

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Andréa das Neves Guedes de Souza

EFEITO DA BETA-LAPACHONA NA INIBIÇÃO DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*
meticilina-resistentes (MRSA)

RECIFE – PE

2012

Andréa das Neves Guedes de Souza

**EFEITO DA BETA-LAPACHONA NA INIBIÇÃO DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*
meticilina-resistentes (MRSA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia na área de Patologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Profa. Dra. Eulália C. P. A. Ximenes

RECIFE – PE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Liliane Baltar, CRB4-506

S725e Souza, Andréa das Neves Guedes de.
Efeito da Beta-lapachona na inibição de fatores de virulência de Staphylococcus aureus meticilina-resistentes (MRSA) / Andréa das Neves Guedes de Souza . – Recife: O autor, 2012.
88 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Eulália C. P. A. Ximenes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Staphylococcus aureus. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Beta - lapachona. 4. Virulência. I. Ximenes, Eulália C. P. A. (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-149)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

RECIFE – PE

2012

Andréa das Neves Guedes de Souza

EFEITO DA BETA-LAPACHONA NA INIBIÇÃO DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA)

Dissertação aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof^ª Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof^ª Dra. Rejane Pereira Neves

Prof^ª Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

RECIFE – PE

2012

Dedico este trabalho a toda minha família pelo apoio e incentivo,
especialmente ao meu esposo Fernando
e meus filhos Luiz Fernando e Maria Laura
pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e coragem para lutar e seguir em frente em busca deste sonho.

Ao meu esposo pelo apoio, incentivo e companheirismo, por todo amor, carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

Aos meus filhos, minha motivação para viver e lutar por todas as coisas.

Aos meus pais e irmãos por serem minha fortaleza e referência de amor e responsabilidade.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Eulália Ximenes, pelos ensinamentos, pela dedicação e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Mestrado em Patologia, pelas disciplinas ministradas e pela contribuição científica.

A todos os colegas de mestrado pelas experiências e angústias compartilhadas.

Aos meus amigos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente na realização de mais esta etapa da minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

Introdução: *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) são atualmente um grave problema de saúde pública. Este micro-organismo além de produzir diversos fatores de virulência tornando-o altamente patogênico, é resistente à quase todos os antimicrobianos utilizados na clínica médica, restando poucas alternativas terapêuticas. Diante deste fato, torna-se urgente a busca por novos agentes antimicrobianos e nesta perspectiva, os compostos de origem vegetal têm sido alvo de várias pesquisas em todo o mundo. **Objetivos:** Avaliar a atividade antimicrobiana da β -lapachona e sua ação inibitória sobre a biossíntese de catalase, hemolisinas e biofilme por 12 cepas MRSA. **Métodos:** A concentração inibitória mínima (CIM) da β -lapachona foi determinada frente às cepas MRSA através da técnica de microdiluição em caldo. A biossíntese de catalase foi avaliada semi-quantitativamente através do teste em tubo, colocando em contato o inóculo bacteriano exposto ou não exposto à β -lapachona com o peróxido de hidrogênio a 3% e em seguida foi realizada a aferição da altura da efervescência gerada pela liberação de oxigênio gasoso. Para determinação das hemolisinas extracelulares, foi realizado um teste utilizando hemácias de carneiro para avaliação da atividade hemolítica do sobrenadante das culturas expostas ou não expostas à β -lapachona. A formação de biofilme foi determinada em placas de microtitulação de poliestireno utilizando cristal violeta para coloração do biofilme formado e procedendo-se à leitura espectrofotométrica da densidade óptica no comprimento de onda de 595nm. **Resultados:** A CIM de β -lapachona para as cepas MRSA avaliadas variou de 8 μ g/mL a 32 μ g/mL. A biossíntese dos fatores de virulência avaliados foi reduzida significativamente em todas as cepas MRSA. **Conclusão:** a β -lapachona possui atividade antiestafilocócica e que foi capaz de reduzir a biossíntese de fatores de virulência nas cepas MRSA avaliadas. Assim este composto pode ser incluído no arsenal de substâncias naturais bioativas com potencial de serem utilizadas como alternativa na terapêutica antimicrobiana contra MRSA após estudos de compatibilidade *in vivo* e toxicidade. Pode servir também como protótipo para produção de novas moléculas mais ativas e menos tóxicas.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus aureus*; atividade antimicrobiana; β -lapachona; virulência.

ABSTRACT

Introduction: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are now a serious public health problem. This micro-organism produces several virulence factors making it highly pathogenic and its resistant to almost all antibiotics used in medical practice, leaving few therapeutic alternatives. Given this fact, it is urgent to search for new antimicrobial agents and from this perspective, the compounds of plant origin have been the subject of several studies worldwide. **Objectives:** To evaluate the antimicrobial activity of β -lapachone and its inhibitory action on the biosynthesis of catalase, hemolysins and biofilm by MRSA strains. **Methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) of β -lapachone was determined against 12 MRSA strains by microdilution broth technique. The biosynthesis of catalase was semi-quantitatively assessed by the test tube, placing into contact the bacterial inoculum exposed or not exposed to β -lapachone with hydrogen peroxide at 3%, and then measurement was performed at the time of bubbling caused by the release of gaseous oxygen. For determination of extracellular hemolysin, a test was performed using sheep erythrocytes for assessment of hemolytic activity of supernatants of cultures exposed or not exposed to β -lapachone. Biofilm formation was determined in polystyrene microtiter plates using crystal violet and safranin stains and proceeding to the spectrophotometric reading optical density at a wavelength specific to each stain. **Results:** The MIC of β -lapachone for MRSA strains evaluated varied 8 μ g/mL to 32 μ g/mL. The biosynthesis of the virulence factors analyzed was significantly reduced in all layers MRSA ($p < 0.05$). **Conclusion:** β -lapachone has anti-staphylococcal activity and was able to reduce the biosynthesis of virulence factors in MRSA strains. Thus, this compound can be included in the arsenal of natural bioactive substances with the potential of being used as an alternative therapeutic antimicrobial activity against MRSA after compatibility studies and in vivo toxicity. It can also serve as a prototype for production of new molecules more active and less toxic.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*; antimicrobial activity, β -lapachone, virulence.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AKBA: Ácido 3- acetil-11-ceto- β bosvéllico
- AMP: Ampicilina
- AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulâmico
- ATTC: American Type Culture Collection
- AZI: Azitromicina
- CFO: Cefoxitina
- CIP: Ciprofloxacino
- CMI: Concentração Inibitória Mínima
- DeCs: Descritores em Ciências da Saúde
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DNase: Desoxirribonuclease
- GET: Gentamicina
- H₂O₂ : Peróxido de hidrogênio
- IL: Interleucina
- MER: Meropenem
- MeSH: Medical Subject Headings
- MRSA: Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*
- MSSA: Methicilin sensible *Staphylococcus aureus*
- MSCRAMMs: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
- OXA: Oxacilina
- PDB: Protein Data Bank
- PLP: Proteína de ligação à penicilina
- PMN: Neutrófilos Polimorfonucleares
- SCC: Staphylococcal cassette chromossome
- TEC: Teicoplamina
- TET: Tetraciclina

TSST: Toxina da síndrome do choque tóxico

TL: Termo Livre

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFC: Unidade Formadora de Colônia

SZT: Sulfametoxazol/Trimetopin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

TTC: Cloridrato de 2,3,5-trifenil tetrazólio

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

BHI: Brain Heart Infusion

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Mueller-Hinton Broth

MBC: Minimal Bactericidal Concentration

MIC: Minimal Inhibitory Concentration

OD: Optical Density

TSB: Tryptic Soy Broth

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	17
2.1.1 Catalase.....	18
2.1.2 Hemolisinas.....	20
2.1.3 Biofilme.....	23
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA).....	26
2.3 β-lapachona.....	28
2.4 Artigo de revisão sistemática.....	30
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Micro-organismos.....	46
4.2 β-lapachona.....	47
4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	47
4.4 Exposição do inóculo bacteriano à beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM).....	49
4.5 Avaliação do efeito da beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM) sobre a produção de catalase.....	49
4.6 Avaliação do efeito da beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM) sobre a biossíntese de hemolisinas.....	50
4.7 Avaliação do efeito da beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM) sobre a formação de biofilme.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Artigo Original	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	79

APRESENTAÇÃO

1 APRESENTAÇÃO

Staphylococcus aureus é um patógeno onipresente, associado com inúmeras doenças humanas e de animais. As patologias causadas por *S. aureus* podem ser divididas em infecções e doenças toxêmicas. As infecções podem ser localizadas como pústulas, furúnculos e impetigos, processos mais extensos e graves como infecção pós-cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite e meningite, ou ainda infecções disseminadas como bacteremia e septicemia. As doenças toxêmicas apresentam importantes manifestações clínicas, como celulite, intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada (KIM et al, 2012).

A capacidade de patogenicidade de *S. aureus* são consequência de seus fatores de virulência. Componentes da parede celular associados à virulência incluem adesinas, exopolissacarídeos, peptidoglicanos e ácido teicóico (BIEN et al, 2011).

A produção de exoenzimas e exotoxinas por *S. aureus* são fatores essenciais para a invasão e evasão da bactéria no organismo hospedeiro. Citolisinas, superantígenos, proteases, lipase, hialuronidase, Dnase, catalase e coagulase estão entre os principais produtos extracelulares que contribuem para a virulência de *S. aureus* (OOGAI et al, 2011).

O biofilme microbiano, que consiste em múltiplas camadas de bactérias embebidas em uma matriz polissacarídica, também é um fator de virulência importante nas infecções por *S. aureus*. A estrutura do biofilme protege as bactérias contra as defesas do organismo hospedeiro e dificultam a penetração e ação dos antibióticos utilizados rotineiramente na terapêutica (OLIVEIRA et al, 2010).

Além de possuir estas características de micro-organismos patogênicos, o desenvolvimento de resistência aos antibacterianos tem sido um sério problema para o tratamento das infecções causadas por *S. aureus*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2011), a evolução das cepas de bactérias multirresistentes tem sido rápida e preocupante. Apesar da grande diversidade de estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação dos antibacterianos, o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes tem sido cada vez mais difícil (WARDAL et al., 2010).

A busca por novos agentes farmacologicamente ativos, por meio de isolamento e de sua análise química e farmacológica, levou à descoberta de inúmeras drogas. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais. Das 252 drogas listadas pela OMS como básicas e essenciais ao tratamento de várias doenças, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (WHO, 2011).

A utilização de extratos e de metabólitos secundários previamente isolados de plantas, com reconhecida atividade antibacteriana tem um significado muito importante na pesquisa por novas terapias. Nos últimos anos foram desenvolvidos inúmeros estudos, em diferentes países, para comprovar a eficácia antibacteriana dos produtos advindos de espécimes vegetais (QUAVE et al, 2008; QIU et al, 2010; XIANG et al, 2010; QIU et al, 2011; RAJA et al, 2011; CHAIEB et al, 2011; SCHITO et al, 2011).

Dentre os metabólitos secundários de plantas que possuem atividade antimicrobiana encontram-se a β -lapachona, uma naftoquinona que pode ser sintetizada a partir do lapachol encontrado principalmente em plantas da família Bignoniaceae, especialmente no gênero *Tabebuia*, mais conhecidas no Brasil como ipês. A β -lapachona tem sido alvo de muitos estudos, por apresentar diversas atividades farmacológicas tais como antineoplásica, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária e antiinflamatória (PEREIRA et al, 2006; SILVA et al, 2009; COELHO et al, 2010; FERREIRA et al, 2011; SILVA JR et al, 2011).

Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da beta-lapachona sobre a produção de catalase, de hemolisinas e a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* MRSA.

O desenvolvimento desta dissertação resultou na elaboração de dois artigos. O primeiro intitulado “**Efeito de extratos e de metabólitos secundários de plantas sobre fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*: uma revisão sistemática**” o qual será submetido na qualidade de artigo de revisão para apreciação da “Revista Brasileira de Farmacognosia”, estrato B4 na área de MEDICINA II.

O segundo artigo intitulado “**Effect of beta-lapachone on virulence factors of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**”, será submetido na qualidade de artigo original para apreciação da Revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”, estrato B1 na área de MEDICINA II. Teve como objetivo avaliar o efeito da beta-lapachona sobre a produção de catalase, de hemolisinas e formação de biofilme por cepas *Staphylococcus aureus* MRSA.

Os artigos foram elaborados de acordo com as normas para publicação específica de cada revista (ANEXOS) e serão enviados para submissão via e-mail ou via correios a depender dos critérios de cada periódico.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foram descritas pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e atualmente é um dos microorganismos mais comumente isolados em infecções piogênicas em todo o mundo (STEFANI et al, 2012).

As espécies de *Staphylococcus* se reproduzem por fissão binária em todos os planos espaciais. Esta divisão resulta em agrupamento de células bacterianas em conformações que lembram cachos de uvas, característica especialmente evidente em células cultivadas *in vitro* e observadas por microscopia óptica (ALTERTHUM; TRABULSI, 2004). Em meio sólido crescem como colônias pigmentadas, são bactérias desprovidas de cápsula e catalase positivas e coagulase positivas ou negativas, o que depende da espécie (ZECCONI; HAHN, 2000).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 37 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, pertence à família Micrococaceae, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. *S. aureus* é a espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, que está freqüentemente relacionado à diversas infecções em seres humanos (MURRAY et al, 2004). O habitat primário de *Staphylococcus aureus* em humanos é a mucosa da nasofaringe onde a bactéria existe como um membro da microbiota normal sem causar quaisquer sintomas podendo, entretanto ser encontrado regularmente em outros sítios anatômicos como pele, transitoriamente orofaringe e fezes (ARVOLA et al, 2006; BHATIA; ZAHOOR, 2007).

O mecanismo de patogenicidade de *S. aureus* envolve uma série de eventos, onde inicialmente ocorre a adesão bacteriana à pele ou à mucosa, mediada por uma variedade de proteínas de superfície denominadas *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs), que se ligam a moléculas do tecido hospedeiro como colágeno, fibronectina e fibrinogênio (VAZQUEZ et al, 2011).

Em seguida, ocorre rompimento das barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência. A invasão tecidual por *S. aureus* envolve a produção de proteínas extracelulares como hemolisinas (α -, β -, δ - e γ -toxinas), nucleases, lipases, hialuronidase e colagenase que são capazes de provocar lise das células epiteliais, endoteliais, eritrócitos e de células do sistema imunológico como leucócitos e macrófagos (SINHA; FRAUNHOLZ, 2010).

Após a invasão do epitélio, *S. aureus* utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro. Essas estratégias estão relacionadas com a opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imune humoral e celular (EDWARDS et al, 2011).

Hemolisinas, hialuronidases, lipases, Dnase, catalase e coagulase estão entre os fatores que contribuem para a virulência de *S. aureus* (OOGAI et al, 2011). Dentre os fatores de virulência produzidos por *S. aureus*, que serão abordados neste estudo estão a catalase, hemolisinas e formação de biofilme.

2.1.1 *Catalase*

A catalase foi uma das primeiras enzimas bacterianas a serem descritas na literatura. Está envolvida na resistência de bactérias aeróbias ou microaerófilas como *Staphylococcus aureus* ao estresse oxidativo, cuja função é converter peróxido de hidrogênio gerado durante o metabolismo celular em água e oxigênio molecular (MARTÍ et al, 2009).

Existem diversas estruturas cristalográficas da catalase, que estão disponíveis na maior base de dados do mundo de estruturas proteicas (www.pdb.com). O tipo de catalase mais frequente nas bactérias é um tetrâmero (figura 1), cujo peso molecular é de 240 kDa, ou seja, possui na sua estrutura quaternária quatro cadeias polipeptídicas, com cerca de 60 kDa. Cada cadeia polipeptídica liga um grupo heme, semelhante ao que existe na hemoglobina, possuindo um íon de ferro. É este centro metálico que reage com o peróxido de hidrogênio. Algumas catalases são não-hémicas, possuindo em vez do ferro um centro binuclear de manganês (DOMÍNGUEZ et al, 2010).

