

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

YASMIM DE MORAES ASSUMPÇÃO

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO
DE *Hypericum brasiliense* EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus
pseudintermedius*, *Staphylococcus coagulans* e *Staphylococcus schleiferi***

**Niterói
2021**

YASMIM DE MORAES ASSUMPCÃO

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO
DE *Hypericum brasiliense* EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus
pseudintermedius*, *Staphylococcus coagulans* e *Staphylococcus schleiferi***

Dissertação de Mestrado apresentada
à coordenação do curso de Pós-
graduação em Microbiologia e
Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal Fluminense,
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Dr. Bruno de Araújo Penna

**Niterói
2021**

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

A851e Assumpção, Yasmim de Moraes
EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE *Hypericum*
brasiliense EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus pseudintermedius*,
Staphylococcus coagulans e *Staphylococcus schleiferi* / Yasmim
de Moraes Assumpção ; Bruno de Araujo Penna, orientador.
Niterói, 2021.
73 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGMPA.2021.m.11641338709>

1. *Staphylococcus* sp. 2. MIC/MBC. 3. Biofilme. 4. *Hypericum*
brasiliense. 5. Produção intelectual. I. Penna, Bruno de
Araujo, orientador. II. Universidade Federal Fluminense.
Instituto Biomédico. III. Título.

CDD -

YASMIM DE MORAES ASSUMPCÃO

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Alves-Aguiar (UFF)

Dra. Renata Freire Alves Pereira (UFF)

Profa. Dra. Rosana B. R. Ferreira (UFRJ)

Profa. Dra. Renata F. Ferreira (Universidade de Vassouras) – membro suplente

Prof. Dr. Aloysio M. F. Cerqueira (UFF) – membro suplente

Niterói
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me capacitar, proteger e me dar forças para seguir em frente toda vez que algum obstáculo era posto em meu caminho na produção desse projeto e sempre me ajudar a vencer as diversas dificuldades que enfrentei em minha vida para chegar até esse momento.

Agradeço a minha avó Maria de Lourdes e ao meu pai Cristiano Assumpção por uma vida inteira de apoio, incentivo, carinho e amor dedicados a minha pessoa, é por vocês que acordo todos os dias para enfrentar essa vida acadêmica, obrigado por estarem sempre ao meu lado, eu amo vocês.

Agradeço ao meu noivo Yuri Ricardo por todo amor, carinho, amizade e principalmente paciência e compreensão pelos inúmeros finais de semana que passei isolada em casa estudando. Muito obrigada por esses anos de convívio, por sempre acreditar no meu potencial e me dar forças para continuar em frente quando eu já duvidava de tudo.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial a Abel Freire, Amanda Narcizo, Bianca Costa e Jonatas Rolando, obrigada por todo apoio, pela amizade verdadeira que ultrapassou os muros da universidade e hoje faz parte da minha vida pessoal.

Agradeço ao meu orientador Bruno Penna por todo apoio, paciência, determinação em me orientar e por acreditar em minha capacidade de desenvolver esse projeto. MUITÍSSIMO obrigada pela oportunidade, pela orientação e pela amizade.

Agradeço ao professor Leandro Machado Rocha do Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais pela doação do extrato Hexânico do *H. brasiliense* e, ao professor Fábio Alves, por compartilhar seu laboratório de pesquisa nesse tempo de Covid19 para a conclusão dos experimentos deste estudo e a sua aluna de doutorado Lialyz André, por toda ajuda com os protocolos de ensaio antibiofilme e ensinamentos.

Agradeço ao programa de pós-graduação e aos professores do PPGMPA pela dedicação à formação de novos profissionais.

Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Cocos Gram Positivos, em especial a Izabel Mello Teixeira que desde o meu início nessa jornada por novas descobertas microbiológicas, me acolheu e compartilhou seus conhecimentos e que hoje considero uma amiga e não apenas colega de profissão, MUITÍSSIMO obrigada.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse.

