentração bactericida mínima determinada pelo não crescimento bacteriano nas placas.

Determinação da atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Maia-Araújo et al. (2011) e pelas normas da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015), com adaptações. As suspensões bacterianas foram ajustadas à turbidez de 0,5 da escala McFarland. Cada suspensão foi estriada com o uso *swab* estéril, por esgotamento, em placa de MH - ágar Muller Hilton (Himedia®). Em seguida, discos de papéis estéreis (6 mm) embebidos com 20 µL de cada extrato nas concentrações de 37,5 mg/mL, 18,75 mg/mL, 9,37 mg/mL e 4,68 mg/mL foram adicionados na superfície.

Como controle positivo foram utilizados discos de oxacilina (1 µg), penicilina (10 µg) e clorafenicol (30 µg). A Tabela 1 apresenta os controles de antimicrobianos utilizados para cada bactéria. As placas foram então incubadas a 37° C por 24 horas. Posteriormente, foram medidos

os halos com auxílio de paquímetro digital, registrando-se os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

Tabela 6. Controle de antimicrobianos no teste de disco de difusão.

Microrganismos	Discos de antibióticos		
	Penicilina (10 µg)	Oxacilina (1µg)	Cloranfenicol (30 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> (590)	*		
<i>Staphylococcus aureus</i> (313)		*	
<i>Staphylococcus aureus</i> (235)	*		
<i>Staphylococcus aureus</i> (1340)		*	
<i>Staphylococcus aureus</i> (1338)		*	
<i>Escherichia coli</i> (frango)			*
<i>Klebsiella</i> (ATCC® 700603™)			*
<i>Salmonella</i> Enteritidis			*
<i>Salmonella</i> Heidelberg			*

Staphylococcus aureus do banco do LAPOA; bactérias Gram negativas do banco do LAPOA; * controle positivo.

Inibição da formação de biofilme por *Caesalpinia ferrea* Mart

O efeito de extratos sobre a formação de biofilme foi avaliado *in vitro* pelo método de espectrometria em microplacas de poliestireno, de acordo com o método descrito por Stepanovic et al., (2007), com modificações. Para tanto, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilme (n= 5). A suspensão bacteriana de 20 µL (0,5 McFarland) foi colocada em seis poços de uma microplaca de poliestireno contendo 160 µL de caldo TSB Tryptic Soy Broth (Himedia) suplementado com glicose (1 g/100 mL). Avaliou-se os extratos adicionando 60 µL de cada diluição, nas concentrações 1,16 mg/mL; 0,582 mg/mL; 0,388 mg/mL e 0,291 mg/mL. As concentrações foram estabelecidas a partir da metodologia descrita por Diaz (2015). Como controle negativo foi utilizado 180 µL de caldo sem o inóculo. As placas foram incubadas a 35°C durante 18 horas e, posteriormente, lavadas três vezes com 200 µL de solução salina estéril. Em seguida, foi realizada a fixação na placa com 150 µL de metanol durante 20 minutos e secas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a secagem, foram adicionados 150 µL de solução cristal violeta (0,5 g / 100 mL) (Newprov), durante 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150 µL etanol (30 minutos). Por fim, as placas coradas foram submetidas à leitura de densidade óptica média (OD) à 595 nm em espectrofotômetro (Biorad).

Ensaio de taxa de conjugação de plasmídeos.

Os testes de taxa de conjugação de plasmídeo foi realizado pelo método de acasalamento em caldo, descrito por Kruse e Sørum (1994) com algumas modificações. O acasalamento entre as cepas doadora *E. coli* H2332 e receptora (*E. coli* J62) foi realizados em caldo Luria-Bertani (Himedia ®). As culturas foram inoculadas em separado durante a noite em 10 mL de caldo LB fresco e incubados overnight a 37°C. Foi feito o acasalamento, utilizando 30 µl da doadora para 100 µl da receptora, misturados em 10 ml de LB e incubados por 24h à 37°C. Para avaliar a taxa de conjugação usou-se 100 µl de cada extrato (etanólico e hidroalcoólico) dos 50% da MIC de 9,37 mg/mL nas concentrações 2,33; 1,17; 0,786 e 0,586 mg/mL, conforme metodologia descrita por Diaz (2015). Após a incubação, as misturas de conjugação foram diluídas serialmente 1:10 em solução salina até a diluição de 10⁻⁷. Aliquotas de 20 µl de cada diluição foram inoculadas sobre uma placa de agar MacConkey (Oxoid®) contendo 70 µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) para isolamento da receptora e uma placa contendo 70 µg/mL de Nal mais ceftriaxona (Cro) na concentração de 40 µg/mL para o isolamento da transconjugante. A taxa de conjugação foi estimada de acordo com o método de Smith (1970).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação do teste de disco difusão, as médias da formação do halo de inibição antimicrobiano (mm) entre as concentrações dos extratos foram comparadas pelo teste t a 5% de significância. Para avaliação da taxa de inibição de formação de biofilme, as médias foram submetidas ao teste de Dunnett (5% de significância), contrastando todas às concentrações de ambos os extratos com o grupo controle. O mesmo procedimento foi realizado para determinação da taxa de conjugação plasmideal. Todos os testes foram realizados utilizando o pacote estatístico SISVAR versão 5.