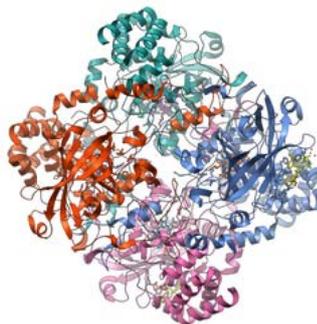


Figura 1: Estrutura tridimensional da catalase

(fonte: <http://www.pdb.org>)

A reação catalisada pela catalase é uma reação de dismutação, ou seja, o substrato atua tanto como redutor como oxidante. Quando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entra no centro ativo da catalase, interage com dois aminoácidos da cadeia polipeptídica da enzima: uma histidina e uma asparagina. Um dos átomos de hidrogênio do H_2O_2 (sob a forma de próton) é transferido de um oxigênio para o segundo. Em seguida, a ligação entre os dois átomos de oxigênio sofre uma distensão e quebra-se heteroliticamente (isto é, de forma desigual: os elétrons responsáveis pela ligação química O-O deslocam-se para a molécula de água agora formada). O restante do átomo de oxigênio liga-se ao ferro (que está no estado de oxidação +3), formando a espécie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ e liberando uma molécula de água. Em seguida ocorre redução ferro do componente formado na reação 1 (reação 2) e consequente liberação de oxigênio molecular e água (reação 3) (CHELIKANI et al, 2004; VLASITS et al, 2010).



O teste da catalase é bastante utilizado em microbiologia clínica para a distinção entre as famílias Microcococacea e Streptococcacea. Existem diversas variações do teste de detecção da produção de catalase, dentre elas o teste em lâmina e o teste em tubo (figura 2), que são os mais utilizados. O teste consiste basicamente em colocar peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) em contato com uma amostra (cultura líquida do micro-

organismo a testar ou uma colônia colhida com uma alça de inoculação) e observar a formação imediata de efervescência. O micro-organismo pode ser classificado como catalase-positivo (estafilococos) ou catalase-negativo (estreptococos). A efervescência é formada pelo oxigênio molecular liberado na reação entre o peróxido de hidrogênio e a catalase (KONEMAN, 2008).

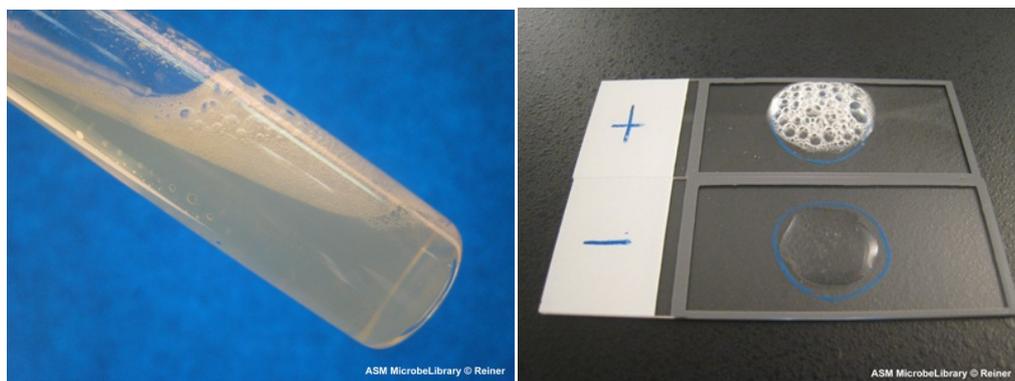


Figura 2: Teste de catalase em tubo e em lâmina (Fonte: www.microbelibrary.org)

As células fagocíticas do sistema imunológico como neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) incluindo peróxido de hidrogênio, afim de defender o hospedeiro contra agentes bacterianos. As bactérias patogênicas que possuem catalase são capazes de resistir a este ataque devido à presença desta enzima, conseguindo sobreviver nas células que invadem. A produção de EROs representam um dos primeiros mecanismos de defesa utilizados pelos macrófagos para limitar a replicação intracelular bacteriana. Após a fagocitose, durante o estresse oxidativo, os macrófagos produzem metabólitos reativos do oxigênio, que são altamente bactericidas, resultando em morte bacteriana. No entanto algumas bactérias possuem mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, um destes é a produção de enzimas antioxidantes como a catalase (ROJKIND et al, 2002; SEN; DAS; BISHAYI, 2009; DAS; BISHAYI, 2010).

2.1.2 Hemolisinas

Hemolisinas são um grupo de toxinas capazes de formar poros na superfície celular e provocar citólise e apoptose, incluem α -, β -, γ -toxinas. As hemolisinas são tóxicas para as células endoteliais, trombócitos e monócitos, pois atuam ligando-se a

receptores específicos da superfície destas células resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e na indução de apoptose. Estudos demonstraram a importância de hemolisinas na patogenicidade de *S. aureus* em modelos murinos e em coelhos (LIU, 2009; BURNSIDE et al, 2010).

Em geral α -toxinas são proteínas de 33 kDa secretadas por *S. aureus* na forma monomérica, hidrossolúvel e ativa e são codificadas pelo gene *hla*. Os monômeros ligam-se aos receptores de superfície das células do hospedeiro, onde formam oligômeros. A oligomerização leva à inserção e formação de poros transmembranares heptaméricos em forma de barril (figura 3), medindo cerca de 1-2 nm de diâmetro. Estes poros promovem o efluxo de íons de potássio e o influxo de íons cálcio e sódio nas células causando um desequilíbrio osmótico e consequente lise celular (KWAK et al, 2010).

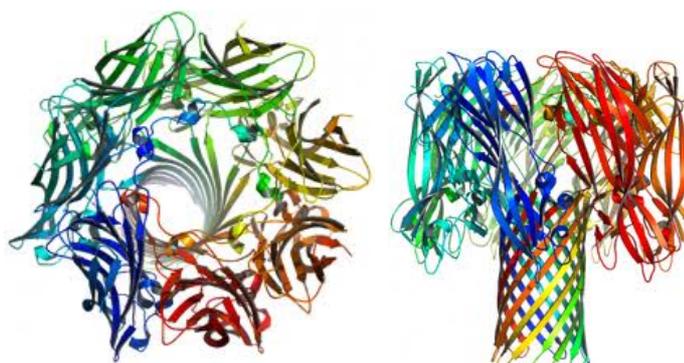


Figura 3: Estrutura tridimensional da α -toxina (Fonte: <http://www.nanopore.bme.ucsc.edu>)

O principal alvo da α -toxina são as células do sistema circulatório, como linfócitos, monócitos, eritrócitos e células endoteliais (KWAK et al, 2010). Provocam vasoconstrição mediada por neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) através da interação com uma proteína de superfície endotelial, a selectina, que ativa os PMNs, que por sua vez aderem ao epitélio vascular resultando em vasoconstrição (BUERKE et al, 2002). As α -toxinas purificadas são capazes de provocar colapso circulatório “*in vivo*” e “*in vitro*” (ADAMO et al, 1989; SUTTORP et al 1992; SIBELIUS et al, 2000). Estas toxinas também são capazes de estimular a hiperprodução de citocinas pró-inflamatórias

como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (DRAGNEVA et al, 2001; FOURNIER, PHILLPOT, 2005).

Wichmann e colaboradores (2009) correlacionaram a presença da α -toxina estafilocócica com a dermatite atópica, e verificaram que em 127 pacientes analisados, 48 estavam infectados com *S. aureus*, e que destes, 30 possuíam cepas produtoras de α -toxina. Estes pacientes apresentavam lesões de maior gravidade, maior grau de sensibilização, maior produção de imunoglobulinas (principalmente IgE) e maior frequência de asma. Estes mesmos autores sugeriram que a α -toxina poderia influenciar a inflamação cutânea através da indução da proliferação de linfócitos T e aumento da secreção de citocinas.

A β -toxina, também denominada esfingomielinase C (figura 4) é uma esfingomielinase neutra, ou seja, está envolvida no metabolismo de esfingomielina, uma classe de lipídeos que desempenha um importante papel na transmissão de sinais e reconhecimento intercelular, e age clivando a esfingomielina em fosfocolina e ceramida. Portanto, é uma enzima capaz de degradar membranas celulares ricas em esfingomielina como hemácias, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos (HAYASHIDA et al, 2009).

A β -toxina é codificada pelo gene *hlyB*, possui peso molecular de 35 kDa, é secretada na forma monomérica e sua atividade é dependente de magnésio (Mg^{2+}), apresentando uma atividade ótima em pH 7,4. O sítio ativo desta toxina contém resíduos de glicina e histidina que se liga a um cátion divalente, geralmente Co^{2+} , Mg^{2+} ou Ca^{2+} para tornar-se ativa (HAYASHIDA et al, 2009).



Figura 4: Estrutura tridimensional da β -toxina (Fonte: <http://www.opm.phar.umich.edu>)

Hayashida e colaboradores (2009) avaliaram a importância da β -toxina durante pneumonia estafilocócica e verificaram que esta toxina atua nesta patologia induzindo o influxo neutrofílico, extravasamento de proteínas séricas para o parênquima pulmonar e exsudação de proteínas para as vias aéreas. Estes autores observaram ainda uma atenuação no desenvolvimento da patologia em camundongos infectados por via intranasal com *S. aureus* deficientes em β -toxina quando comparados àqueles infectados por *S. aureus* produtores de β -toxina.

Huseby e colaboradores (2010) demonstraram que β -toxinas participam do processo de formação de biofilmes por cepas de *S. aureus*. Estes pesquisadores constataram que os monômeros de β -toxina ligam-se covalentemente entre si na presença de DNA extracelular formando dímeros, trímeros e tetrâmeros de β -toxina, resultando em uma estrutura polimérica sobre a qual biofilmes estafilocócicos se estabelecem.

2.1.3 Formação de biofilme

As bactérias são capazes de sobreviver no organismo hospedeiro tanto na forma planctônica quanto em biofilmes, e esta transição pode ser regulada por uma variedade de fatores ambientais e fisiológicos como densidade bacteriana, disponibilidade de nutrientes e estresse celular (LANDINI et al, 2010).

A capacidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência em *Staphylococcus aureus* e sua formação está envolvida em diversas infecções estafilocócicas como endocardite, otite média, infecções urinárias, e principalmente em infecções de próteses ortopédicas (AGARWAL et al, 2009).

Biofilmes podem se formar em superfícies bióticas ou abióticas e são definidos como comunidades bacterianas complexas aderidas a uma superfície sólida, embebidas em uma matriz polimérica, a qual corresponde a cerca de 90% da constituição dos biofilmes bacterianos (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A matriz pode ser constituída de polímeros extracelulares de natureza polissacarídica ou protéica, conhecida como glicocálice, a qual expõe-se exteriormente à membrana externa das células Gram-negativas e ao peptidoglicano das células Gram-

positivas e que possui a função de bloquear e reter os nutrientes necessários para o crescimento dos biofilmes, além de oferecer proteção às células planctônicas contra agentes antimicrobianos. (LANDINI et al, 2010).

A matriz polimérica é sintetizada por polimerases, constituindo-se em uma estrutura composta de diversas fibras globulares, e em seu estado hidratado contém cerca de 98% a 99% de água, protegendo as células da desidratação, já que podem reter água em quantidades muito maiores que sua massa e se desidratam lentamente. A água é o principal componente dos biofilmes, tornando-o hidrofílico. Os canais abertos de água circulam entre as estruturas nos biofilmes permitindo a aquisição e troca de genes por transferência horizontal (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta, debaixo das quais os micro-organismos continuam a se multiplicar, seja em cultivo puro ou em associação com outros micro-organismos. Sendo assim, nos biofilmes os micro-organismos estão mais resistentes à ação tanto de agentes físicos quanto de químicos (ROHDE et al, 2010).

Evidências experimentais mostraram que o tratamento de infecções causadas por biofilmes bacterianos é mais difícil quando comparadas a infecções onde não há formação de biofilme, pois a composição química e a densidade da matriz polimérica tornam o biofilme impermeável a diversos compostos, inclusive aos antimicrobianos, impedindo a sua difusão (ROHDE et al, 2010).

Existem várias teorias para a formação de biofilmes e a primeira destas foi descrita por Marshall et al. (1971), a qual relata que a adesão em superfícies é um processo que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o processo é ainda reversível, pois os micro-organismos estão fracamente aderidos à superfície por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática, o que promove uma fácil remoção das células bacterianas. Na segunda etapa, o processo é irreversível, depende do tempo de aderência e envolve adesão física das células com as superfícies por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzida pelas bactérias, denominado glicocálice, que suporta a adesão de biofilmes.

A segunda teoria sugere a existência de cinco etapas diferenciadas que podem ser citadas na seguinte ordem: condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; processo de adesão

bacteriana, por atração eletrostática, ainda reversível; multiplicação celular e colonização e adesão irreversível. (DUDDRIDGE & PRITCHARD, 1983).

A terceira teoria proposta por Dormans et al. (1991), indica a formação dos biofilmes em três etapas que seria a fixação das bactérias, seguida pela consolidação das bactérias nas superfícies e, por último, a colonização e a multiplicação das bactérias nas superfícies. Na etapa de consolidação ocorre a produção de material extracelular que facilita a fixação dos micro-organismos.

Atualmente é aceito que a formação de biofilmes bacterianos é um processo complexo, que consiste de diversas etapas (figura 5). Inicialmente ocorre adesão bacteriana à superfície a ser colonizada, através de forças atrativas e repulsivas entre a célula bacteriana e a superfície a ser colonizada. Estas forças incluem interações eletrostáticas e hidrofóbicas e forças de Van der Waals (MONROE, 2007).

Em seguida, na fase acumulativa, ocorre formação de múltiplas camadas de bactérias sobrepostas. Esta etapa envolve a adesão intercelular e a síntese das moléculas que compõem a matriz polimérica, como proteínas e polissacarídeos. Após o amadurecimento da arquitetura do biofilme, ocorre desprendimento das células bacterianas, podendo reiniciar o ciclo de formação de um novo biofilme em outro local (MACK et al, 2006; FLEMMING; WINGENDER, 2010; ROHDE et al, 2010).

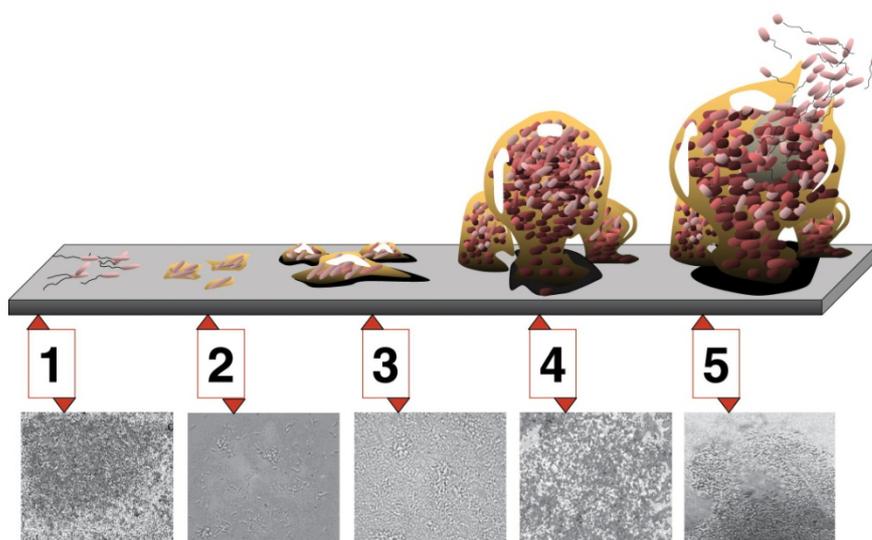


Figura 5: Etapas da formação de biofilme bacteriano sobre superfícies sólidas.