E por fim, agradeço a Capes, Faperj e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Estafilococos são bactérias associadas a uma ampla variedade de infecções da pele e tecidos moles em diferentes hospedeiros. *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi* são as principais causas de piodermite e otite em cães. A formação do biofilme é considerada um importante fator de virulência apresentado por essas espécies. O biofilme promove proteção contra o sistema imune do hospedeiro e ao tratamento com antimicrobianos, gerando quadros infecciosos de difícil erradicação. O gênero de planta *Hypericum* possui várias espécies com comprovada atividade antimicrobiana, como a espécie *Hypericum brasiliense*, que apresentou resultados promissores em estudos anteriores. No presente estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato de *H. brasiliense* em uma amostra de cada espécie (*S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. schleiferi*). A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) foi realizada por microdiluição em caldo com concentrações de 512 a 4 µg/ml. A avaliação *in vitro* da atividade antibiofilme foi realizada em três momentos diferentes (em formação, pré-formado jovem e pré-formado maduro). A análise da proliferação do biofilme em formação foi realizada em placa de 24 poços contendo extrato de *H. brasiliense* nas CMI referentes a cada uma das amostras bacterianas. O número de unidades formadoras de colônias foi contado, calculado em UFC/mL e transformado em Log₁₀. Os resultados de CMI foram 8 µg/mL para *S. pseudintermedius* (ED99) e 32 µg/mL para as amostras de *S. schleiferi* (SD42) e *S. coagulans* (SD84). *S. pseudintermedius* (ED99) obteve valor de CMB de 32 µg/mL enquanto *S. schleiferi* (SD42) e a amostra SD84 (*S. coagulans*) obtiveram como CMB o valor de 256 µg / mL. Através da análise do biofilme observou-se a redução estatisticamente significativa (p <0,005) da formação do biofilme em formação, do biofilme pré-formado jovem e pré-formado maduro das amostras ED99, SD84 e SD42. *H. brasiliense* apresentou ação antimicrobiana e antibiofilme, demonstrando boas perspectivas para terapia de infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme.

Palavras-chave: *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus coagulans*, *Hypericum brasiliense*, CMI, CMB, biofilme.

ABSTRACT

Staphylococci are bacteria associated with a wide variety of skin and soft tissue infections in different hosts. *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* are the main causes of pyoderma and otitis in dogs. Biofilm formation is considered an important virulence factor presented by these species. The biofilm promotes protection against the host immune system and treatment with antimicrobials, generating infectious conditions that are difficult to eradicate. The plant genus *Hypericum* has several species with proven antimicrobial activity, such as *Hypericum brasiliense*, which has already shown promising results in previous studies. In the present study, we evaluated the antimicrobial and antibiofilm activity of *H. brasiliense* extract in isolates of *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* and *S. schleiferi*. One sample of *S. pseudintermedius*, one of *S. coagulans* and one of *S. schleiferi* were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericide (MBC) determinations were performed by microdilution in broth with concentrations of 512 to 4 µg/ml. The *in vitro* evaluation of antibiofilm activity was performed in 96-well plates at three different times (in formation, young pre-formed and mature pre-formed). The analysis of the proliferation of biofilm in formation was performed in a 24-well plate containing *H. brasiliense* extract in the CMI of each of the bacterial samples. The number of colonies forming units was counted, calculated in UFC/mL and transformed into Log₁₀. CMI results range from 8 µg / mL for *S. pseudintermedius* (ED99) while for *S. schleiferi* (SD42) and *S. coagulans* (SD84) CMI of 32 µg / mL. *S. pseudintermedius* (ED99) obtained a CMB value of 32 µg/mL while the *S. schleiferi* (SD42) and SD84 sample (*S. coagulans*) obtained a CMB value of 256 µg/mL. The analysis of biofilm proliferation showed a statistically significant reduction in biofilm proliferation ($p < 0,005$) at the time of formation, young preformed and mature preformed for isolates ED99, SD84 and SD42. *H. brasiliense* showed antimicrobial and antibiofilm activity presenting promising perspectives for the therapy of infections caused by biofilm-forming bacteria.

Keywords: *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus coagulans*, *Hypericum brasiliense*, MIC, MBC, biofilm

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ATS – Ágar Triptona de Soja

Bap - Proteína Associada ao Biofilme (“*Biofilm Associated Protein*”)

BHI – *Brain Heart Infusion*

CCD – Cromatografia de Camada Delgada.

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High performance liquid chromatography, HPLC).

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (Clinical and Laboratory Standards Institute).

CMB - Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DO – Densidade Ótica.

ECN - Estafilococos Coagulase Negativa

ECP - Estafilococos Coagulase Positiva

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

icaA: intercellular adhesion protein A

icaB: intercellular adhesion protein B

icaC: intercellular adhesion protein C

icaD: intercellular adhesion protein B

LTPN – Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MH - Müeller-Hinton.