RESULTADOS

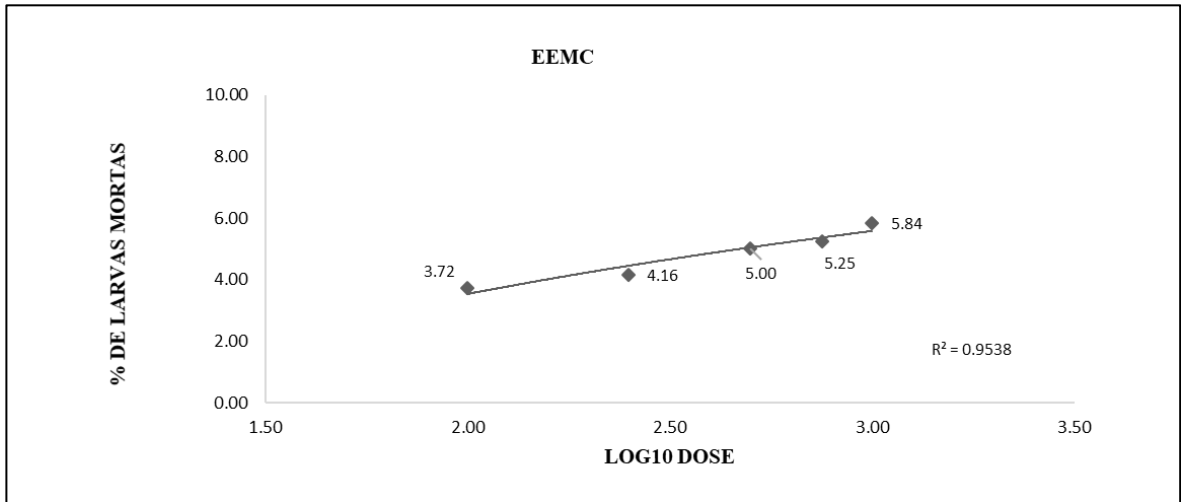
A Tabela 7 apresenta os valores de rendimento encontrados para os dois tipos de extrato e para cada um dos métodos de extração utilizado neste estudo. O rendimento dos extratos foi calculado em relação à quantidade do material vegetal seco utilizado na extração. Foi possível observar que o método de maceração gerou o melhor rendimento comparando com os demais métodos de extração. Desta forma esse método foi utilizado para produção dos extratos neste estudo.

Tabela 7. Rendimentos dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de *Caesalpinia ferrea* (jucá) de acordo com três métodos de extração.

Extratos	Tipos de extração		
	Maceração	Turbolise	Soxhlet
Etanólico	10,79%	7,92%	6,30%
Hidroalcoólico	22,30%	9,24%	8,30%