(Fonte: Monroe, 2007)

2.2 *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes - MRSA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2011), o aumento da incidência das cepas de *S. aureus* multi-droga resistentes tem sido rápido e preocupante para a saúde pública. O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes se iniciou em 1944, nos Estados Unidos, quando foi registrado o primeiro caso de resistência à penicilina em ambiente hospitalar (ERSON 2005; ROLAIN; RAULT, 2005). Estas cepas produziam β -lactamase (penicilinase) a qual inativava os antibióticos β -lactâmicos por hidrólise do β -lactâmico (SCHITO, 2006). Esta classe de antibióticos, caracterizada pelo amplo espectro de ação, de alta especificidade, exerce sua atividade ligando-se covalentemente com as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) impedindo a biossíntese de peptidoglicano na parede celular bacteriana (DRAWZ; BONOMO, 2010).

Em 1958 foi sintetizada em laboratório a metilicina, uma penicilina semi-sintética, tendo como alvo as cepas de *S. aureus* produtoras de β -lactamase. Entretanto, a resistência destas cepas a esse antibiótico foi relatada em 1961, três anos após a sua introdução na clínica médica (JEVONS, 1961). Surgiram então, as cepas denominadas MRSA – methicilin resistant *Staphylococcus aureus*, as quais são resistentes não somente à metilicina, mas a outros antibióticos da classe dos beta-lactâmicos. Desde então as MRSA têm representado um grave problema de saúde pública global, devido à multirresistência não só aos antimicrobianos, mas aos antissépticos e desinfetantes (STEFANI et al, 2012).

A resistência de *S. aureus* à metilicina é induzida através da aquisição do gene *mecA*, que codifica uma mutação na proteína de ligação à penicilina (PLP-2a), reduzindo significativamente a sua afinidade pelos antibióticos beta-lactâmicos (MONECKE et al, 2011). O gene de resistência à metilicina (*mecA*) está contido em um elemento genético móvel, denominado *staphylococcal cassette chromossome* (SCC*mec*), com 21 a 67 kb e é regulado por um gene supressor (*mecI*) e por um gene indutor (*mecR1*) (ITO et al, 2001).

No Brasil, alguns estudos relatam a prevalência de MRSA tanto nos profissionais da saúde quanto nos pacientes de diversos hospitais. Silva e colaboradores (2010) identificaram que a colonização por MRSA em profissionais de enfermagem do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco foi de 1,5%. Dois anos depois o mesmo estudo foi conduzido neste hospital e os autores verificaram um

aumento na prevalência de MRSA, de 3,3% (SILVA et al, 2012). Cavalcanti e colaboradores (2005) avaliaram que a prevalência de MRSA na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz foi de 12,8%. Ferreira e colaboradores (2009) realizaram um estudo na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Mata em Manaus, Amazonas, e identificaram uma taxa de prevalência de 15,5% de MRSA nas amostras estudadas.

Atualmente poucas alternativas terapêuticas estão disponíveis para o tratamento de MRSA uma vez que estas cepas apresentam resistência a uma ampla variedade de antibióticos. Dentre os antibióticos disponíveis encontram-se mupirocina, que é um agente tópico, comumente utilizado para tratamento de infecções cutâneas, mucosas e de feridas cirúrgicas (ROBICSEK et al, 2009) A mupirocina atua através da inibição da síntese protéica e de ácido ribonucléico (RNA) bacteriano, no entanto devido ao uso prolongado, foram detectados clones de MRSA resistentes a esta droga (SHITTU et al, 2009)

Como alternativa terapêutica oral para o tratamento de infecções por MRSA, são utilizadas em combinação tetraciclina e rifampicina. A tetraciclina inibe a síntese protéica e a rifampicina é utilizada em combinação, pois a monoterapia desta droga contra MRSA apresenta a limitação do desenvolvimento de resistência (LUNA et al, 2010). Clindamicina e linezolida estão disponíveis em apresentação oral e intravenosa e exercem sua atividade através da inibição da síntese protéica. A clindamicina é eficaz no tratamento de infecções cutâneas e mucosas. Porém pode ocorrer desenvolvimento de resistência de MRSA através da produção da enzima metilase que modifica os receptores de ligação deste antibiótico da classe das lincosamidas. A linezolida é utilizada em pneumonia nosocomial causada por MRSA, em infecções graves cutâneas e mucosas e pertence à classe das oxazolidinonas (MARTINEZ-AGUILAR et al, 2003).

A vancomicina e a teicoplanina são os antibióticos intravenosos de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA, pertencem à classe dos glicopeptídeos e atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana. A teicoplanina possui vantagens quando comparada à vancomicina, pois o tempo de meia-vida é mais longo, possui menor nefrotoxicidade, e menor risco de causar reações anafiláticas. Além disto, o uso freqüente e prolongado de vancomicina resultou no aparecimento de clones MRSA resistentes a esta droga (RYBAK et al, 2009).

2.3 β -lapachona

A β -lapachona (3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2- β]pirano-5,6-dione) (figura 7) é uma naftoquinona natural, obtida a partir do lapachol, que é extraído de árvores das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae e Proteaceae conhecidas no Brasil como ipês, sendo mais frequentemente encontrado na família Bignoniaceae, principalmente no gênero *Tabebuia* (Gibbs, 1975). Possui atividade antineoplásica, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária e antiinflamatória (PEREIRA et al, 2006; PINTO; CASTRO, 2009; SILVA et al, 2009; COELHO et al, 2010; FERREIRA et al, 2011; SILVA JR et al, 2011).

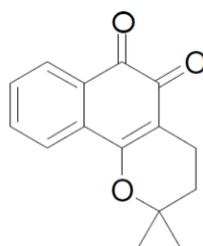


Figura 7: Estrutura molecular da beta-lapachona

As naftoquinonas de um modo geral possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro de ação contra micro-organismos procarióticos tanto Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, quanto Gram-positivos como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, inclusive contra cepas multi-droga resistentes (MACHADO et al, 2003; BRANDELLI et al, 2004).

Estão disseminadas no reino vegetal e, devido às sua propriedade redox, podem interferir em diferentes processos oxidativos biológicos. O mecanismo de ação antimicrobiano das naftoquinonas ainda não foi completamente elucidado (FERREIRA et al, 2010), no entanto sabe-se que possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido e o radical hidroxila e de formar complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos das proteínas bacterianas, podendo levar à inativação e perda de função. Prováveis alvos na célula bacteriana são as adhesinas de superfície, polipeptídeos que compõem a parede celular e enzimas ligadas à membrana (COWAN, 1999; SILVA et al, 2003; COJOCEL et al, 2006).

A atividade farmacológica das naftoquinonas está em seu núcleo orto e para quinóide. Este grupo geralmente aceita um ou/e dois elétrons (ciclo redox) para formar

o radical ânion ou diânion correspondente. Assim o radical semiquinona acelera a hipóxia intracelular dos micro-organismos pela produção dos superânions (DA SILVA et al., 2010). Outra atividade importante das naftoquinonas é a inibição do complexo de topoisomerasas provocando o desencadeamento de apoptose, ou seja, da morte celular programada. A interferência destas substâncias na apoptose constitui-se hoje em pesquisa interdisciplinar de fronteira na química medicinal, existindo grande expectativa quanto à delimitação de estratégias racionais visando o combate de neoplasias, principalmente as relacionadas ao câncer de próstata (ALMEIDA, 2009).

A síntese química da β -lapachona foi realizada pela primeira vez, em 1892, pelo químico Samuel Hooker a partir do lapachol. Desde então os protocolos comumente utilizados para a síntese da β -lapachona são baseados na ciclização do lapachol, catalisada por ácido o qual é obtido do cerne das árvores conhecidas como lapacho (ipê roxo), ou sintetizado a partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lausona). O lapachol é facilmente extraído da serragem da madeira de várias espécies de ipês brasileiros. No Brasil existem cerca de 46 tipos de madeiras comerciais conhecidas como "ipês" (*Tabebuia* sp), como por exemplo o ipê branco e o ipê roxo (FERREIRA et al, 2010).

Gonçalves de Lima e colaboradores (1962) avaliaram pela primeira vez a atividade antimicrobiana da β -lapachona e verificaram uma elevada atividade contra micro-organismos Gram-positivos, tais como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e contra espécies de Gram-negativos do gênero *Brucella* sp.

Pereira e colaboradores (2006) avaliaram a atividade de naftoquinonas obtidas a partir do lapachol contra cepas MRSA, e observaram que a β -lapachona apresentou uma atividade antimicrobiana superior contra as cepas MRSA avaliadas quando comparadas ao lapachol e à α -lapachona.

2.4 *Artigo de revisão sistemática*

REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA

QUALIS B4 – MEDICINA II

Efeito de metabólitos secundários de plantas sobre fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*: uma revisão sistemática.

Andréa das Neves Guedes de Souza¹, Eulália Azevedo Ximenes¹

Programa de Pós Graduação em Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondência:

Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Micro-organismos –

Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco –

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária,

Recife - PE - CEP: 50670-901 - Brasil

eulaliaximenes@yahoo.com.br

RESUMO

Este estudo teve por objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura científica, sobre o efeito de metabólitos secundários de plantas na biossíntese dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. Uma busca foi realizada nas seguintes bases de dados: Pubmed/Medline, Lilacs, Scielo e Science Direct. Foram excluídos os estudos sobre a expressão gênica dos fatores de virulência, estudos com óleos essenciais e artigos de revisão sobre o tema proposto. Foram encontrados 18 artigos na base Pubmed/Medline, 15 na base Lilacs e 154 na base Science direct, na base de dados Scielo não foi encontrado nenhuma publicação. Destes, foram selecionados 14 artigos seguindo os critérios de inclusão e exclusão determinados para este estudo. Analisando os artigos pode-se concluir que os produtos derivados de plantas possuem potencial de inibição sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*.

PALAVRAS CHAVE: *Staphylococcus aureus*; fatores de virulência; plantas; concentração subinibitória.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (Xavier et al, 2007) e pode causar um grande número de manifestações clínicas, incluindo lesões de pele e mucosas, assim como infecções letais como osteomielite, endocardite, pneumonia e septicemia (Liang et al., 2006; Qiu et al, 2010a,b,c). O aumento da morbidade e da mortalidade associadas às infecções estafilocócicas tem aumentado apesar da terapêutica antimicrobiana, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana contra a maioria dos antibióticos utilizados rotineiramente (Kuroda et al. 2007).

O mecanismo de invasão de *S. aureus* envolve uma série de eventos, onde inicialmente ocorre a sua adesão à pele ou à mucosa e em seguida, as barreiras do epitélio são rompidas, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência. Após a invasão do epitélio, este micro-organismo utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro, como opsonização do complemento, neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imune humoral e celular (Iwatsuki, et al, 2006).

A patogenicidade de *S. aureus* está diretamente ligada à capacidade que estas bactérias possuem de produzir determinados fatores que irão promover e facilitar a adesão, penetração e sobrevivência da bactéria no organismo hospedeiro (Liu, 2009). Dentre estes fatores estão a formação de biofilme, produção de exoenzimas como a catalase, a lipase, a DNase, a hialuronidase e a coagulase e de toxinas como hemolisinas, enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Bien, Sokolova, Bozko, 2011).

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente tem tornado cada vez mais urgente a busca por novas drogas com atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos multirresistentes (WHO, 2011). Produtos produzidos por plantas como terpenóides, glicoesteróides, flavonóides e

polifenóis vêm sendo estudados por possuírem a capacidade de inibir várias espécies bacterianas, particularmente micro-organismos Gram-positivos (Liu, 2005; Yogeeswari, Sriam, 2005; Qiu et al, 2011a, b, c; Raja et al, 2011; Chaieb et al, 2011; Schito et al, 2011; Qiu et al, 2010a, b, c; Xiang et al, 2010; Quave et al, 2008; Scazzocchio et al, 2006; Braga et al, 2005; Nostro et al, 2001).

Neste sentido o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática da literatura científica, incluindo estudos sobre o efeito de diversos extratos e de metabólitos secundários de plantas sobre a produção de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*.

MÉTODOS

A busca pelos artigos selecionados para este estudo foi realizada no período de junho de 2011 e setembro de 2011. A identificação dos artigos foi realizada através de uma busca nas seguintes bases de dados destinadas aos profissionais da saúde: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline), Literatura Latino-Americana e Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) e Scientific Electronic Library Online (SciELO). Foi utilizada uma estratégia específica para o cruzamento de descritores (DeCs) – palavras chave para recuperação de assuntos da literatura científica e termos-livres (TL) – termos não encontrados no DeCS e no MeSH, mas de relevância para a pesquisa. Não foi considerado nenhum limite em relação ao período de publicação e os artigos encontrados foram posteriormente selecionados por critérios de inclusão e exclusão.

A busca foi realizada utilizando os seguintes descritores: *Staphylococcus aureus* e fatores de virulência; e os termos livres: plantas medicinais e concentração subinibitória. Os termos foram cruzados entre si nas línguas portuguesa e inglesa. Foram incluídos artigos originais que estudassem o efeito de extratos de plantas medicinais e de seus metabólitos secundários sobre fatores de virulência de *S. aureus*. Foram excluídos estudos sobre a expressão gênica dos fatores de virulência e estudos com óleos essenciais extraídos de plantas. Também foram desconsiderados artigos de revisão sobre o tema da pesquisa.

RESULTADOS

Foram encontrados 187 artigos, sendo 18 artigos na base Pubmed/Medline, 15 na base Lilacs e 154 na base Science direct. Na base de dados Scielo não foi encontrado nenhuma publicação ao utilizarmos os descritores e termos citados. Retiradas as referências cruzadas e redundantes, presentes em mais de uma base, e seguidos os critérios de inclusão e exclusão descritos no método, foram selecionados 14 artigos.

A figura 1 ilustra o número de artigos encontrados em cada base de dados após o cruzamento dos termos descritos no método. Os artigos selecionados foram organizados segundo autor, ano de publicação, fatores de virulência avaliados, metabólito secundário/extrato utilizado e a conclusão dos estudos estão listados na tabela 1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A emergência de cepas multirresistentes de *S. aureus* vem se tornando um grande problema em saúde pública, uma vez que promove a falência do tratamento antimicrobiano. Este fato estimula o desenvolvimento e a descoberta de novos agentes que possuam diferentes alvos e mecanismos de ação. As drogas anti-virulência tem sido alvo de diversos estudos, não possuem a capacidade de matar ou de estacionar o crescimento bacteriano, mas podem neutralizar fatores de virulência que promovem a penetração e colonização do micro-organismo no hospedeiro, atingindo inclusive a bactérias que apresentam resistência aos antimicrobianos utilizados em clínica médica.

Neste sentido, nos últimos anos o interesse por produtos naturais derivados de plantas tem aumentado. Dentre os estudos analisados, 71% (10 estudos) foram realizados nos últimos dois anos (2010/2011). A maior parte dos estudos foi realizada com compostos isolados, em detrimento aos extratos brutos, isso provavelmente deve-se ao fato de que a molécula isolada pode ser utilizada na sua forma nativa, assim como também pode ser estudada e manipulada para ser mais ativa, ou menos tóxica e ser produzida industrialmente em larga escala.

Os estudos analisados avaliaram o efeito de diversos fitofármacos sobre alguns dos principais fatores de virulência em cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes aos antibióticos utilizados rotineiramente na clínica médica. Foram avaliados nestes estudos

atividade hemolítica atribuída à alfa-toxina, produção de enterotoxinas A e B, formação de biofilme, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as enzimas coagulase, lipase, DNase e termonuclease.

Dentre os 14 estudos analisados 6 avaliaram o efeito dos seguintes compostos sobre a atividade hemolítica atribuída à alfa-toxina: mentol, luteolina, farreol, eugenol, licoalcone A e magnolol e todos os compostos apresentaram atividade inibitória sobre a hemólise associada à alfa-toxina (Qiu et al, 2011a; Qiu et al, 2011b; Qiu et al, 2011c; Qiu et al, 2010a; Qiu et al, 2010b; Xiang et al, 2010).