MRS – Estafilococos Resistentes à Meticilina

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

MRSP – *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina

MRSS – *Staphylococcus schleiferi* resistente à metilina

MSSP – *Staphylococcus pseudintermedius* susceptível à metilina

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PBP - Proteína Ligante da Penicilina (“Penicilin Binding Protein”)

SCCmec – *Staphylococcal Chromosome Cassettemec mec* – Cassete Cromossômico

Estafilocócico

SIG – *Staphylococcus intermedius Group* – Grupo dos *Staphylococcus intermedius*

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração das etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	22
Figura 2 Fotografia da planta inteira de <i>Hypericum brasiliense</i>	27
Figura 3 Ilustração da placa de 96 poços contendo concentrações seriadas ($\mu\text{g/mL}$) do extrato e as respectivas cepas a serem testadas para a determinação da CMI.....	32
Figura 4 Ilustração da placa Petri para observação da concentração mínima bactericida do <i>Hypericum brasiliense</i>	33
Figura 5 Ilustração do esquema da microplaca para o ensaio de antibiofilme.....	34
Figura 6 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme em formação de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> amostra ED99.....	40
Figura 7 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme em formação de <i>S. coagulans</i> amostra SD84.....	41
Figura 8 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme em formação de <i>S. schleiferi</i> amostra SD42.....	41
Figura 9 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme pré formado jovem de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> amostra ED99.....	42
Figura 10 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme pré formado jovem de <i>S. coagulans</i> amostra SD84.....	43
Figura 11 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme pré formado jovem de <i>S. schleiferi</i> amostra SD42.....	43
Figura 12 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme pré formado maduro de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> amostra ED99.....	44
Figura 13 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme pré formado maduro de <i>S. coagulans</i> amostra SD84.....	45
Figura 14 Avaliação do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> no biofilme pré formado maduro de <i>S. schleiferi</i> amostra SD42.....	45
Figura 15 Análise da proliferação do biofilme por UFC/mL (Log10) formado pela amostra de <i>S. pseudintermedius</i> ED99 sob a ação do <i>H. brasiliense</i>	47
Figura 16: Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>S. pseudintermedius</i> ED99.....	47
Figura 17 Análise da proliferação do biofilme por UFC/mL (Log10) formado pela amostra de <i>S. coagulans</i> SD84 sob a ação do <i>H. brasiliense</i>	48

Figura 18: Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>S. coagulans</i> SD84.....	48
Figura 19 Análise da proliferação do biofilme por UFC/mL (Log10) formado pela amostra de <i>S. schleiferi</i> SD42 sob a ação do <i>H. brasiliense</i>	49
Figura 20: Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>S. schleiferi</i> SD42.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Relação das cepas bacterianas utilizadas no estudo.....	30
Tabela 2 Relação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) do extrato de <i>Hypericum brasiliense</i> frente as cepas de <i>Staphylococcus coagulans</i> , <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> e <i>Staphylococcus schleiferi</i>	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	15
2.1.2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	16
2.1.1 <i>Staphylococcus schleiferi</i>	18
2.2. BIOFILME EM <i>Staphylococcus</i> sp.....	20
2.3 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS AOS ANTIMICROBIANOS.....	24
2.3.1 <i>Hypericum brasiliense</i>	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	30
4.2 LOCAL DE COLETA E PREPARO DO EXTRATO DE <i>Hypericum brasiliense</i>	30
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE <i>Hypericum brasiliense</i>	31
4.3.1 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	31
4.3.2 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)	32
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE <i>Hypericum brasiliense</i>	33
4.4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO SOB O BIOFILME EM FORMAÇÃO	34
4.4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO SOB O BIOFILME PRÉ- FORMADO JOVEM.....	35
4.4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO SOB O BIOFILME PRÉ - FORMADO MADURO	36
4.2 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DO BIOFILME	37
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	38
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA	39
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE <i>Hypericum brasiliense</i>	40
5.2.1 ENSAIO ANTIBIOFILME EM FORMAÇÃO	40
5.2.2 ENSAIO ANTIBIOFILME PRÉ FORMADO JOVEM	42

5.2.3 ENSAIO ANTIBIOFILME PRÉ FORMADO MADURO	44
.....	Erro! Indicador não definido.
5.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DO BIOFILME E MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA	46
.....	Erro! Indicador não definido.
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9. APÊNDICES E ANEXOS.....	68

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* possui espécies que fazem parte da microbiota da pele e mucosa do trato respiratório superior de mamíferos e aves de forma não patogênica (DEVRIESE *et al.*, 2005; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2011). Bactérias deste gênero, de maneira oportunista, podem causar uma série de infecções em seus hospedeiros como: piodermites, otites, infecções de sítios cirúrgicos, infecções urinárias, dentre outras (HANSELMAN *et al.*, 2009; PERRETEN *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2013).