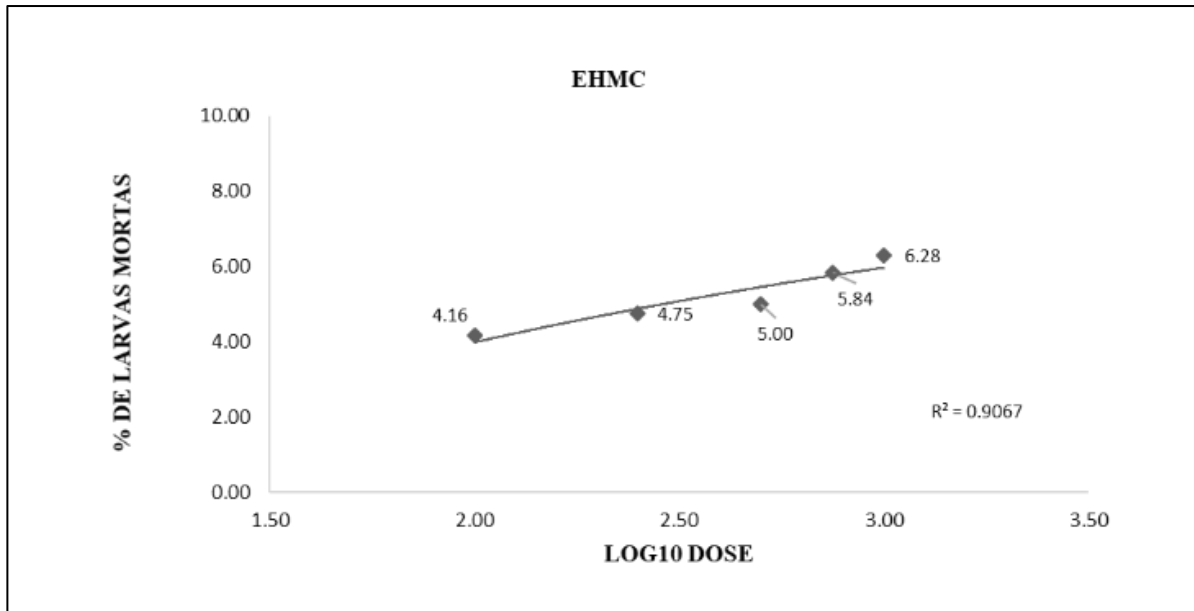
De acordo com os resultados do bioensaio de citotoxicidade, obteve-se uma concentração letal (LC50) de 304,068 µg/mL para o extrato etanólico e 493,549 µg/mL no extrato hidroalcoólico, indicativo de baixa toxicidade. As Figuras 5 e 6 apresentam o comportamento da mortalidade em relação ao aumento das concentrações dos dois extratos.

Figura 5. Curva concentração-resposta da mortalidade de *Artemia salina* ao extrato Etanólico de *Caesalpinia ferrea* (jucá) após 24 hora.



EEMC- Extrato etanólico maceração casca; CL50 = 304, 068 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Análise de Regressão Probit). CL – Concentração letal.

Figura 6. Curva concentração-resposta da mortalidade de *Artemia salina* ao extrato Hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* (jucá) após 24 horas.



EHMC-Extrato hidroalcoólico maceração casca; CL50 = 493, 549 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Análise de Regressão Probit). CL – Concentração letal.

Na Tabela 8, estão apresentados os dados de concentração inibitória mínima (MIC mg/mL) dos extratos etanólico e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* Mart para isolados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As MICs foram semelhantes entre EEMC e EHMC para todas as bactérias testadas.

De maneira geral, foi possível observar que as bactérias Gram-positivas apresentam valores de MIC inferiores às bactérias Gram-negativas. O menor valor de MIC (4,68 mg/mL) foi encontrado para as cepas de *Staphylococcus aureus*, e o maior valor (18,75 mg/mL) foi encontrado para *Escherichia coli*, *Klebsiella* (ATCC® 700603™), *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (MIC; mg/mL) dos extratos etanólico (EEMC) e hidroalcoólico (EHMC) de *Caesalpinia ferrea* (jucá) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Gram positivas	Concentrações (mg/ml)		Controles Positivos		
	EEMC	EHMC	CLO	OXA	PEN
<i>S. aureus</i> (590)	4,68	4,68			1,56
<i>S. aureus</i> (313)	4,68	4,68		1,75	
<i>S. aureus</i> (235)	4,68	4,68			1,56
<i>S. aureus</i> (1340)	4,68	4,68		1,75	
<i>S. aureus</i> (1338)	4,68	4,68		1,75	
Gram negativas					
<i>Escherichia coli</i>	18,75	18,75	0,43		
<i>Klebsiella</i> (ATCC® 700603™)	18,75	18,75	0,43		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	18,75	18,75	1.25		
<i>Salmonella</i> Heidelberg	18,75	18,75	1.25		

CLO:Clorafenicol; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina

Os resultados do teste de resistência antimicrobiana realizado pelo método de difusão com os extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart, em

diferentes concentrações dos extratos (37,5; 18,75; 9,37; 4,66 mg/mL) estão apresentadas na Tabela 9. No grupo de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), é possível observar que não houve diferença ($p>0.05$) para formação de halo nas diferentes concentrações utilizadas, tanto para o extrato etanólico como para o extrato hidroalcoólico. Observar-se também, que em todas as concentrações testadas, houve formação de halo em ambos os extratos.