Em geral α -toxinas são proteínas de 33 kDa secretadas por *S. aureus* na forma monomérica, hidrossolúvel e ativa (Hildebrand et al. 1991; Vijayvargia et al. 2004). São toxinas formadoras de poros, que promovem à entrada de água nas células causando um desequilíbrio quimiosmótico e consequente lise celular (Vecsey-Semjen et al, 2010). Estudos demonstraram a importância de α -toxinas na patogenicidade de *S. aureus* em modelos murinos e em coelhos (Callegan et al, 1994; O'Callaghan et al, 1997; Moreau et al, 1997; Girgis et al, 2003; Girgis et al, 2005). O principal alvo da α -toxina são as células do sistema circulatório (Vecsey-Semjen et al, 2010). Provocam vasoconstrição mediada por neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) através da interação com uma proteína de superfície endotelial, a selectina, que ativa os PMNs, que por sua vez aderem ao epitélio vascular resultando em vasoconstrição (Ohlstein et al, 1989; Buerke et al, 2002).

As α -toxinas purificadas são capazes de provocar colapso circulatório “in vivo” e “in vitro” (Adamo et al, 1989; Suttorp et al 1992; Sibelius et al, 2000). Estas toxinas também são capazes de estimular a hiperprodução de citocinas próinflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (Dragneva et al, 2001).

Dentre os estudos analisados, 3 avaliaram o efeito dos compostos sobre as enterotoxinas A e B e destes, 2 avaliaram também a TSST-1. Em todos os casos houve inibição significativa da secreção das toxinas pelos seguintes compostos: mentol, eugenol e licoalcone A. Um estudo comprovou que o extrato metanólico dos frutos de *Punica granatum* na concentração de 0,05% (v/v) foi capaz de inibir a secreção de enterotoxina A.

A enterotoxinas estafilocócicas e a TSST-1 são proteínas com estruturas cristalográficas e pesos moleculares similares (23-29 kDa). São causadoras de gastroenterite estafilocócica/envenenamento alimentar em seres humanos (Tseng & Stewart, 2005; Bania et al., 2006) e síndrome do choque tóxico (SST) respectivamente (Thomas et al, 2009). As enterotoxinas possuem também a propriedade imunomoduladora de superantígenos, estimulando a ativação de linfócitos T e consequente liberação de citocinas (Yoh et al., 2000; Holtfreter et al, 2004). Portanto a inibição da secreção destas toxinas pode ser de grande valia no tratamento das infecções alimentares causadas por *S. aureus*.

A formação de biofilme foi avaliada por 5 dos 14 estudos analisados. A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência que protege as bactérias contra a ação de antimicrobianos, pois a matriz polissacarídica possui a capacidade de limitar a penetração das drogas. Alguns estudos comprovaram que biofilmes de microorganismos são menos suscetíveis aos tratamentos com antimicrobianos convencionais (Brown, Gilbert, 1993; Wilson, 1996; Olson et al, 2002; Surdeal et al, 2006; El-Shekh et al, 2010). Os biofilmes estão envolvidos em uma série de infecções estafilocócicas e podem contribuir significativamente para a resistência ao tratamento antimicrobiano, uma vez que limita a difusão dos antibióticos através da matriz extracelular do biofilme. O desenvolvimento de drogas anti-biofilme visando combiná-las com os antibióticos convencionais pode ser uma estratégia para o tratamento de infecções nas quais a presença do biofilme seja um fator de resistência à antibioticoterapia.

Os compostos que foram avaliados nos estudos apresentaram-se eficazes na inibição da formação de biofilme, inclusive no estudo de Raja e colaboradores (2011) além da inibição da formação de biofilme, foi avaliada também a redução do biofilme pré-formado, isto é, que já estava presente antes da exposição ao composto ácido 3-acetil-11-ceto- β -bosvélico (AKBA). Outros dois estudos avaliaram o efeito dos compostos timoquinona (Chaieb et al, 2011), dimetilfructulose A e fructulose A (Schito et al, 2011) e ambos inibiram a formação de biofilme.

O extrato etanólico de 168 plantas medicinais italianas foram avaliados por Quave e colaboradores (2008) sendo que apenas 10 exibiram potencial inibição da formação de biofilme. O estudo de Scazzocchio e colaboradores (2006) avaliou além da inibição da formação de biofilme, o efeito do extrato etanólico de própolis sobre a

atividade da lipase e da coagulase e observou diminuição da atividade lipolítica e inibição da coagulase, após exposição à ½ da CIM determinada para as cepas de *S. aureus* avaliadas.

Diante dos estudos analisados, pode-se concluir que diversos compostos possuem a capacidade de neutralizar fatores que são essenciais para a propagação das doenças causadas por *Staphylococcus aureus*. Esta estratégia de atacar os fatores de virulência pode ser muito útil inclusive no tratamento de cepas multirresistentes, pois os mesmos fatores seriam inibidos tanto em cepas sensíveis quanto em cepas resistentes aos antibióticos tradicionais.

REFERÊNCIAS

- Adamo, P.; Taylor, P.B.; Fackrell, H.B. (1989). Staphylococcal alpha toxin induced cardiac dysfunction. *Can J Cardiol* 5:395–400.
- Bania, J.; Dabrowska, A.; Korzekwa, K.; Zarczynska, A.; Bystron, J.; Chrzanowska, J.; Molenda, J. (2006). The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. *Lett Appl Microbiol.* 42: 315–320.
- Bien, J.; Sokolova, O.; Bozko, P. (2011). Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of Pathogens*. 2011, Article ID 601905, 13 pages.
- Braga, L.C.; Shupp, J.W.; Cummings, C.; Jett, M.; Takahashi, J.A.; Carmo, L.S.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1–2), 335-339.
- Brown, M.R.W.; Gilbert, P. (1993). Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*. 74(S22), 87S–97S.
- Buerke, M.; Sibelius, U.; Grandel, U.; Buerke, U.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Meyer, J.; Darius, H. (2002). *Staphylococcus aureus* alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. *Shock*. 17(1):30-35
- Callegan, M.C.; Engel, L.S.; Hill, J.M.; O'callaghan, R.J. (1994). Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. *Infection and Immunity*, 62(6), 2478-2482.
- Chaieb, K.; Kouidhi, B.; Jrah, H.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to

prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11:29.

Dragneva, Y., C. D. Anuradha, A. Valeva, A. Hoffmann, S. Bhakdi, and M. Husmann. 2001. Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates TNF and induces interleukin-8 production. *Infect. Immun.* 69:2630–2635.

El-Shekh, N.A.; Ayoub, A.M.A.; El-Hendawy, H.H.; Abada, E.A.; Khalifa, S.Y.E. (2010). *In vitro* activity of some antimicrobial agents against intact and disrupted biofilms of *Staphylococci* in the indwelling vascular catheter patients. *World Applied Sciences Journal*. 10 (1): 108-120.

Girgis, D.O.; Sloop, G.D.; Reed, J.M. (2003). A new topical model of *Staphylococcus* corneal infection in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44(4):1591–1597.

Girgis, D.O.; Sloop, G.D.; Reed, J.M.; O’Callaghan, R.J. (2005). Effects of toxin production in a murine model of *Staphylococcus aureus* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.46(6):2064–2070.

Hildebrand, A.; Pohl, M.; Bhakdi, S. (1991). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin—dual mechanism of binding to target-cells. *J Biol Chem* 266:17195–17200.

Holtfreter, S.; Bauer, K.; Thomas, D.; Feig, C.; Lorenz, V. (2004). Egencoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect Immun.* 72:4061–4071.

Iwatsuki, K.; Yamasaki, O.; Morizane, S.; Oono, T. (2006). Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *Journal of Dermatological Science*, 42, 203-14

Kuroda, H.; Kuroda, M.; Cui, L.; Hiramatsu, K. (2007). Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett*. 268: 98–105.

Liang, X.; Yu, C.; Sun, J.; Liu, H.; Landwehr, C.; Holmes, D.; Ji, Y. (2006). Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 74: 4655–4665.

Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol*. 100:92–4.

Liu, G.Y. (2009). Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatric Research*. 65 (5),71R-77R.

Moreau, J.M.; Sloop, G.D.; Engel, L.S.; Hill, J.M.; O’Callaghan, R.J. (1997). Histopathological studies of staphylococcal alpha-toxin: effects on rabbit corneas. *Curr Eye Res*. 16(12):1221–1228.

Nostro, A.; Bisignano, G.; Cannatelli, M.A.; Crisafi, G.; Germanò, M.P.; Alonzo, V. (2001). Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6), 517-520.

O'Callaghan, R.J.; Callegan, M.C.; Moreau, J.M. (1997). Specific roles of alpha-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect Immun*. 65(5):1571–1578.

Ohlstein, E.H.; Nichols, A.J. (1989). Rabbit polymorphonuclear neutrophils elicit endothelium- dependent contraction in vascular smooth muscle. *Circ Res* 65:917– 924.

Olson, M.E.; Ceri, H.; Morck, D.W.; Buret, A.G.; Ronald R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Read Can J Vet Res*. 66(2): 86–92.

Raja, A.F.; Ali, F.; Khan, I.A.; Shawl, A.S.; Arora, D.S. (2011). Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA); targeting oral cavity pathogens. *BMC Research Notes*. 4:406.

Qiu, J.; Jiang, Y.; Xia, L.; Xiang, H.; Feng, H.; Pu, S.; Huang, N.; Yu, L.; Deng, X. (2009). Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease alpha-toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Lett Appl Microbiol* 50: 223–229.

Qiu, J.; Feng, H.; Lu, J.; Xiang, H.; Wang, D.; Dong, J.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, J.; Deng, X. (2010a). Eugenol reduces the expression of virulence related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 76:5846–5851.

Qiu, J.; Wang, D.; Xiang, H.; Feng, H.; Jiang, Y.; Xia, L.; Dong, J.; Lu, J.; Deng, X. (2010b). Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE*. 5:e9736.

Qiu, J.; Jiang, Y.; Xia, L.; Xiang, H.; Feng, H.; Pu, S.; Huang, N.; Yu, L.; Deng, X. (2010c). Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease alpha-toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Lett Appl Microbiol*. 50:223–229.

Qiu, J.; Luo, M.; Dong, J.; Wang, J.; Li, H.; Wang, X.; Deng, Y.; Feng, H.; Deng, X. (2011a). Menthol diminishes *Staphylococcus aureus* virulence-associated extracellular proteins expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(2), 705-712.

Qiu, J., Li, H., Meng, H., Hu, C., Li, J., Luo, M., Dong, J., Wang, X., Wang, J., Deng, Y. and Deng, X. (2011b), Impact of luteolin on the production of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 53: 238–243.

Qiu, J., Xiang, H., Hu, C., Wang, Q., Dong, J., Li, H., Luo, M., Wang, J. and Deng, X. (2011c), Subinhibitory concentrations of farrerol reduce α -toxin expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 315: 129–133.

Quave, C.L.; Plano, L.R.W.; Pantuso, T.; Bennett, B.C.(2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 118(3), 418-428.

Scazzocchio, F.; D'Auria, F. D.; Alessandrini, D.; Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161(4), 327–333.

Schito, A.M.; Piatti, G.; Stauder, M.; Bisio, A.; Giacomelli, E.; Romussi, G.; Pruzzo, C. (2011). Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(2), 129-134.

Sibeliuss, U.; Grandel, U.; Buerke, M.; Mueller, D.; Kiss, L.; Kraemer, H.J.; Braun-Dullaes, R.; Haberbosch, W.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2000). Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* 101:78–85.

Suttorp, N.; Buerke, M.; Tannert-Otto, S. (1992). Stimulation of PAF-synthesis in pulmonary artery endothelial cells by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Thromb Res* 67:243–252.

Surdeau, N; Laurent-Maquin, D.; Bouthors, S.; Gellé, M.P. (2006). Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, Oxsil® 320. *Journal of Hospital Infection*. 62(4), 487-493.

Thomas, D.; Dauwalder, O.; Brun, V.; Badiou, C.; Ferry, T.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Lina, G. (2009). *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. *Infect Immun*. 77; 2043–2050.

Tseng, C.W.; Stewart, G.C. (2005). Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 187: 5301–5309.

Vecsey-Semjen, B.; Kwak, Y.; Høgbom, M.; Møllby, R. (2010). *J Membrane Biol* 234(3), 171–181.

Vijayvargia, R.; Suresh, C.G.; Krishnasasthy, M.V. (2004). Functional form of caveolin-1 is necessary for the assembly of alpha-hemolysin. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1130–1136.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Health, Geneve: 2011.

Wilson, M. (1996) Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J. Med Microbiol*. 44, 79-87.

Xavier, C.A.C.; Oliveira, C.F.; Silva, M.P.; Silveira, I.A.; Abrantes, M.R. (2007). Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN* *RBAC*, 39(3): 165-168.

Xiang, H.; Qiu, J.; Wang, D.; Jiang, Y.; Xia, L.; Deng, X. (2010). Influence of magnolol on the secretion of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 15(3), 1679-1689.

Yoh, K.; Kobayashi, M.; Yamaguchi, N. (2000). Cytokines and T-cell responses in superantigen-related glomerulonephritis following methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Nephrol Dial Transpl*. 15: 1170–1174.

Yogeeswari, P.; Sriram, D. (2005). Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem*;12:657–66.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Número de artigos encontrados em cada base de dados após o cruzamento dos descritores

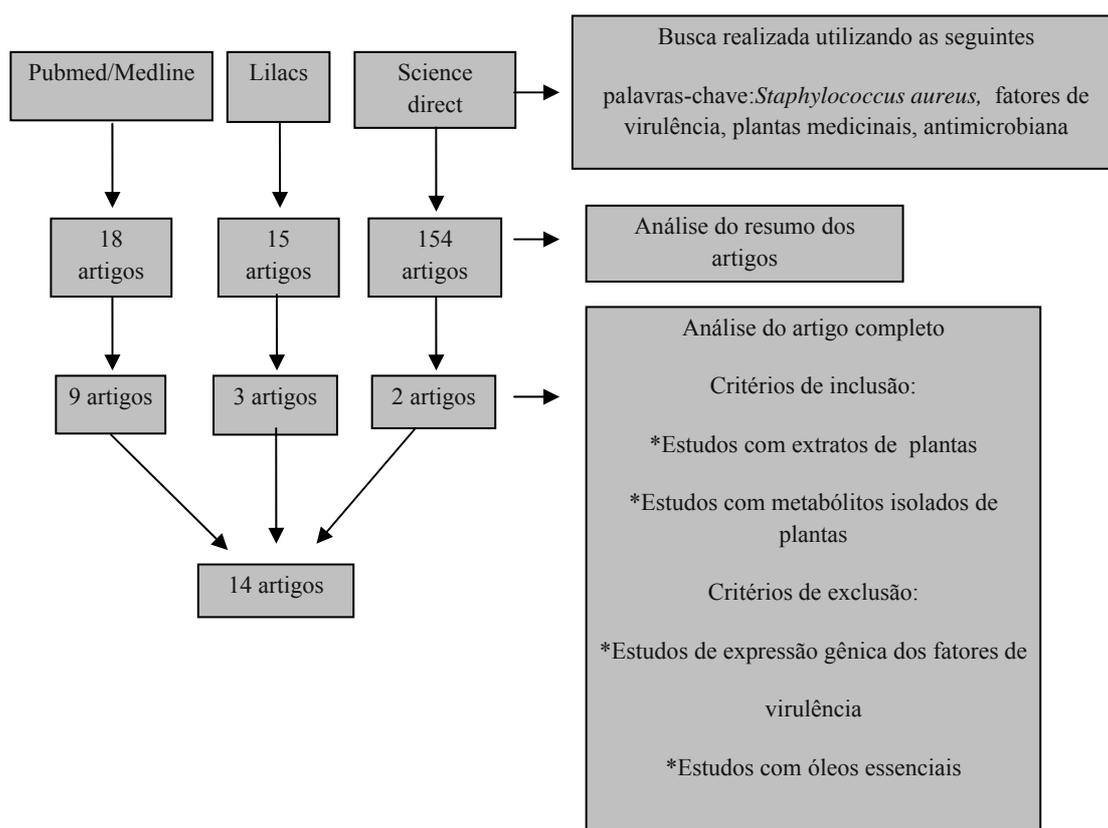


Tabela 1: Análise dos estudos selecionados

Autor e ano da publicação	Extrato/Produto avaliado	<i>Staphylococcus aureus</i> (n)	Fatores de virulência avaliados	Conclusão
Qiu et al, 2011a	Mentol (terpeno)	MSSA (ATTC 29213) MRSA (2985 e 3701)	Alfa-toxina; enterotoxinas A e B; TSST-1	O mentol inibiu a produção de alfa-toxina, enterotoxinas A e B, toxina da síndrome do choque tóxico.
Qiu et al, 2011b	Luteolina (flavonóide)	MSSA (05) MRSA (03)	Alfa-toxina	A exposição bacteriana à ½ da concentração inibitória mínima (CIM) provocou inibição completa da hemólise, quando a concentração foi diminuída para 1/4; 1/8 e 1/16 da CIM, houve redução dose-dependente da atividade hemolítica.
Qiu et al, 2011c	Farrerol (flavonóide)	MSSA (15) MRSA (20)	Alfa-toxina	A exposição bacteriana à ½ da concentração inibitória mínima (CIM) provocou inibição completa da hemólise, quando a concentração foi diminuída para 1/4; 1/8 e 1/16 da CIM, houve redução dose-dependente da atividade hemolítica.
Raja et al, 2011	Ácido 3- acetil-11-ceto-β bosvéllico (AKBA) (terpeno)	MSSA (ATCC 29213) MRSA (ATCC 33591)	Formação de biofilme	Houve inibição da formação de biofilme e também reduziu o biofilme formado antes da exposição so AKBA.
Chaieb et al, 2011	Timoquinona (benzoquinona)	MSSA (ATCC 23923)	Formação de biofilme	Houve inibição da formação de biofilme e a concentração mínima que inibiu a formação de biofilme em 50% foi de 22 µg/mL e em 90% foi de 75 µg/mL.
Schito et al, 2011	Dimetilfructuline A e fructuline A (quinonas)	MSSA (02) MRSA (03)	Formação de biofilme	As duas substâncias inibiram em cerca de 70% a formação de biofilme.