Staphylococcus pseudintermedius é normalmente encontrado como parte da microbiota de animais como cães e gatos (GHARSA *et al.*, 2013; KIZERWETTER-ŚWIDA *et al.*, 2017). Apesar de ser um comensal natural desses animais, *S. pseudintermedius* é caracterizado como principal agente causador de piodermite em cães (BANNOEHR & GUARDABASSI, 2012). Essa espécie também possui relevância por seu potencial zoonótico, pois, apesar da constante associação desses patógenos com infecções em animais, *S. pseudintermedius* já foi isolado de endocardite, rinosinusite e bacteremias associadas à utilização de cateteres em humanos, representando uma grande preocupação em termos de saúde pública (CHUANG *et al.*, 2010; STEGMANN *et al.*, 2010).

Staphylococcus schleiferi e *Staphylococcus coagulans* (originalmente conhecidos como *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*) também são importantes patógenos na medicina veterinária, frequentemente associados a infecções de pele e otites em cães (MAY *et al.*, 2012; DAVIS *et al.*, 2013). Recentemente um estudo realizado por Madhaiyan e colaboradores em 2020 observou diferenças genotípicas e fenotípicas as quais em conjunto apoiaram a reatribuição de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* para a nova espécie *Staphylococcus coagulans* (MADHAIYAN *et al.*, 2020). Além disso, essas espécies bacterianas também possuem importância para a medicina humana, uma vez que esses patógenos já foram isolados causando infecções de sítios cirúrgicos e de material protético implantado em humanos, demonstrando se tratar de duas espécies com significativo potencial zoonótico (CELARD *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2019).

Outro fator de grande preocupação frente às espécies de *Staphylococcus* tem sido a emergência de cepas veterinárias resistentes à diversos antimicrobianos. Em decorrência do uso indiscriminado dos antimicrobianos, foram surgindo patógenos resistentes e multirresistentes, tais como as cepas resistentes à meticilina (MRS)

(PERRETTEN *et al.*, 2010; WALTHER *et al.*, 2016) o que dificulta ainda mais o tratamento dessas comorbidades.

O surgimento de cepas de estafilococos resistentes à meticilina (MRS, do inglês – *Methicilin Resistant Staphylococcus*) em especial *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. schleiferi* tem gerado grande preocupação para a medicina humana e veterinária uma vez que a estreita interação social entre animais de companhia e humanos pode favorecer a troca dessas cepas resistentes entre si. Do mesmo modo, a formação de biofilme por essas espécies contribui ainda mais para que esses patógenos resistentes persistam no hospedeiro, mesmo sob tratamento com antimicrobianos. A formação de biofilme bacteriano pode ser considerada como um importante fator de virulência das espécies do gênero *Staphylococcus* (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007).

O biofilme é definido como um agregado de células bacterianas que estão envolvidas numa matriz extracelular, formada por polissacarídeos, proteínas e outros componentes orgânicos, que permitem a sua aderência em superfícies bióticas ou abióticas (FREITAS *et al.*, 2010; DIAZ *et al.*, 2010). A formação desse complexo sistema torna as bactérias protegidas contra o sistema imune do hospedeiro e ao tratamento com antimicrobianos, gerando quadros infecciosos de difícil tratamento (TRENTIN *et al.*, 2011). Apesar da sua importância na clínica humana e veterinária, para algumas espécies do gênero em especial as relacionadas a animais, ainda são poucos os estudos que se dedicam ao entendimento da formação de biofilmes.

Devido à emergência da resistência antimicrobiana, é cada vez mais crescente a busca por novas alternativas terapêuticas, seja por moléculas de origem animal, vegetal ou até mesmo sintéticas. Novas drogas podem permitir a melhora no tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos, e ajudar a superar a questão da resistência na prática clínica. Nesse sentido, os estudos de plantas superiores como fonte de novas drogas terapêuticas para responder ao aumento da resistência aos antimicrobianos utilizadas na clínica vêm crescendo a cada dia (COWAN, 1999; SHARIF *et al.*, 2017; AYGÜ & ŞERBETÇI, 2020).