Para as bactérias Gram-negativas, os isolados de *E. coli*, *Klebsiella* e *S. Enteritidis* apresentaram formação de halo apenas nas concentrações mais elevadas do disco (37,5 e 18,75 mg/mL) para ambos os extratos. O isolado de *Salmonella* Heidelberg não foi observado formação de halo para os dois extratos estudados.

Tabela 9. Médias dos halos de inibição (mm) dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de *Caesalpinia ferrea* (jucá) de acordo com o método de disco-difusão contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Isolados	Diluições (mg/mL) do EEMC*					Diluições (mg/mL) do EHMC**				
	37,5	18,75	9,37	4,66	CV%	37,5	18,75	9,37	4,66	CV%
Gram-positivas										
<i>S. aureus</i> 590	5,5 ^a	5,0 ^a	4,7 ^a	5,3 ^a	13,45	5,2 ^a	7,5 ^a	4,3 ^a	3,5 ^a	17,89
<i>S. aureus</i> 313	10,0 ^a	7,8 ^a	5,7 ^a	3,7 ^a	17,32	6,5 ^a	5,7 ^a	5,0 ^a	5,3 ^a	16,45
<i>S. aureus</i> 235	6,0 ^a	5,5 ^a	4,0 ^a	4,0 ^a	15,67	6,0 ^a	7,5 ^a	5,3 ^a	5,0 ^a	15,56
<i>S. aureus</i> 1340	4,3 ^a	4,7 ^a	3,7 ^a	3,7 ^a	17,87	5,2 ^a	4,6 ^a	4,7 ^a	4,5 ^a	16,78
<i>S. aureus</i> 1338	5,7 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a	5,3 ^a	8,89	5,3 ^a	8,2 ^a	5,7 ^a	3,7 ^a	11,56
Gram-negativas										
<i>E. coli</i> (frango)	7,0 ^a	5,0 ^a	0	0	12,33	9,0 ^a	6,0 ^a	0	0	9,75
<i>Klebsiella</i>	6,0 ^a	5,0 ^a	0	0	13,54	6,5 ^a	6,0 ^a	0	0	13,46
<i>S. Enteritidis</i>	3,3 ^a	3,9 ^a	0	0	15,45	5,9 ^a	5,8 ^a	0	0	10,67
<i>S. Heidelberg</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Médias seguidas de mesma letra sobrescritas na linha, não diferem entre si pelo teste de Dunnet a nível de 5% de significância

A capacidade dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart em inibir a produção do biofilme foi avaliada quanto à formação da biomassa total (polissacarídeos e bactérias). A análise de inibição de formação de biofilme trabalhou-se apenas

com as cepas comprovadamente produtoras de biofilme. Conforme pode ser observado na Tabela 10, todas as diluições dos extratos etanólico e hidroalcoólico apresentaram efeito significativo ($p < 0.05$) quanto à inibição da formação do biofilme, quando comparados com o controle positivo, exceto para o isolado 1340 em que, a concentração 0,291 do extrato EEMC e as concentrações 0,338 e 0,291 do extrato EHMC não foram capazes de reduzir ($p > 0.05$) a formação de biofilme comparada com o grupo controle.

Tabela 10. Efeitos dos extratos etanólico (EEMC) e hidroalcoólico (EHMC) de *Caesalpinia ferrea* (jucá) sobre na produção de biofilme em *Staphylococcus aureus*.

Amostras	C +	Diluições do EEMC (mg/mL)				Diluições do EHMC (mg/mL)			
		1,16	0,588	0,338	0,291	1,16	0,588	0,338	0,291
<i>S. aureus</i> 590 ⁺⁺	0,84^a	0,19 ^b	0,24 ^b	0,26 ^b	0,34 ^b	0,21 ^b	0,27 ^b	0,39 ^b	0,45 ^b
<i>S. aureus</i> 313 ⁺	1,05^a	0,20 ^b	0,21 ^b	0,22 ^b	0,22 ^b	0,17 ^b	0,19 ^b	0,27 ^b	0,29 ^b
<i>S. aureus</i> 235 ⁺	0,87^a	0,22 ^b	0,39 ^b	0,40 ^b	0,43 ^b	0,19 ^b	0,27 ^b	0,44 ^b	0,49 ^b
<i>S. aureus</i> 1340 ⁺⁺	0,50^a	0,19 ^b	0,24 ^b	0,26 ^b	0,36 ^a	0,26 ^b	0,29 ^b	0,32 ^a	0,42 ^a
<i>S. aureus</i> 1338 ⁺⁺	0,76^a	0,23 ^b	0,32 ^b	0,34 ^b	0,43 ^b	0,32 ^b	0,33 ^b	0,38 ^b	0,46 ^b