Qiu et al, 2010a	Eugenol (fenol)	MSSA (09) MRSA (17)	Alfa-toxina enterotoxinas A e B; TSST-1	O eugenol diminuiu a produção de enterotoxinas A e B, toxina da síndrome do choque tóxico, assim como a atividade da alfa-hemolisina.
Qiu et al, 2010b	Licochalcone A (flavonóide)	MSSA (17) MRSA (9)	Alfa-toxina	A secreção da alfa-toxina foi diminuída em mais de 90% pelo licochalcone A após exposição à ½ da concentração inibitória mínima (CIM).
Qiu et al, 2010c	Licochalcone A (flavonóide)	MSSA (ATCC 29213) MRSA (2985) – isolado clínico	Enterotoxinas A e B	A secreção de enterotoxinas A e B foi diminuída pelo Licochalcone A, sendo uma inibição dose-dependente para as duas cepas de <i>S. aureus</i> .
Xiang et al, 2010	Magnolol (fenol)	MSSA (16) MRSA (14)	Alfa-toxina	Os autores verificaram que ocorre uma inibição dose-dependente da atividade hemolítica e que após exposição à ½ da concentração inibitória mínima (CIM) houve redução de cerca de 90% da hemólise associada à alfa-toxina.
Quave et al, 2008	Extrato etanólico de <i>Lonicera alpigena</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Ballota nigra</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Leopoldia comosa</i> , <i>Malva sylvestris</i> , <i>Cyclamen hederifolium</i> , <i>Rosa canina</i> var. <i>canina</i> , and <i>Rubus ulmifolius</i>	MRSA (ATCC 33593)	Formação de biofilme	Os extratos das 10 plantas foram capazes de inibir em 50% a formação de biofilme em concentrações inferiores a 32 µg/mL
Braga et al, 2005	Extrato metanólico dos frutos de <i>Punica granatum</i> L.	<i>S. aureus</i> FRI722 (Alta produção enterotoxinas)	Enterotoxina A	O extrato foi capaz de inibir a produção de Enterotoxina A na concentração de 0,05%.
Nostro et al, 2001a	Extrato éter-dietílico de <i>Helichrysum italicum</i>	MSSA (11) MRSA (09)	Coagulase, DNase, termonuclease e lipase	Houve inibição total da DNase, termonuclease e lipase, e inibição parcial da coagulase após exposição à ½ da CMI
Nostro et al, 2001b	Extrato éter-dietílico de <i>Nepeta cataria</i> L.	MSSA (32) MRSA (12)	Coagulase, DNase, termonuclease e lipase	Houve inibição total da DNase, termonuclease e lipase, e inibição parcial da coagulase após exposição à ½ da CMI

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da β -lapachona sobre os fatores de virulência biossintetizados por 12 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito inibitório da β -lapachona sobre a catalase, hemolisinas e formação de biofilme por *S. aureus* MRSA.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados para a realização da avaliação antimicrobiana dos extratos foram cedidos da Coleção de Culturas do Laboratório Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, sendo dez oriundas de isolados clínicos, uma isolada de queijo e uma cepa padrão (ATCC). A tabela 1 mostra o perfil de resistência, sensibilidade e origem das 12 cepas utilizadas neste estudo. Para realização dos testes, os micro-organismos foram cultivados em ágar Muller-Hinton a 37°C, após 18 horas de incubação, colônias isoladas foram inoculadas em caldo Muller-Hinton para padronização turbidimétrica comparável ao tubo 0.5 da escala de McFarland, equivalente a aproximadamente a 10⁸ UFC/mL. Esta suspensão bacteriana foi então diluída em solução salina para obtenção do inóculo final de 10⁷ UFC/mL ou 10⁶ UFC/mL.

Tabela 1: Origem, perfil de sensibilidade e resistência das 12 cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas neste estudo

<i>S. aureus</i>	Origem	Sensibilidade	Resistência
AM04	Escarro	CIP; GET; SZT; TEC; MER; TET	CFX;OXA;AMP; AZI
AM13	Sangue	GET; TEC	CFX;OXA;CIP; SZT;AMP;AZI; AMC
AM18	Sangue	TEC; TET	CFO; OXA; CIP; GET;SZT; AMP; AZI; AMC
AM19	Sangue	CIP; GET; SZT; TEC; MER; AZI; TET	CFO; OXA; AMP; AMC
AM20	Secreção traqueal	GET; SZT; TEC; MER; AMC; TET	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI
AM21	Secreção traqueal	GET; SZT; TEC; MER; AMC; TET	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI
AM22	Sangue	GET; SZT; TEC; MER	CFO; OXA; AMP; CIP
AM24	Sangue	TET; MER; AMC; TEC	CFO; OXA; CIP; SZT; AMP; AZI

SA17	Secreção vaginal	CIP; TEC; GET; SZT; MER; AMC; TET	CFX; AMP; AZI; OXA
IC13	Queijo	TET; TEC	CFX; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC; GET; OXA
IC155	Secreção vaginal	GET; SZT; TEC; MER; AMC; TET	CFX; CIP; AMP; AZI; OXA
ATCC25923	ATCC	CFX; OXA; CIP; SZT; GET; TEC; MER; AZI; AMC; TET	AMP

AMP: Ampicilina 10 µg; AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulâmico: 30 µg; AZI: Azitromicina 15 µg; CFO: Cefoxitina 30 µg; CIP: Ciprofloxacino 5 µg; GET: Gentamicina 10 µg; MER: Meropenem 10 µg; TEC: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; SZT: Sulfametoxazol/Trimetopin 25 µg; OXA: Oxacilina 1 µg

4.2 β-lapachona

A beta-lapachona utilizada neste estudo foi obtida no Departamento de Antibióticos da UFPE, com grau de pureza de 99,6%, na forma de cristais com coloração laranja-avermelhado, visíveis a olho nu. Estes cristais foram pulverizados e o pó foi solubilizado em um sistema contendo dimetilsulfóxido (DMSO), tween 80 e água destilada na proporção de 1,5:1,0:17,5. Para preparar a solução estoque, na concentração de 640 µg/mL, foram pesados em balança analítica 6,4 mg de beta-lapachona que foram inicialmente dissolvidos em DMSO, em seguida acrescentou-se tween 80 e água destilada aquecida a cerca de 45°C, na proporção citada resultando em 10 ml de solução. Após a solubilização completa, procedeu-se à esterilização da solução em filtro Millipore® 0,45mm.

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM da β-lapachona frente a 12 cepas MRSA foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) com modificações (figura 8). O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”. Foi preparada uma solução de beta-lapachona na concentração de 512 µg/mL. Um volume de 200 µL desta solução (512 µg/mL) foi inoculado nos poços de 1 a 12 da linha A da placa. Os demais

poços foram preenchidos com 100 μL de caldo Mueller-Hinton. Logo após, foi realizada uma diluição seriada da solução de beta-lapachona nas placas, obtendo-se assim concentrações decrescentes da droga (512 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$). Após a diluição foram inoculados em todos os poços um volume de 5 μL das suspensões microbianas padronizadas em 10^6 UFC/mL. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. O crescimento ou a inibição bacteriana foram avaliados após adição de uma solução aquosa a 0,5% de cloridrato de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC). As enzimas oxidativas presentes nas membranas celulares dos micro-organismos vivos reagem com o TTC oxidando-o, provocando a mudança de coloração de incolor (forma reduzida) para vermelho de formazan (forma oxidada). As microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 37°C . Após esse intervalo de tempo, a leitura da placa foi realizada. A presença de uma coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório da beta-lapachona, enquanto que a ausência de cor foi considerada prova positiva da ação antimicrobiana dos extratos. A CIM foi definida como sendo a menor concentração da droga antimicrobiana que impede o crescimento visível do micro-organismo inoculado. Foram incluídos no teste os controles dos solventes utilizados afim de verificar a toxicidade do DMSO e do Tween 80 para as bactérias avaliadas.

4.4 Exposição do inóculo bacteriano à beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM)

Após determinação da CIM da beta-lapachona para cada uma das doze cepas de *S. aureus*, procedeu-se a exposição da bactéria à concentração equivalente à $\frac{1}{2}$ da CIM obtida. Em um tubo de ensaio seco e esterilizado, foram colocados 0,5mL da solução de beta-lapachona equivalente a 10 vezes a $\frac{1}{2}$ da CIM e 4,5mL do inóculo bacteriano padronizado e em fase exponencial de crescimento. Os tubos teste (expostos à droga) e seus respectivos controles (sem a droga) foram incubados em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C e após este período foram utilizados para realização dos ensaios para avaliação do efeito da beta-lapachona sobre os fatores de virulência de *S. aureus*.

4.5 Avaliação do efeito da beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM) sobre a produção de catalase

O princípio bioquímico do teste da catalase está baseado na propriedade que esta enzima possui de converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Após o contato do inóculo bacteriano com o peróxido de hidrogênio, ocorre produção e liberação de oxigênio, levando à formação de efervescência imediata nas bactérias que são produtoras desta enzima.

O teste para avaliação semi-quantitativa da catalase foi realizado pelo método em tubo preconizado por Kubica (1966) com modificações. A altura da coluna de efervescência formada pela liberação de O₂ foi mensurada após a reação da catalase bacteriana com o peróxido de hidrogênio. As culturas previamente expostas à beta-lapachona durante 24 horas a 37°C e seus respectivos controles foram utilizados para realização do teste de catalase em tubo. Para cada cepa foram utilizados dois tubos (controle e teste) secos e esterilizados e neles adicionados 0,5 mL de peróxido de hidrogênio a 3% e 0,5 mL da cultura bacteriana correspondente.

4.6 Avaliação do efeito da beta-lapachona ($\frac{1}{2}$ da CIM) sobre a atividade hemolítica

O teste para avaliação da atividade das hemolisinas liberadas pelo *S. aureus* no sobrenadante das respectivas culturas foi realizado segundo metodologia descrita por

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2004), com algumas modificações. As culturas bacterianas previamente expostas à beta-lapachona e seus respectivos controles foram centrifugadas a 5.500 x g, a 4°C por 1 minuto e o sobrenadante esterilizado por filtração sob membrana Millipore® 0,45mm. Em um tubo de ensaio seco e esterilizado, uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de uma suspensão de hemácias de carneiro em tampão fosfato de sódio a 1% (v/v) pH 7,2. Como controle da ausência de hemólise e hemólise total, o mesmo volume da suspensão bacteriana foi substituído por tampão fosfato e água destilada, respectivamente. Após incubação a 37°C, por 45 minutos, os tubos foram centrifugados a 5.500 x g por 1 minuto a 25°C e os sobrenadantes, cuidadosamente, transferidos para poços de microplaca (96 orifícios) para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (ELX808/Biosystems) a 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise em relação ao controle correspondente a hemólise total (100%).

4.7 Avaliação do efeito da beta-lapachona (½ da CIM) sobre a formação de biofilme

A formação de biofilme nas culturas de *S. aureus* foi determinada pelo método de Christensen e colaboradores (1985), com modificações. O ensaio foi realizado em placas de microdiluição com 96 poços, nos poços das placas estéreis foram incubados 200µL das culturas teste (expostas à beta-lapachona) nas linhas 1, 2 e 3, 200 µL das culturas controle (não expostas) nas linhas 4, 5 e 6, e nas linhas 7 e 8 foi colocado 200µL de meio de cultura sem crescimento bacteriano como controle negativo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, após este período o conteúdo dos poços foi aspirado, e foram realizadas três lavagens dos poços com 250µL de tampão fosfato de sódio pH 7,2, as placas foram secas e em seguida as bactérias aderidas foram fixadas com 200µL de metanol a 99%. Após 15 minutos de fixação, o metanol foi removido e as placas foram postas para secar. Logo após as bactérias aderidas nas placas foram coradas com 200µL de cristal violeta a 1% durante 10 minutos. O excesso de corante foi removido lavando a placa em um filete de água corrente. Após a secagem das placas, foi realizada a ressuspensão das bactérias aderidas com 160µL de etanol 95% (v/v) em cada poço. Em seguida foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) das placas no

comprimento de onda de 595 nm. A percentagem de redução na formação de biofilme foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $100 - [(DO_{595\text{nm}} \text{ teste} / DO_{595 \text{ nm}} \text{ controle}) \times 100]$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artigo original: MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

QUALIS B1 – MEDICINA II

Effect of beta-lapachone on the virulence factors by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains

Andréa das Neves Guedes de Souza, Tiago Gomes Fernandes, Luciana Macedo, Eulália Azevedo Ximenes*

* Corresponding author:

Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Micro-organismos – Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 – Brasil

eulaliaximenes@yahoo.com.br

ABSTRACT

The methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are frequently multi-drug resistant and have the ability to biosynthesize many virulence factors that contribute to its pathogenicity. Thus, the strategy of seeking anti-virulence have been of great scientific interest. β -lapachone is a naphthoquinone having antistaphylococcal activity, among other pharmacological activities. The aim of this study was investigate the antibacterial properties of β -lapachone by assessing whether is able to interfere with the ability of MRSA strains biosynthesis of catalase, haemolysins and biofilms. The minimal inhibitory concentration of β -lapachone against 12 MRSA strains ranged from 8-32 $\mu\text{g/mL}$. In addition the biosynthesis of virulence factor was reduced when the micro-organisms grown in sub-inhibitory concentration equivalent to 0.5xMIC of β -

lapachone. The results obtained in this study showed that β -lapachone is capable of inhibiting the biosynthesis of catalase, hemolysin and biofilm formation by MRSA, indicating that after further studies on the in vivo activity and toxicity, this compound may be used in MRSA infection.

KEY WORDS: Antimicrobial activity; β -lapachone; *Staphylococcus aureus*; catalase; hemolysins; biofilm.