O gênero *Hypericum* tem obtido destaque neste sentido, uma vez que extratos e substâncias isoladas de diferentes espécies desse gênero apresentam atividade antidepressiva, anti-inflamatória, antiviral e antibacteriana (GIBBONS *et al.*, 2002; RABANAL *et al.*, 2002, SADDIQE, 2010; VINCENT, 2021).

Dentre as espécies desse gênero, *Hypericum brasiliense* vem sendo analisada por grupos de pesquisas apresentando resultados promissores no combate ao biofilme tanto

de bactérias Gram positivas (*S. aureus*), como Gram negativas (*Bordetella bronchiseptica*) (GIBBONS *et al.*, 2002; RABANAL *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 1995, 1996, 2008; MITTAL *et al.*, 2019). Trata-se de uma espécie que possui em sua composição, moléculas com atividade antibacterianas já descritas (ROCHA *et al.*, 1995). Apesar de seu potencial, a atividade do *H. brasiliense* sobre a formação de biofilme ainda não foi avaliada em espécies de interesse para a medicina veterinária.

Dessa forma, estudos *in vivo* e *in vitro* que se propõem a avaliar potenciais novos fármacos e produtos naturais com atividades antimicrobianas que possam ser utilizados como futuras alternativas terapêuticas para o tratamento dessas espécies patogênicas, são de grande relevância e devem ser realizados.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. GÊNERO *Staphylococcus*

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, descritos pela primeira vez por Alexandre Ogston em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos (SANTOS *et al.*, 2007; CORREAL *et al.*, 2013). Medem aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, incapazes de formar esporos e, em sua maioria, anaeróbios facultativos, além de produtores da enzima catalase (MALIK *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2007). Suas colônias são grandes, opacas, cremosas, variando na coloração de branco a amarelodourado quando cultivadas em meio de cultura sólido (KONEMAN *et al.*, 2001). Quanto ao aspecto morfológico, podem apresentar-se isoladamente, em duplas, em cadeia ou, mais comumente, agrupados desordenadamente lembrando o formato de cacho de uva (MURRAY *et al.*, 2007).

Dados mais recentes apontam a presença de 57 espécies e 28 subespécies incluídas no gênero (<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html> - data de acesso: 26/07/2021). Outra questão importante em relação aos integrantes do gênero *Staphylococcus* é que estes podem ser divididos em dois grandes grupos denominados: estafilococos coagulase positivo (ECP) e estafilococos coagulase negativo (ECN), de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase.

Os estafilococos podem ser encontrados habitando a microbiota normal da pele e a mucosa do trato respiratório superior de humanos e de animais de forma não patogênica. Mas, de maneira oportunista, podem causar uma série de infecções em seus hospedeiros (HANSELMAN *et al.*, 2009; PENNA *et al.*, 2013; PERRETEN *et al.*, 2010; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2011). As infecções oportunistas causadas por patógenos desse gênero estão intimamente relacionadas aos mecanismos de agressão e aos seus respectivos efeitos no hospedeiro (COX, 2006; HILL & IMAI, 2016). A produção de enzimas extracelulares (coagulase, estafiloquinase, hialuronidase, lipases, proteases), de toxinas (enterotoxinas e toxinas esfoliativas), produção de cápsula e formação de biofilme são os principais mecanismos de agressão que podem salientar os integrantes do grupo dos estafilococos como organismos com potencial patogênico (HILL & IMAI, 2016).

Outro fator importante tem sido a emergência de amostras de estafilococos resistentes à meticilina (*Methicilin Resistant Staphylococcus*-MRS) representado um problema de saúde pública, principalmente devido às opções de tratamento limitadas (PERRETEN *et al.*, 2010; WALTHER *et al.*, 2016). A resistência à meticilina é um dos tipos de resistência mais importantes em estafilococos e ocorre pela presença do gene *mecA*, responsável por codificar uma Proteína Ligadora da Penicilina (*Penicilin Binding Protein* - PBP) de forma alterada (BREVES *et al.*, 2015), que reduz assim a afinidade por antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (PERRETEN *et al.*, 2010). O gene *mecA* é altamente conservado entre algumas espécies do gênero *Staphylococcus* (MATSUHASHI *et al.*, 1986), e está contido em um elemento genético móvel conhecido como *Staphylococcal Chromosome Cassette mec – SCCmec*. A presença do gene confere resistência à toda a classe dos β -lactâmicos, que são geralmente as mais utilizadas no tratamento de infecções estafilocócicas (JEVONS, 1961).