Médias seguidas de mesma letra sobrescritas na linha, não diferem entre si pelo teste de Dunnet a nível de 5% de significância. ⁺fraca formação de biofilme; ⁺⁺forte formação de biofilme

A taxa de conjugação foi afetada por ambos os extratos (EEMC e EHMC) testados (Tabela 11). Para o extrato EEMC, ocorreu redução ($p < 0.05$) na taxa de conjugação para as concentrações 2,34 e 1,17 mg/mL, com menor taxa (-4,28) observada na concentração de 2,34 mg/mL. Para o extrato EHMC só foi observada redução ($p < 0.05$) na taxa de conjugação na concentração de 2,34 mg/mL, sendo as demais concentrações semelhantes ao grupo controle positivo (Tabela 7).

Tabela 11. Efeito dos extratos etanólico (EEMC) e hidroalcoólico (EHMC) da casca de *Caesalpinia ferra* (júcá) sobre a taxa de conjugação de plasmídeo de resistência em *Escherichia coli*.

		Taxa de transferência plasmidial (Log 10)			
		Concentração (mg/mL)			
Extrato	Controle (+)	2,34	1,17	0,780	0,585
EEMC	-2,34^a	-4,28 ^b	-3,43 ^b	-2,37 ^a	-2,41 ^a
EHMC	-2,49^a	-3,47 ^b	-2,40 ^a	-2,60 ^a	-2,58 ^a

EEMC- extrato etanólico maceração casca; EHMC- extrato hidroalcoólico maceração casca; médias seguidas de mesma letra sobrescritas na linha, não diferem entre si pelo teste de Dunnet a nível de 5% de significância

Em valores percentuais, a redução na taxa de conjugação para o extrato EEMC foi de 98,84% e 92,66% respectivamente para as concentrações 2,34 e 1,17 mg/mL. Já para o extrato EHMC, a redução foi de 90% para concentração 2,34 mg/mL.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a crescente importância da resistência bacteriana aos antibióticos tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas voltadas à descoberta de agentes antimicrobianos alternativos, incluindo os fitoterápicos (KHAN et al, 2015). Neste contexto, bactérias Gram negativas, devido à proteção extra da membrana externa, são reconhecidamente mais resistentes aos agentes antibacterianos do que bactérias Gram-positivas (BAMONIRI et al., 2010). O presente estudo demonstrou a ação antimicrobiana dos extratos etanólico e hidroalcoólico da casca de *Caesalpinia ferra* Mart contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os valores de MIC para o grupo de bactérias Gram-negativas foram superiores para ambos os extratos testados quando comparados a os valores obtidos contra as bactérias Gram-positivas (4,68 mg/mL vs 18,75 mg/mL), confirmando a maior resistência apresentada por esse grupo de bactérias. Resultado semelhante foi observado quando as bactérias foram avaliadas pelo método de disco-difusão, ocorrendo formação de halos em todas as concentrações de ambos os extratos para todas as bactérias Gram-positivas, enquanto que para as bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella* e *S. Enteritidis*), halos de inibição só foram observados nas concentrações mais elevadas dos extratos. Esses achados corroboram pesquisas realizadas com extratos de outras plantas, tais como, *Anacardium occidentale* (Silva et al., 2007), *Caesalpinia sappan* (KIM et al., 2004), *Mimosa tenuiflora*, *Azadiracta indica* (Pereira et al., 2009).

Esses resultados são esperados uma vez que bactérias Gram-negativas apresentam estrutura da parede celular diferenciada, o que resulta em diferenças na penetração e retenção de agentes químicos. A presença de uma membrana externa composta de lipolissacarídeos e fosfolipídeos fornece uma camada extra de proteção a estes microrganismos, constituindo assim, o principal recurso que garante a estes maior capacidade de resistência aos agentes antimicrobianos (EXNER et al., 2017).

Além disso, o extrato da casca *Caesalpinia ferrea* Mart possui em sua constituição compostos fenólicos, que podem atuar na inativação das proteínas de superfície, formando complexos instáveis e ocasionando desnaturação das enzimas citoplasmáticas com consequente lise celular, apresentando maior efeito em bactérias Gram-positivas (NOSTRO et al.,2000). Tais resultados sugerem que os agentes fitoterápicos (extratos de plantas) com ação antimicrobiana, são mais eficientes no combate de microrganismos Gram-positivos.