INTRODUCTION

The pathogenicity of the micro-organisms, in special of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is caused by the expression of several virulence factors, that includes: surface proteins which promote adhesion and colonization of host tissues; invasins that are exported to an extracytoplasmic location and promote bacterial spread in tissues (hyaluronidase, coagulase); surface factors that inhibit phagocytic engulfment (capsule and protein A); enzymes that enhance staphylococcal survival in phagocytes (catalase and superoxide dismutase); immunological disguises (protein A and coagulase); membrane-damaging toxins that disrupt eukaryotic cell membranes (hemolysins and leukotoxin) and superantigens that contribute to the symptoms of septic shock (toxic shock syndrome toxin (TSST) and biofilm formation. Expression of these virulence factors is controlled by complex staphylococcal regulatory networks, including the accessory gene regulator (agr) system, and these genes vary between MRSA strains (Goulda et al, 2012).

MRSA is highly prevalent in hospitals worldwide. In general, MRSA infection is associated with a higher mortality rate than methicillin-sensitive *S aureus* infections. Resistance of *S. aureus* to methicillin is a result of a mutant protein, a penicillin-binding

protein 2a (PBP2a) that is found in the membrane of MRSA. As many 40% of *S aureus* strains are resistant to methicillin (Durai et al, 2010).

The current arsenal of antibiotics available for the treatment of MRSA includes a limited number of antimicrobial agents such as daptomycin, teicoplanin, linezolid, tigecycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin. This situation can be expected to further complicate treatment and potentially lead to increased morbidity and mortality (Luna et al, 2010).

On this fact there is a need for the search for new class of antibacterial compounds with activity against multiresistant pathogens. Several reports have described the action of natural compounds occurring as antimicrobial agents (Qiu et al, 2011; Raja et al, 2011; Chaieb et al, 2011; Schito et al, 2011). Such plant preparations are often used as antibacterial agents in traditional medicine mainly in developing countries (Silva, Fernandes Jr, 2010).

β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-*b*]pyran-5,6-dione) is a natural naphthoquinone extracted from the bark of the lapacho tree (*Tabebuia avellanedae*) or synthesized from lapachol or lomatiol. This naphthoquinone is receiving special attention for researchers by their potential antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor actions (Coelho et al, 2010; Ferreira et al, 2010; Silva Jr et al, 2011).

Only a single study by Pereira et al (2006) describes the antimicrobial activity of naphthoquinones including β -lapachone against MRSA strains. However at the present, studies on β -lapachone ability to inhibit virulence factors are not reported. Therefore the aim of this study was to investigate the antibacterial properties of β -lapachone by assessing whether it is able to interfere with the ability of MRSA strains to biosynthesize catalase, haemolysins and biofilms.

MATERIALS E METHODS

Bacterial strains and inocula standardization

S. aureus strains (n=11) were isolated from clinical specimens and food. The standard strain used was *S. aureus* ATCC25923. Strains were isolated in sheep blood agar and after identification they were stored in brain heart infusion (BHI) plus glycerol 20% v/v (KONEMAN, 2008). *S. aureus* strains used in this study showed a resistance phenotype to several antimicrobial agents such as beta-lactams, aminoglycosides, macrolides, fluoroquinolones, tetracycline, chloramphenicol, and lincosamides. These strains were cultured into Mueller Hinton Agar (MHA) (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) and incubated at 37°C for 18 hours. Single colonies were selected and inoculated into Mueller-Hinton broth (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) to obtain a turbidity comparable to that of 0.5 McFarland standard, which is equivalent to a bacterial count of approximately 10⁸CFU/mL. After that, the bacterial suspension was diluted in saline (1:10 or 1:100) to obtain 10⁷ CFU/ mL or 10⁶ CFU/ mL.

Antimicrobial Agents

β-lapachone was obtained from the lapachol which was isolated by extracted from *Tabebuia avellaneda* sawdust. The reactions were carried out in the Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brazil according by Gonçalves de Lima et al (1962). Cefoxitin and teicoplanin were provided by Eurofarma Laboratório LTDA – Brazil. The reisitance of MRSA strains was defined for each case: cefoxitin (CFO, MIC ≥ 4 µg/mL) and teicoplanin (TEC, MIC ≥ 8 µg/mL)

(CLSI, 2010). The β -lapachone was dissolved in dimethylsulfoxide/tween80/H₂O (1.5:1.0:17.5 v/v/v) and the antimicrobial agents were dissolved in water.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) test was performed by the microdilution broth method, following the recommendations established by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) with some modifications. Serial two-fold dilutions of β -lapachone were prepared in sterile 96-well microplates containing Mueller Hinton broth (MHB). Five microliters of bacterial suspension were inoculated in each well to give a final concentration of 10^4 CFU/mL. Antimicrobial concentrations ranged from 4 μ g/mL to 512 μ g/mL. The growth inhibition was demonstrated by optical density at 630 nm using a microplate reader (Thermoplate - TP Reader[®]). Considering the total growth (100%) in the control well (MHB+bacteria), the percentage of growth reduction was attributed to the remaining wells. Appropriate solvent controls were included in this experiment to exclude the possibility that the DMSO or tween 80 concentration used would have toxic effect on the MRSA strains. The MIC was reported as the lowest concentration of β -lapachone that inhibited the bacterial growth after 24 h of incubation at 37°C. All experiments were carried out in duplicate.

Catalase test

The semi-quantitative catalase tube test was performed by Kubica (1966) with some modifications. The cultures previously exposed to beta-lapachone for 24 hours at 37 ° C and their respective controls were used to perform the catalase test tube. For each strain are listed two tubes (test and control), dried and sterilized and placed in 0.5 mL of

hydrogen peroxide at 3% and 0.5 mL of bacterial culture corresponding. The production of immediate effervescence indicates the conversion of hydrogen peroxide into water and oxygen gas and hence the presence of catalase. The results were expressed by measurement of the height of the column of effervescence generated in test tubes (exposed to the drug) and control (untreated).

Haemolysis assay

The MRSA strains were grown overnight in MHB in the absence or presence of 0.5xMIC of β -lapachone to the postexponential growth phase (10^8 CFU/mL). Bacterial supernatants were collected by centrifugation (5.500 x g) at 4°C for 1 minute and filtered at Millipore[®] (0.45 μ m). The haemolytic activity of the culture supernatants was determined using sheep erythrocytes, according to the method described by Smith-Palmer, Stewart and Fyfe (2004) with some modifications. Immediately after centrifugation an aliquot of 2.0 mL of supernatant was brought up to 1.0 mL suspension of defibrinated sheep blood in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). After incubation at 37°C for 45 min, the unlysed blood cells were pelleted by centrifugation (5500 x g) at room temperature for 1 minute. The haemolytic activity of the culture supernatant was measured by reading the optical density (OD) at 570 nm. Appropriate control were included in this experiment. For total haemolysis was used distilled water. The percentage of hemolysis was calculated by comparing the OD of the bacterial inocula exposed and not exposed to β -lapachone with the control of total haemolysis.

Biofilm formation

The test was performed according by Christensen and cols (1985) with some modifications. An aliquot of 100 μ L of overnight culture in TSB added to 1% glucose

exposed and not exposed to 0.5xMIC of β -lapachone were dispensed into each well of sterile flat-bottom 96-well polystyrene microtiter plates. The microtiter plates were incubated at 37°C for 24 hours. Culture grown in TSB with 1% glucose controls was included. After incubation, planktonic growth was then aspirated and the wells, rinsed twice with 250 μ L of PBS pH 7.2, were fixed by methanol P.A. for 15 minutes. Once the wells were fully dry, the plates were stained with crystal violet at a concentration of 1% for 10 minutes. Excess stain was rinsed off with running tap water and the plates were air-dried, resuspension of biofilms stained was carried out with ethanol 95% and the optical density was measured in spectrophotometer (ELX808/Biosystems) at 595 nm. The reduction percentage of biofilm formation in the presence of 0.5xMIC of β -lapachone was calculated using the ratio between the values of OD_{595nm} with and without β -lapachone adopting the following formula: $100 - [(OD_{595nm} \text{ with } \beta\text{-lapachone} / OD_{595nm} \text{ without } \beta\text{-lapachone}) \times 100]$.

Optical microscopy

The inhibition of biofilm formation by beta-lapachone was confirmed by microscopic observation. The plates used in the assay of biofilm formation were analyzed before the step of resuspension of biofilms in increasing the optical microscope at magnifications X100.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on GraphPad Prism 4.0 statistics software. Statistical differences and significance were assessed by one-way ANOVA test and Turkey or Bonferroni posttest. A p value $< 0,05$ indicated statistical significance.

RESULTS

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MICs of β -lapachone, cefoxitin (CFO) and teicoplanine (TEC) against MRSA strains are listed in table 1. The MIC values of β -lapachone against ranged from 8 $\mu\text{g/mL}$ to 32 $\mu\text{g/mL}$. Cefoxitin was used as positive control to confirm that *S. aureus* strains were MRSA. The MICs of β -lapachone have no significant difference between the MRSA strains ($p > 0.05$).

Effect of β -lapachone on catalase

The tests were performed in triplicate and the results obtained by catalase reduction represented as mean and standard deviation are shown in figure 1. Catalase activity of MRSA was significantly reduced when exposed for 24 hours at the $\frac{1}{2}$ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of β -lapachone ($p < 0.05$). Catalase activity was reduced more significantly ($p < 0,001$) in *S. aureus* AM18 and a lower degree of reduction of catalase activity were *S. aureus* IC155 and *S. aureus* ATCC25923. Multiple comparison analysis using the Bonferroni test revealed a significant difference between groups exposed and not exposed to β -lapachone ($p < 0,001$).

Effect of β -lapachone on hemolytic activity

The hemolytic activity of the supernatant of the MRSA cultures are shown in figure 2. When grown in the presence of $\frac{1}{2}$ MIC of β -lapachone, the haemolysis values averaged $35.9\% \pm 4.7$, whereas in cultures not exposed, the haemolysis averaged $69.9\% \pm 6.1$. Haemolytic activity of the MRSA strains were significantly reduced compared

with those of those that have not been exposed to β -lapachone ($p < 0,05$). There was no statistically significant difference between the strains tested ($p = 0.56$).

Effect of β -lapachone on biofilm formation

The results obtained for prevention of biofilm formation by β -lapachone were represented in table 2 and were expressed as percentages of reduction of biofilm formation. Following a 24h treatment with β -lapachone, a statistically significant ($p < 0.05$) reduction was observed for each strains. The degree of reduction ranged from 82.6% to 97.0%, with an average of $89.2\% \pm 2,3$. Prevention of biofilm formation by beta-lapachone was confirmed by microscopic observation (figure 3). As shown in table 2, a high reduction of biofilm formation after exposure of cultures to β -lapachone.

DISCUSSION

The search for new antimicrobial agents is an important line of research, mainly due to traditional antimicrobial resistance acquired by the microorganisms. In this sense, the naphthoquinones have shown high antimicrobial potential. Pereira et al (2006) evaluated the antimicrobial activity of β -lapachone against two *S. aureus* strains: ATCC29213 (methicillin sensitive - MSSA) and ATCC33591 (methicillin resistant - MRSA) and found that for both strains the MIC determined by microdilution broth method was 8 $\mu\text{g/mL}$. The same result was found in this study for five of the 12 MRSA strains. Of the remaining seven strains, all had an MIC of 16 $\mu\text{g/mL}$, except for strain AM21 who had MIC of 32 $\mu\text{g/mL}$.

The literature indicates that the pharmacological activity of the naphthoquinones focuses on its core ortho and para quinoid. This group usually takes one or two

electrons (redox cycle) to form the corresponding radical anion or dianion in situ. Thus the semiquinone radical accelerates hypoxia intracellular microorganisms for producing superanions (Silva et al., 2010).

The pathogenicity of *S. aureus*, as well as various other pathogens depends largely on the production and secretion of many virulence factors. Therefore the clinical performance of antibiotics used to treat these infections is not only determined by the ability of the same bactericidal or bacteriostatic, but also for its effect on bacterial virulence factors (Qiu et al, 2010a). The physico-chemical, metabolic and structural bacteria can be modified by sub-inhibitory concentrations of antimicrobial substances that, depending on the mechanism of action and the species involved, amend several factors related to virulence (Vidya, Mallya, Rao, 2005).

Studies have shown that sub-inhibitory concentrations of extracts and secondary metabolites of plants although not cause death of bacteria, are capable of inhibiting and reduce the production of factors essential for pathogenic bacteria (Qiu et al 2011a,b,c; Raja et al, 2011; Chaieb et al, 2011; Schito et al, 2011; Qiu et al, 2010a,b,c; Xiang et al, 2010).

In the present study, we evaluated the effect of beta-lapachone concentration corresponding to $\frac{1}{2}$ of the MIC on the production of catalase, and hemolytic activity on biofilm formation by 12 strains of MRSA. Catalase is an enzyme produced by various bacteria, including *S. aureus* and is involved in bacterial resistance to oxidative stress. This exoenzyme converts the hydrogen peroxide generated during cellular metabolism and molecular oxygen in water. Experimental evidence indicates that the production of reactive oxygen intermediates represent an early defense mechanisms used to limit the macrophage intracellular bacterial replication (Rojkind et al, 2002; Sen et al, 2009). The

catalase production by *S. aureus* induces the defense mechanism against bacterial host's immune system, and therefore a potential target for attenuating the virulence of the bacteria.

According to the results of this study, was verified high rate of inhibition of the catalase by β -lapachone, on average $74.0 \pm 11.6\%$, and more than 60% for all strains of MRSA, except for IC155, for which the percent inhibition was 56.6%. About 40% of bacterial toxins known harm membranes of eukaryotic cells (Tortora, Funke, Case, 2000).

The cytolysin is a group of toxins capable of forming pores in the surface and cause cell lysis and apoptosis, including α -, β -, γ -hemolysin and leucocidinas. The hemolysin are toxic for the erythrocytes, platelets and monocytes, act by binding to specific receptors in the surface of these cells results in the production of proinflammatory cytokines and the induction of apoptosis (Haslinger et al, 2003). The results of this study showed a significant reduction in the hemolytic activity of the supernatant to MRSA, with an average reduction of $51.0 \pm 6.2\%$ after exposure to $\frac{1}{2}$ of the MIC.

Biofilm formation is a bacterial defense mechanism, because the penetration and therefore hinders the action of antibiotics. The discovery of new agents able to inhibit or reduce the formation of biofilm is of great importance for the treatment of MRSA infections (Chaieb et al, 2011). After exposure to 0.5xMIC of β -lapachone was assessed a mean inhibition of $94.0 \pm 2.3\%$, confirmed by microscopic analysis and greater than 90% for most MRSA strains evaluated.

From the results presented one can conclude that β -lapachone has great potential antiestafilocócico and was able to reduce the activity of virulence factors in MRSA

strains evaluated. Thus, this compound can be included in the arsenal of natural bioactive substances with the potential of being used as an alternative therapeutic antimicrobial activity against MRSA after compatibility studies and in vivo toxicity. It can also serve as a prototype for production of new molecules more active and less toxic.

REFERENCES

Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2011. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11:29.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Wayne (PA): CLSI; 2010.

Coelho TS, Silva RSF, Pinto AV, Pinto MCFR, Scaini CJ, Moura KCG, Silva PA. 2010. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin- susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 90:293–297.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JA, Baddour LM, Barrett FF, Melten DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22:996-1006.

Durai R, Ng PC, Hoque H. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *AORN J* 91: 599-606.

Ferreira SB, Gonzaga DTG, Santos WC, Araújo KGL, Ferreira VF. 2010. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Revista Virtual Química*, v. 2, n. 2, p. 140-160.

Goulda IM, David MZ, Esposito S, Garaud J, Lina G, Mazzei T, Peters G. 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 39: 96-104.

Haslinger B, Strangfeld K, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B. 2003. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol*. Oct;5(10):729-41.

Koneman EW. 2008. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6.ed. São Paulo: MEDSI, 1465 p.

Kubica GP, Jones WD Jr, Abbot VD, Beam RE, Kilburn JO, Cater JC Jr. 1966. Differential identification of mycobacteria. I. Tests on catalase activity. *Am Rev Respir Dis*, 94:400-5.

Liu, J. 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol*. 100:92-4.

Luna CM, Rodriguez-Noriega E, Bavestrello L, Gotuzzo E. 2010. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis*, v. 14 (Suppl 2):S119-S127.

Pereira EM, Machado TB, Leal IC, Jesus DM, Damaso CR, Pinto AV. 2006. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5:5.

Qiu J, Jiang Y, Xia L, Xiang H, Feng H, Pu S, Huang N, Yu L, Deng X. 2009. Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease alpha-toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Lett Appl Microbiol* 50: 223-229.

Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X. 2010a. Eugenol reduces the expression of virulence related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 76:5846-5851.

Qiu J, Wang D, Xiang H, Feng H, Jiang Y, Xia L, Dong J, Lu J, Deng X. 2010b. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE*. 5:e9736.

Qiu J, Jiang Y, Xia L, Xiang H, Feng H, Pu S, Huang N, Yu L, Deng X. 2010c. Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease alpha-toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Lett Appl Microbiol*. 50:223-229.

Qiu J, Luo M, Dong J, Wang J, Li H, Wang X, Deng Y, Feng H, Deng X. 2011a. Menthol diminishes *Staphylococcus aureus* virulence-associated extracellular proteins expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(2), 705-712.

Qiu J, Li H, Meng H, Hu C, Li J, Luo M, Dong J, Wang X, Wang J, Deng Y, Deng X. 2011b. Impact of luteolin on the production of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 53: 238-243.

Qiu J, Xiang H, Hu C, Wang Q, Dong J, Li H, Luo M, Wang J, Deng X. 2011c. Subinhibitory concentrations of farrerol reduce α -toxin expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 315: 129-133.

Quave CL, Plano LRW, Pantuso T, Bennett BC. 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 118(3), 418-428.

Raja AF, Ali F, Khan IA, Shawl, AS, Arora DS. 2011. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA); targeting oral cavity pathogens. *BMC Research Notes*. 4:406.

Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:1872–1891.

Sen R, Das D, Bishayi B. 2009 Staphylococcal catalase regulates its virulence and induces arthritis in catalase deficient mice. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 53:307–317.

Silva, NCC, Fernandes Júnior, A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(3), 402-413.

Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. 2006. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161(4), 327–333.

Schito AM, Piatti G, Stauder M, Bisio A, Giacomelli E, Romussi G, Pruzzo C. 2011. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(2), 129-134.

Silva Jr EM, Cavalcanti BC, Guimarães TT, Pinto MCFR, Cabral IO, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Andrade CKZ, Santos MR, Simone CA, Goulart MOF, Pinto AV. 2011. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(1):399-410.

Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 2004. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 53:1023–1027.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL 2003. *Microbiologia*. Porto Alegre: ArtMed.

Vidya KC, Mallia PS, Rao PS. 2005. Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* 23:2:102-105.

Xiang H, Qiu J, Wang D, Jiang Y, Xia L, Deng X. 2010. Influence of magnolol on the secretion of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 15(3), 1679-1689.

Table 1: *Staphylococcus aureus* strains used in this study and their MICs to β -lapachone, cefoxitin and teicoplanin against MRSA strains and ATCC 25923

<i>Staphylococcus aureus</i> strains	Source	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		β -lapachone	CFO	TEC
AM04	Sput	08	16	1
AM13	Blood	16	256	1
AM18	Blood	08	128	1
AM19	Blood	16	32	1
AM20	Tracheal secretion	16	16	2
AM21	Tracheal secretion	32	16	4
AM22	Blood	16	16	2
AM24	Blood	16	128	2
SA17	Vaginal secretion	08	32	2
IC13	Cheese	08	256	2
IC155	Vaginal secretion	16	16	2
ATCC 25923	Collected at Seattle in 1945	08	4	2

MIC: Minimal inhibitory concentration; ATCC: American type culture collection; CFO: Cefoxitina; TEC: Teicoplamina

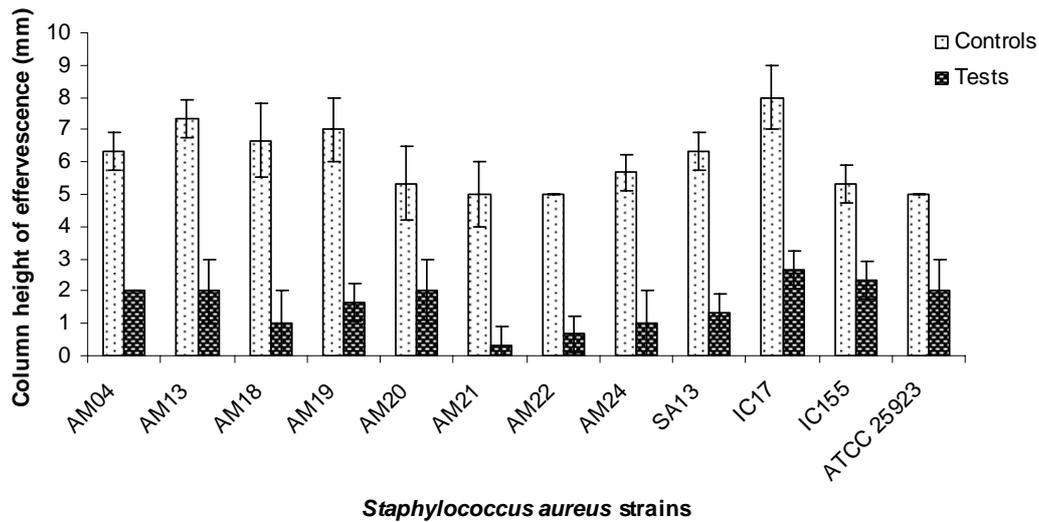


Figure 1: Effect of β -lapachone on catalase activity of MRSA strains. Values represent the mean of three independent experiments and the error bars show standard deviations of the height of the column of effervescence generated after contact of each cultures of MRSA with hydrogen peroxide 3% (v/v). Catalase activity of the MRSA strains were significantly inhibited compared with control without β -lapachone ($p < 0,05$).

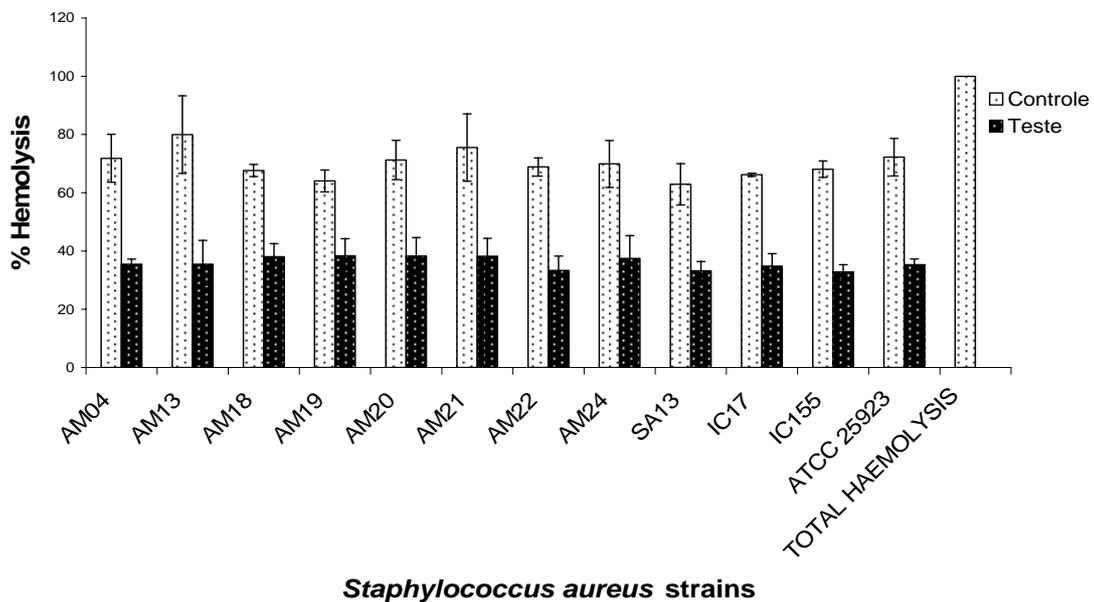


Figure 2: Effect of β -lapachone on haemolytic activity of the MRSA strains. Values represent the mean of three independent experiments and the error bars show standard deviations. Haemolytic activity of the MRSA strains were significantly reduced compared with control without β -lapachone ($p < 0,05$).

Table 2: Effect of β -lapachone on biofilm formation by MRSA strains.

<i>S. aureus</i> strains	Optical density (OD _{595nm}) (Mean \pm SD)		% Reduction of biofilm formation (Mean \pm SD)
	Controls	Tests	
AM04	1.08 \pm 0.10	0.11 \pm 0.04	89.5 \pm 3.7
AM13	0.79 \pm 0.18	0.05 \pm 0.01	93.1 \pm 2.4
AM18	0.79 \pm 0.09	0.10 \pm 0.02	86.2 \pm 3.3
AM19	0.56 \pm 0.13	0.09 \pm 0.01	82.6 \pm 5.0
AM20	1.08 \pm 0.17	0.11 \pm 0.04	89.9 \pm 3.8
AM21	1.92 \pm 0.67	0.05 \pm 0.00	97.0 \pm 1.2
AM22	0.83 \pm 0.11	0.07 \pm 0.01	90.7 \pm 1.4
AM24	0.76 \pm 0.15	0.08 \pm 0.01	88.4 \pm 3.3
SA17	0.49 \pm 0.05	0.06 \pm 0.01	86.1 \pm 2.7
IC13	0.78 \pm 0.05	0.10 \pm 0.01	87.3 \pm 1.6
IC155	0.86 \pm 0.14	0.09 \pm 0.01	88.6 \pm 2.6
ATCC 25923	0.95 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01	91.0 \pm 1.4

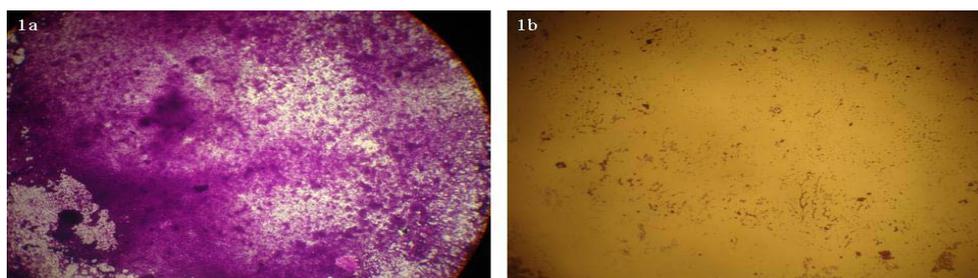


Figure 3: Microscopic observation of the effect of beta-lapachone on biofilm formation by MRSA strain AM20. 1a, crystal violet assay in absence of beta-lapachone; 1b, crystal violet assay in presence of $\frac{1}{2}$ MIC beta-lapachone.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise dos resultados obtidos neste trabalho, e comparando-o com os descritos na literatura foi possível concluir que a β -lapachona possui atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA), e que na concentração sub-inibitória correspondente à metade da concentração inibitória mínima (CIM) possui a capacidade de reduzir significativamente a biossíntese da catalase, de hemolisinas e de biofilme.

REFERÊNCIAS

ADAMO, P.; TAYLOR, P.B.; FACKRELL, H.B. Staphylococcal alpha toxin induced cardiac dysfunction. *Can J Cardiol* v. 5, p. 395–400, 1989.

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu. 2004.

ARVOLA, T., RUUSKA, T., KERANEN, J., HYOTY, H., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics*, Evanston, v. 117, n. 4, p. 760-768, 2006.

BHATIA, A., ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Delhi, v. 1, n. 2, p. 188-197, 2007.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*, v. 2011, Article ID 601905, 13 pages, 2011.

BUERKE, M.; SIBELIUS, U.; GRANDEL, U.; BUERKE, U.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; MEYER, J.; DARIUS, H. *Staphylococcus aureus* alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. *Shock*. v. 17, n. 1, p. 30-35, 2002.

BURNSIDE, K.; LEMBO, A.; DE LOS REYES, M.; ILIUK, A.; BINHTRAN, N. T. Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of *Staphylococcus aureus* by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase. *PLoS ONE* v. 5, n. 6, p. 11071, 2010.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. v. 61, n. 2, p.192-208, 2004.

COELHO, T. S.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; PINTO, M.C.F.R.; SCAINI, C. J.; MOURA, K.C.G.; SILVA, P. A. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 90, n. 5, p. 293-297, 2010.

DAS, D.; BISHAYI, B.. Staphylococcal catalase protects intracellularly survived bacteria by destroying H₂O₂ produced by the murine peritoneal macrophages. *Microbiol Pathogen* v. 47, p. 57– 67, 2009.

DOMÍNGUEZ, T.; HERNÁNDEZ, M.L.; PENNYCOOKE, J.C.; JIMÉNEZ, P.; MARTÍNEZ-RIVAS, J.M.; SANZ, C.; STOCKINGER, E.J.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; SANMARTÍN, M. Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant Physiol*. v. 153, p. 655-665, 2010.

DRAGNEVA, Y.; ANURADHA, C. D.; VALEVA, A.; HOFFMANN, A.; BHAKDI, S.; HUSMANN, M. Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates TNF and induces interleukin-8 production. *Infect. Immun*. v.69, p. 2630–2635, 2001.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n.1, p. 160–201, 2010.

EDWARDS, A. M.; MASSEY, R. C. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream?. *Trends Microbiol*. v. 19, p. 184-190, 2011.

- ERSON K. L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? *CRSQ*, v. 41, p. 318-26, 2005.
- FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Revista Virtual Química*, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.
- FERREIRA, S. B.; SALOMÃO, K.; SILVA, F. C.; PINTO, A. V.; KAISER, C. R.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, S. L. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 7, p. 3071-3077, 2011.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. v. 8, p. 623-633, 2010.
- FOURNIER, B.; PHILPOTT, D. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 521–540, 2005.
- HAYASHIDA, A.; BARTLETT, A. H.; FOSTER, T.; PARK, P. W. *Staphylococcus aureus* Beta-Toxin Induces Lung Injury through Syndecan-1. *The American Journal of Pathology*, v. 174, n. 2, 2009.
- HUSEBY, M.; KRUSE, A. C.; DIGRE, J.; KOHLER, P. L.; VOCKE, J. A.; MANN, E. E.; BAYLES, K. W.; BOHASH, G. A.; SCHILIEVERT, P. M.; OHLENDORF, D. H.; EARHART, C. A. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *PNAS*, v. 107, n. 32, p. 14407–14412, 2010.
- JEVONS, M. P. Celbenin-resistant staphylococci. *Br Med J*, v. 1, n. 3, p. 124-5, 1961.
- KIM, H. K., THAMMAVONGSA, V., SCHNEEWIND, O., AND MISSIAKAS, D.. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* v.15, p. 92–99, 2012.
- KONEMAN, E. W. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6.ed. São Paulo: MEDSI, 2008. 1465 p.
- KWAK, Y. K.; HÖGBOM, M.; COLQUE-NAVARRO, P.; MÖLLBY, R.; VÉCSEY-SEMJÉN, B. Biological relevance of natural alpha-toxin fragments from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of membrane biology* v. 233, n. 1-3, p. 93-103, 2010.
- LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J.G.; NIJLAND, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 86, p. 813–823, 2010.
- LIU, G.Y. *Molecular pathogenesis of Staphylococcus aureus infection*. Pediatric Research. v.65, n. 5, p. 71R-77R, 2009.
- LUNA, C. M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis*, v. 14 (Suppl 2):S119-S127, 2010.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO DOS SANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antim Agents* v. 21, p. 279-284, 2003.

MACK, D.; ROHDE, H.; HARRIS, L.G.; DAVIES, A.P.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs*. v. 29, p. 343–59, 2006.

MARTINEZ-AGUILAR, G.; HAMMERMAN, W. A.; MASON, E.O. JR.; KAPLAN, S. L. Clindamycin treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children. *Pediatr Infect Dis J*. v. 22, n.7, p. 593-8, 2003.

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C.; AKPAKA, P.; BORG, M. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, v. 6, e17936, 2011.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*, v. 5, n. 11, e307, 2007.