Os extratos etanólicos e hidroalcoólico obtidos a partir da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart mostraram-se eficazes na inibição da formação de biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus* e na redução da taxa de conjugação de genes de resistência. Até o presente momento, não há informações científicas sobre o efeito do extrato da casca de *Caesalpinia ferrea* Mart sobre a a conjugação e sobre sua ação na inibição da formação de biofilme.

A inibição da formação de biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus* de diversas origens (leite cru, leite pasteurizado, leite do tanque de resfriamento e da mão do manipulador) é um achado interessante pois abre uma perspectiva interessante para indústria de beneficiamento de leite, no que se refere a segurança microbiológica dos produtos. Isso porque *Staphylococcus aureus* é frequentemente associado a surtos intoxicações alimentares em todo o mundo, representando uma particular preocupação para a indústria leiteira (OLIVER et al., 2009). Adicionalmente, o patógeno é um dos principais agentes etiológicos envolvidos na mastite clínica e subclínica em ruminantes leiteiros (PATEL et al., 2016; ACOSTA et al., 2016; XING et al., 2016). Estudos demonstraram que os biofilmes de *S. aureus* são consideravelmente mais resistentes a alguns antibióticos (por exemplo, oxacilina, cefotaxima, ciprofloxacina e vancomicina) do que as células planctônicas (SING et al., 2009; SAVAGE et al., 2013).

A ação eficaz dos extratos etanólicos e hidroalcoólico obtidos a partir da casca da *Caesalpinia ferrea* Mart sobre a inibição da formação de biofilme pode ser relacionada com presença de determinados compostos antimicrobianos na composição dos extratos. A *Caesalpinia ferrea* Mart é uma espécie rica em metabólitos secundários tais como; flavonoides, taninos, saponinas, esteroides, cumarinas e compostos fenólicos (WYREPKOWSKI et al., 2014), estes compostos, portanto, são utilizados para o tratamento de várias doenças. Os flavonoides e compostos fenólicos têm comprovada atividade bactericida, reduzindo o crescimento microbiano (FERNANDES et al., 2005).

O mecanismo de ação deste composto secundário sobre a inibição da formação de biofilme provavelmente envolve a inibição da síntese de proteínas de adesão (LEE et al., 2013; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016) e síntese de exopolissacarídeos (GAO et al., 2003), que são os principais componentes da matriz do biofilme. Os exopolissacarídeos determinam a estrutura e integridade funcional do biofilme microbiano (TIELKER et al., 2005), agindo como barreira defensiva e protegendo a comunidade bacteriana de condições de estresse, como por exemplo, a ação dos agentes antimicrobianos (KIVES et al., 2006). Outros estudos têm demonstrado a eficiência de metabólitos secundários sobre a redução da formação de biofilme em isolados de *Staphylococcus aureus* (XING et al. 2012; SCHWARTZ et al., 2012).

Os extratos de *Caesalpinia ferrea* Mart demonstraram eficácia na redução da taxa de conjugação plasmideal. A diminuição da frequência de transferência mediada pelos compostos em concentrações sub-inibitórias é benéfica, podendo levar redução de plasmídeos conjugativos dentro da população bacteriana (HAFT et al., 2009). Os compostos polifenólicos presentes *Caesalpinia ferrea* Mart atuam na interação entre as proteínas de membrana, inibindo a fixação entre bactérias (SAMPAIO et al., 2009) e, conseqüentemente, impedindo a transferência plasmidial.

A redução da conjugação observada neste estudo pode estar relacionada a presença de cumarinas, que são metabólitos secundários produzidos presentes *Caesalpinia ferrea* Mart, são conhecidas por apresentarem atividade biológica com efeito inibidor da DNA girase bacteriana (CHATTERJI et al., 2001). A inibição do DNA girase aliada a interação complexa da forma superenrolada do DNA plasmídeo resulta na cessação da replicação do plasmídeo em células bacterianas (WOLFSON et al., 1982; HOOPER et al., 1984; MONLAR et al., 1992). Compostos com ação inibitória de plasmídeos, naturais ou sintéticos, demonstram frações aromáticas que interagem com DNA girase (TAKÁCS et al., 2011) ou interrompem o sistema de construção plasmidial (MONLÁR et al 2003).

CONCLUSÕES

A significativa redução da produção de biofilmes por *Staphylococcus aureus* e a redução da taxa de conjugação plasmideal observada em *Escherichia. coli* na presença de concentrações subinibitórias de extratos etanólicos e hidroalcoólico de *Caesalpinia ferrea* Mart abrem perspectivas de utilização de extratos vegetais, mesmo em concentrações subinibitórias, no controle da resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; et al. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Anti-ulceration and toxicity *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta medica**, [s.l.], v. 61, n.3, p. 204 – 207, 1995.
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Anti-ulcer action os *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta medica**, [s.l.], v. 60, n.2, p. 118 – 120, 1994.
- BALBACH, A. **Plantas que curam**. São Paulo: Tres Press. p. 302 – 303, 1972.
- BAMONIRI, A.; EBRAHIMABADI, A. H.; MAZOOCHI, A.; BEHPOUR, M.; KASHI, F. J.; BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, [s.l.], v.68, n.3, p.22-24, 2007.
- BARIANI, A. et al. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 131-138, 2012.
- BUSH K. Bench-to-bedside review: the role of b-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Crit Care**, [s.l.], v.14, n.1, p.224-228, 2010.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethno-Pharmacology**, [s.l.], v.53, n.3, p.175-178, 1996.
- CHATTERJI, M.; UNNIRAMAN, S.; MAHADEVAN, S.; NAGARAJA, V. "Effect of Different Classes of Inhibitors on DNA Gyrase from *Mycobacterium smegmatis*." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v.48, n.4, p. 479-485, 2001.
- EXNER, M. et al. Antibiotikaresistenz: Was ist so besonders an den Gram-negativen multiresistenten Bakterien? **Gms Hygiene and Infection Control**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.1-24, 2017.
- FERNANDES, C. D.; MARCHI, C.E.; JERBA, V. F.; BORGES, M. de F. **Patógenos associados às sementes de forrageiras tropicais e estratégias de controle**. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Sementes: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV, 2005. p.183-213.

FERREIRA, M. C. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 126, n.2, p. 159- 175, 2009.

GALLÃO, M. I. et al. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 47, n.1, p. 58- 62, 2013.

GAO J, et al. Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source. **Journal of Proteome Research**, [s.l.], v.2, n.6, p.643-649, 2003.

GNAM, S. O.; DEMELLO, M. T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. **Journal of Ethno-Pharmacology**, [s.l.], v.40, n.3, p.70-89, 2004.

GONZALEZ, F. G. *Estudo farmacognóstico e farmacológico de Caesalpinia ferrea Martius*. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HAFT, R. J; MITTLER JE, TRAXLER B. Competition favours reduced cost of plasmids to host bacteria. **Isme Journal**, [s.l.], v. 3, n.2, p.761–769, 2009.

HOLLANDER, J.; MOUTON, J.; VERBRUGH, A. H. The predictive value of laboratory tests for efficacy of antibiotic combination therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 42, n.4, p.744–748, 1998.

HOOPER, D. C.; WOLFSON, J. S.; MCHUGH, G. L.; SWARTZ, M. D.; TUNG, C.; SWARTZ, M. N. "Elimination of Plasmid Pmg110 from *Escherichia Coli* by Novobiocin and Other Inhibitors of DNA Gyrase". **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 586-590, 1984.

KHAN, F.; YOUSUF, M.; FAIZI, S. et al. In vitro Inhibition of MDR Bacterial isolates by Extracts of different parts of *Caesalpinia pulcherrima*. **Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research**, [s.l.], v. 5, n.3, p. 199-204, 2015.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOE, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm- associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 52, n.3, p. 123-127, 2006.

KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; MULLA, J. Antibiotic resistance reversal of multiple drug resistant bacteria using Piper longum fruit extract. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], v. 3, n.4, p.112–116, 2013.

LEE, J. H. et al. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.491-499, 2013.

LIMA, E. C. et al. Atividade antifúngica de extratos obtidos de espécies de leguminosae contra dermatófitos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [s.l.], v.1, n.3, p.53-6, 1997.

LIMA, M. R. F.; BATTISTIN, A.; CASRAGNA, A. V.; NIURA, A. H.; WITT, M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, [s.l.], v.35, n.2, p.371-376, 2005.

LIMA, S. M. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.

LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 60, n.3, p.93-99, 2013.

LYRA, D. G.; SOUSA, F. G. C.; BORGES, M.F.; GIVISIEZ, P. E. N.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L.; GEBREYES, W. A.; OLIVEIRA, C. J. B. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. from bulk goat milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s.l.], v.10, n.1, p.126-130, 2013.