MURRAY, PATRICK R. Microbiologia Médica. 4ª ed. [S.l.]: Elsevier, 2004.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, S.; ALONZO, V.. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett* v. 230, p.191-195, 2004.

OLIVEIRA, G. C.; VIEIRA, J. D. G.; SADOYAMA, G. Prevalência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus aureus* *NewsLab*, v. 100, p. 118-130, 2010.

OOGAI, Y.; MATSUO, M.; HASHIMOTO, M.; KATO, F.; SUGAI, M.; KOMATSUZAWA, H. Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 77, n. 22, p. 8097-8105, November 2011.

PEREIRA, E. M.; MACHADO, T. B.; LEAL, I. C.; JESUS, D. M.; DAMASO, C. R.; PINTO, A. V. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*; v. 5, p. 5, 2006.

ROHDE,H.; BURANDT,E.C.; SIEMSEN,N.; FROMMELT,L.; BURDELSKI,C.; WURSTER,S.; SCHERPE,S.; DAVIES,A.P.; HARRIS,L.G.; HORSTKOTTE,M.A.; NOBLOCH,J.K.M.; RAGUNATH,C.; KAPLAN,J.B.; MACK,D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterial*, v. 28, n. 9, p. 1711-1720, 2007.

ROJKIND M.; DOMINGUEZ-ROSALES, J.A.; NIETO, N.; GREENWEL, P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 1872–1891, 2002.

ROLAIN J. M., RAULT D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus. *Annals of New York Academic Science*, v. 1063, p. 222-30, 2005.

RYBAK, M. J.; LOMAESTRO, B. M.; ROTSCAHER, J. C. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin Infect Dis*, v. 49, n. 3, p. 325-7, 2009.

SCHITO, A.M.; PIATTI, G. ; STAUDER, M.; BISIO, A.; GIACOMELLI, E.; ROMUSSI, G.; PRUZZO, C. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n. 2, p. 129-134, 2011.

SILVA, J. L.; MESQUITA, A. R. C.; XIMENES, E. A. In vitro synergic effect of β -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 4, p. 580-582, 2009.

SILVA, E. C. B. F.; MACIEL, M. A. V.; MELO, F. L.; LOPES, A. C. S.; ACA, I. S. Epidemiological surveillance and susceptibility of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a reference hospital: preliminary assessment. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*; v. 69, n. 1, p. 126-130, 2010.

SILVA JR., E. N.; CAVALCANTI, B. C.; GUIMARÃES, T. T.; PINTO, M. C. F. R.; CABRAL, I. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; ANDRADE, C. K. Z.; SANTOS, M. R.; SIMONE, C. A.; GOULART, M. O. F.; PINTO, A. V. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 399-410, 2011.

SHITTU, A. O.; UDO, E. E.; LIN, J. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates expressing low- and high-level mupirocin resistance in Nigeria and South Africa. *BMC Infect Dis*, v. 9, n. 10, 2009.

QIU, J.; FENG, H.; LU, J.; XIANG, H.; WANG, D.; DONG, J.; WANG, J.; WANG, X.; LIU, J.; DENG, X. Eugenol reduces the expression of virulence related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* v. 76 p. 5846–5851, 2010.

QUAVE, C.L.; PLANO, L.R.W.; PANTUSO, T.; BENNETT, B.C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* v. 118, n.3, p. 418-428, 2008.

SEN, R.; DAS, D.; BISHAYI, B. Staphylococcal catalase regulates its virulence and induces arthritis in catalase deficient mice. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* v. 53, p. 307– 317, 2009.

SIBELIUS, U.; GRANDEL, U.; BUERKE, M.; MUELLER, D.; KISS, L.; KRAEMER, H.J.; BRAUN-DULLAEUS, R.; HABERBOSCH, W.; SEEGER, W.; GRIMMINGER, F. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation* v. 101, p. 78–85, 2000.

SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol* v. 300, p. 170-175, 2010.

SILVA JR., E. N.; CAVALCANTI, B. C.; GUIMARÃES, T. T.; PINTO, M. C. F. R.; CABRAL, I. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; ANDRADE, C. K. Z.; SANTOS, M. R.; SIMONE, C. A.; GOULART, M. O. F.; PINTO, A. V. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 1, p. 399-410, 2011.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* v. 53, p. 1023–1027, 2004.

STEFANI, S.; CHUNG, D. R.; LINDSAY, J. A.; FRIEDRICH, A. W.; KEARN, A. M.; WESTH, H.; MACKENZIE, F. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents xxx (2012) xxx– xxx* (article in press).

SUTTROP, N.; BUERKE, M.; TANNERT-OTTO, S. Stimulation of PAF-synthesis in pulmonary artery endothelial cells by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Thromb Res* v. 67, p. 243–252, 1992.

VAZQUEZ, V.; LIANG, X.; HORNDAHL, J. K. Fibrinogen is a ligand for the *Staphylococcus aureus* microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 29797-29805.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Pública de México*, v. 47, p. 381-7, 2005.

VLASITS, J., et al. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Arch . Biochem. Biophys.* v. 500, p. 74–81, 2010.

WARDAL, E., SADOWY, E. AND HRYNIEWICZ, W. Complex Nature of Enterococcal Pheromone-Responsive Plasmids. *Pol. J. Microbiol.* v. 59, n.2, p. 79-87, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Health, Geneva: Site do WHO, <http://www.who.int/en> acessado em maio de 2011.

XIANG, H.; QIU, J.; WANG, D.; JIANG, Y.; XIA, L.; DENG, X. Influence of magnolol on the secretion of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, v. 15, n. 3, p. 1679-1689, 2010.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, v.345, p.15-18, 2000.

ANEXOS



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Aim and editorial policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Submission of manuscripts](#)

ISSN 0102-695X *printed version*
ISSN 1981-528X *online version*

Aim and editorial policy

The **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Brazilian Journal of Pharmacognosy) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and divulgation in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

Original Articles (in Portuguese, English or Spanish): it refers to unpublished research works. They must follow the usual presentation form, containing Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, etc, according to the peculiarities of each work.

Review Articles (in Portuguese, English or Spanish): they are directed to the presentation of the progress in a specific area of Pharmacognosy, containing a critical view, with the main objective of benefiting the group formed by post graduating students and non-specialists in the area. The RBFAR [Editors](#) can, fortuitously, invite qualified researchers to submit review article. It is desirable that the author has publications in the refereed area.

Divulgation Articles (in Portuguese, English or Spanish): presentation of some aspect or area of Pharmacognosy, written down in a didactic way, with the objective of benefiting the group formed by graduating and post graduating students, non-specialists in the area, pharmacists and professors of alike areas.

Form and preparation of manuscripts

1. GENERAL RULES

1.1 All submitted manuscripts should be unpublished. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not acceptable. The rights of

publication are reserved, including translations; subsequent publication is allowed with the citation of the source.

1.2 The **Revista Brasileira de Farmacognosia** receives for publication original scientific work, reviews and divulgation articles written only in English. The content of the text is the entire responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the [Editor, Section Editors or the members of the Editorial Board](#).

1.3 Language of publication is English. Manuscripts written by authors whose mother language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission to improve the English. Assistance of independent editing services can be found at <http://journalexerts.com?rcode=BJP>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

1.4 The **Revista Brasileira de Farmacognosia** reserves the right to submit all received manuscripts to ad hoc referees, whose names will be kept confidential and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may send back manuscripts to [Editor-in-Chief](#) for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations to the manuscripts which are to be made in order to conform to the standards and editorial rules of the Journal.

1.5 Every idea and conclusion presented in a published paper are the exclusive responsibility of the author(s), and do not necessarily reflect the opinion of the Editor, Section Editors or the members of the Editorial Board.

1.6 Every article involving studies with humans or animals should have the approval of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong, authorizing such studies.

1.7 All plant materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the plant material and the location of the voucher specimen. Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection.

1.8 The following immediate rejection criteria apply: i) the

manuscript does not fall into of the areas of interest of the Journal; ii) the manuscript is too preliminary, reporting activity data without comparison to a reference, or without a positive control; iii) the botanical source is not clearly identified, authenticated, and documented; iv) experimental studies of antimicrobial and antioxidant activity with crude extract, without isolation and identification of active compounds.

2. RULES FOR THE ELABORATION OF THE CONTRIBUTIONS

2.1 The **author(s)** should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript, in the event the loss or damage to the original sent to the journal.

2.2 The **figures** (photographs, charts, drawings etc.) should be presented after the References and numbered consecutively in Arabic numbers. The respective captions should be clear, concise, without abbreviations, and be located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript.

2.3 Tables and charts should be presented after the References and numbered consecutively using Arabic numbers. The tables (numeric data) should not be closed by side lines. The respective captions should be clear, concise, without abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables or charts should be placed, preferentially, just after their citation in the body of the manuscript.

2.4 The **captions of botanical illustrations** should be in accordance with the rules adopted by the Journal. Request the standards to revista@sbfgnosia.org.br.

3. TEXT FORMATTING AND CONTENTS OF THE WORK

3.1 Original Papers. Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figure with Legends, Tables, Structural Formulas. Results and Discussion sections may appear as two separate parts or as a combined "Results and Discussion" section. The normal length of the main text of an Original Paper, excluding references, tables, figures

and figure legends, is about 3,000 words. In exceptional and well justified cases longer manuscripts may be accepted. When submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement, giving compelling reasons for the length of the paper.

3.2 Short communication: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical fonts, or complementary results of an ongoing work. The communication should be arranged in the order: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Materials and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References up to 20 citations, Figure and/or Tables up to 3. Authors should limit the text, which should not exceed 2,000 words.

3.3 Reviews will generally be invited by the Editor-in-Chief. They should be as concise as possible and do not need to include experimental details. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in this area.

3.4. In addition to the Guidelines, a template (for original papers) and a sample letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are urged to follow these formats when preparing a manuscript.

3.5 The originals should be printed on A4 size paper, double spaced using Times New Roman font, font size 12, fully justified, and with margins of 2 cm. They should have a maximum of fifteen and a minimum of five pages including figures, tables and charts.

3.6 Title and subtitle: They should be in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the Journal. They should be in lower case, using Times New Roman size 14 font. Plant name should be complete including author name and Family according to <http://www.tropicos.org>.

3.7 Authors: The authors' names should appear underneath the title, centered. The first and last name should appear complete, followed by the initials of all other names (e.g. Carlos N. U. Silva or Carlos N. Ubiratan Silva). In the case of several authors, their names should be separated by commas.

3.8 Authors' affiliation: After each author name there should be superscript Arabic numbers indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the main author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address and telephone of the main author should appear as a footnote at the first page. The Journal will not publish commercial e-mail address.

3.9 Abstract: A brief and concise abstract (maximum 200 words) of the article, in either the Portuguese and English language, highlighting the more important information, the methodology, the results, and the conclusions. This will allow the reader to evaluate their interest in the article and thus avoid having to read the full work. For authors outside Brazil, the abstract in Portuguese will be done by the journal.

3.10 Keywords: The authors should identify a maximum of six Keywords to represent the content of the article. Keywords are very important for data base searches, thus validating the article. The keywords should be separated by commas.

3.11 Introduction: The Introduction should clearly establish the objective of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references to more recent publications, where these reviews have been published and are available.

3.12 Material and methods: The description of the material and the methods used should be brief, but sufficiently clear to make possible the comprehension and the reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced.

3.13 Results: The Results should be presented with a minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by adequate tables and figures. The data, when pertinent, should be submitted to statistical analysis.

3.14 Discussion: The Discussion must be restricted to the significance of the obtained data and the achieved results, avoiding conclusions not based on them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion could be presented in one section.

3.15 Acknowledgements: This is an optional item and should appear before the references.

4. REFERENCES

The formatting of references should be standardized to conform to the requirements of the journal as outlined:

4.1 References inside the text: in the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); in the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. e.g. (Silva, 1999) or (Silva & Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: provide also the page, e.g. (Silva, 1999, p. 24).

4.2 The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

4.2.1 Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>). In the case of the authorized abbreviation of a certain periodical can not be located and it is not obvious, the title should be cited complete (e.g.):

Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol 11*: (100-105).

In case the cited journal can not be easily accessible, it is recommended to present its Chemical Abstract Number, as follows:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao 22*: 203-206, apud *Chemical Abstracts 116*: 124855r.

In a citation in a citation the sources should be shown in italics:

Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res 41*: 77-82, apud *Nat Prod Abs 23*: 588-593, 1978.).

4.2.2 Book:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Book chapter:

Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman GT (org.). *A nova odontologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 95-112.

4.2.4 Thesis or dissertation materials:

Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congress:

Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófilos humanos. *XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patents:

Should be identified as indicated below, whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be informed. Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396*, apud Chemical Abstracts 105: 178423q.

4.2.7 Internet pages:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.rain-tree.com/plantdrugs.htm>, acesso em outubro 2009.

5. ABBREVIATIONS

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are: m meter; ppm parts per million; cm centimeter; cpm counts per minute; mm millimeter; dpm disintegrations per minute; μm micrometer; nm nanometer; kg kilogram; g gram; mg milligram; μg microgram; ng nanogram; LD₅₀ medial lethal dose; mL milliliter; LC₅₀ medial lethal concentration; μL micro liter; Hz hertz; s seconds; M molar; min minutes; mM millimolar; h hours; M molar; μM micro molar; SD standard deviation; N normal; SE standard error; Ci Curie; TLV threshold limit value; X mean When using a word that is or is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors

must use the symbol ®.

6. ILLUSTRATION

6.1 The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

6.2 Remove all color from graphics, except for those graphics that you would like to have considered for publication in color (see Costs section below for details).

6.3 Upload each figure in either .tiff, .jpg or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the figure legend.

7. COSTS

The journal will cover totally the costs of publication of papers of up to fifteen pages, including tables and figures. Above this number of pages, the expenses will be charged to the author(s). Color pictures will not be accepted, unless the author(s) covers the extra expenses for their publication, independent of the number of pages of the article.

8. PROOFS AND REPRINTS

Galley proofs will be sent to the corresponding author as a PDF file. Rephrasing of sentences or additions are not permitted at the page proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within five days of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

For further information, please contact:

Revista Brasileira de Farmacognosia
Prof. Cid Aimbiré M. Santos - Editor
Laboratório de Farmacognosia
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br

Submission of manuscripts

Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://submission.scielo.br/index.php/rbfar/login>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by email will not be accepted.

IMPORTANT: All authors, with their respective email addresses, should be entered into the system.

The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees' indicated by the Editorial Board.

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Farmacognosia
Rua Prof. Lothario Meissner, 632 - Jd. Botânico
80210-170, Curitiba, PR, Brasil
Tel/Fax: (41) 3360 4062



revista@sbfgnosia.org.br



MEMÓRIAS DO
INSTITUTO
OSWALDO
CRUZ

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- **Objetivos e política editorial**
- **Formato e estilo**

ISSN 0074-0276 *versão impressa*
ISSN 1678-8060 *versão on-line*

Objetivos e política editorial

As Memórias do Instituto Oswaldo Cruz são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, para não causar atrasos na publicação sugerimos que sejam checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às Memórias requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no

conteúdo científico e na apresentação.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos, no seguinte endereço:

<http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login>.

Por meio desse serviço você pode submeter o artigo e acompanhar o status do mesmo durante todo o processo editorial. Garantindo rapidez e segurança na submissão do seu manuscrito e agilizando o processo de avaliação.

O manuscrito deverá ser preparado de acordo com as **Orientações aos Autores**.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2598.4335/2561-1442), fax (+55-21-2280-5048), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br).

Formato e estilo

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e figuras deverão vir em documentos separados.

Deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>.

• **No texto, usar o sobrenome do autor e a data:**

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

• **Nas referências, usar os seguintes estilos:**

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Livro ou Tese

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Artigo de revista na Internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from:
<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

BASE DE DADOS NA INTERNET

Acesso aberto:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from:
http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from:
<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

• **Ilustrações:** figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus

manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- Tabelas: devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

- **Comunicações breves:** devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

- **Formato alternativo:** Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.
- uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.
- **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação.
- **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.: +55 21 2598-4335



memorias@fiocruz.br