MATEO, M.; VERA, J. R. Biofilm: model of bacterial communication and resistance to antimicrobial agents. **Revista Española de Quimioterapia**, [s.l.], v. 17, n.1, p.26-28, 2004.

MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, [s.l.], v. 47, n.1, p. 41-47, 2007.

MONLAR, A.; AMARAL, L.; MONLAR, J. "Anti-plasmid Effects of Promethazine in Mixed Bacterial Culture." **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 22, n.1, p. 217-222, 2003.

MOTAR, A.; SILVA K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s.l.], v. 42, n.6, p. 465-470, 2005.

NAKAMURA, E. S. Cancer chemopreventive effects of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, [s.l.], v.177, n.2, p.119-24, 2002.

NOSTRO, A.; GERMANÒ, M. P. A.; D'ANGELO, V.; MARINO, A A.; CANNATELLI, M. A. "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity," **Lett. Appl. Microbiol.**, [s.l.], v.30, n. 5, p. 379–384, 2000.

OHIRA, S. et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 54, n. 37, p.5052-5055, 2013.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVER, C. J. B.; HISRICH, J. F. P.; MOURA, P. E. N.; GIVISIEZ, R. G.; COSTA, W. A. G. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v.98, n.1, p. 64–69, 2011.

PATEL, S. H.; VAIDYA, Y. H.; JOSHI, C. G.; et al. Culture-dependent assessment of bacterial diversity from human milk with lactational mastitis. **Comparative Clinical Pathology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 437–443, 2016.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.657-686, 2005.

PEREIRA A. V.; LÔBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, O. G.; MOTA R. A.; LIMA, E. Q.; MEDEIROS, E. S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de Jurema preta e Neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**, [s.l.], v.76, n.3, p. 341-346, 2009.

PORT'S, P. S. **Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira**. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 14, n.3, p.33-41, 2008.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius 98 fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v.124, n.3, p.289–294, 2009.

SCHWARTZ K.; SYED A. K.; STEPHENSON R. E.; RICKARD A.H.; BOLES, B.R. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 8, n.3, p. 1-11, 2012.

SILVA, L. C. N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 49, n.1, p. 2222-2228, 2011.

SILVA, M.A.R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR J. P.; PEREIRA M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v.18, n.2, p. 209-212, 2008.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l.], v. 43, p. 573-583, 2010.

SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1-15, 13 dez. 2016.

SPENGLER, G.; MOLNAR, A.; SCHELZ, Z.; AMARAL, L.; SHARPLES, D.; MOLNAR, J. The mechanism of plasmid curing in bacteria. **Current Drug Target**, [s.l.], v.7, n.4, p. 823–841, 2006.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pumps inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v.59, n.2, p.1247–1260, 2007.

SUDHAKAR, M. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 77, n. 5, p. 378-380, 2006.

TAKA´C, S. D.; CERCA, P.; MARTINS A.; RIEDL, Z.; HAJO´S. G.; MOLNA´R. J. Evaluation of forty new phenothiazine derivatives for activity against intrinsic efflux pump systems of reference *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* strains. In Vivo. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v.18, n.3, p. 657–66, 2011.

TIELKER, D.; HACKER, S.; LORIS, R.; STRATHAMANN, M.; WINGENDER, J. WILHELM, S.; ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. **Microbiology**, [s.l.], v.3, n.2 p. 1313-1323, 2005.

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Curr Opin Microbiol**, [s.l.], v.6, n.2, p.439-45. 2003.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C.; SWARTZ, M. N.; MCHUGH, G. L. "Antagonism of the B Subunit of DNA Gyrase Eliminates Plasmids Pbr322 and Pmg110 from *Escherichia coli*." **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v.152, n.1, p. 338-344, 1982.

WORLD Health Organization. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Comitee on Food Additives Evaluation of certain veterinary drug residues in food WHO Technical Report Series 954]. Geneve: **Who Library Cataloguing in Publication Data**; 2009. 135p.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; DE GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; DOS SANTOS, L. C. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpiniaferreastem* bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n.1, p. 16039-16057, 2014.

XIMENES, N. C. A. Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem da *Caesalpinia ferrea* (CfePL): aplicação biológica. 2004. 53p. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica)** - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife.

XING, M.; SHEN, F.; LIU L.; CHEN, Z.; GUO, N.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, K.; WU, X.; WANG, X.; LI, Y.; SUN, S.; YU, L. Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. **Let. Appl. Microbiol**, [s.l.], v. 3, n.5, p.475-482, 2012.