Além da resistência aos β -lactâmicos, os MRS geralmente também apresentam resistência a outros antibióticos, dificultando ainda mais o tratamento de infecções causadas por esses patógenos (LEHNER *et al.*, 2014).

2.1.2 *Staphylococcus pseudintermedius*

Staphylococcus pseudintermedius é uma espécie bacteriana que faz parte de um grupo conhecido como *Staphylococcus Intermedius Group* (SIG) que é composto por três espécies: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini* (WEESE *et al.*, 2012). *S. intermedius*, primeiramente descrito em 1976 por Hajek foi, por muito tempo, considerado a principal causa de infecções de pele em cães. Porém, através do aprimoramento de técnicas moleculares ao longo dos anos, observou-se que na verdade, *S. pseudintermedius* era a espécie bacteriana mais isolada, e não *S. intermedius*, como se acreditava (DEVRIESE *et al.*, 2009; GHARSA *et al.*, 2013). A identificação errônea se justifica pela grande semelhança fenotípica entre as espécies desse grupo. Somente com o advento da biologia molecular foi possível a identificação e diferenciação correta entre as espécies (SASAKI *et al.*, 2010).

Descrito no ano de 2005 por Devriese e colaboradores, *S. pseudintermedius* é normalmente encontrado como parte da microbiota de animais como cães e gatos (GHARSA *et al.*, 2013; KIZERWETTER-ŚWIDA *et al.*, 2017). Em cães, essa espécie coagulase positiva é comensal natural da pele e das membranas mucosas, e constituem

cerca de 90% dos estafilococos isolados desses animais (BANNOEHR & GUARDABASSI, 2012). Apesar de fazer parte da microbiota normal, pode de maneira oportunista, causar uma série de infecções (OTTO, 2018; PENNA *et al.*, 2013; RAVENS *et al.*, 2014).

Apenas um ano após a sua descrição, esse microrganismo foi isolado pela primeira vez causando infecção em humanos (VAN HOOVELS *et al.*, 2006). *S. pseudintermedius* já foi isolado desde então de: sítio cirúrgico (STEGMANN *et al.*, 2010; LOZANO *et al.*, 2017), bacteremia associada ao uso de cateter (CHUANG *et al.*, 2010), endocardite associada a dispositivo cardíaco (RIEGEL *et al.*, 2011), feridas por mordidas de cães infectados (BORJESSON *et al.*, 2015) e casos de celulite e úlcera (LOZANO *et al.*, 2017).

Em 2001, Hillier e Griffin evidenciaram que a piодermite canina era a consequência clínica mais preocupante causada por esse patógeno, com aproximadamente 10% dos cães afetados em todo o mundo (HILLIER & GRIFFIN, 2001). Embora seja importante ressaltar que esta espécie bacteriana é muitas vezes diagnosticada incorretamente como *Staphylococcus aureus* ou *S. intermedius*, e, portanto, casos de *S. pseudintermedius* podem ser subnotificados (BORJESSON *et al.*, 2015).

Dessa forma, apesar do uso de metodologias de genotipagem para a correta identificação de *S. pseudintermedius*, a incidência de casos de infecções em humanos por essa espécie ainda é pouco estudada, conhecida e muitas vezes subnotificada, comprometendo estudos de vigilância epidemiológica (WEESE, VAN DUIJKEREN, 2010; WANG *et al.*, 2013).

Geralmente o tratamento para piодermite canina é feito com o uso de antibióticos, cremes e shampoos contendo algum agente antimicrobiano. O uso repetido desses agentes no combate às infecções recorrentes de piодermite está intimamente relacionado ao desenvolvimento de resistência a antibióticos e a rápida disseminação global de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (*Methicillin Resistant Staphylococcus pseudintermedius* – MRSP) (ONUMA *et al.*, 2011).

S. pseudintermedius possui diversos fatores de virulência que podem estar associados ao caráter oportunista que esse patógeno apresenta. Dentre eles se destacam a proteína A, citotoxinas, enterotoxinas, toxinas esfoliativas e proteínas de superfície (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Este patógeno apresenta 18 proteínas de superfície (SpS), que estão envolvidas no processo de adesão bacteriana às células do hospedeiro, contribuindo diretamente com o processo de formação de biofilme, um dos

principais e mais importantes fatores de virulência apresentado por este patógeno (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Nos últimos anos, o interesse por esse microrganismo aumentou devido ao seu potencial zoonótico embora casos clínicos humanos ainda sejam raros e, principalmente devido ao surgimento de cepas MRSP (SOMAYAJI *et al.*, 2016; WALTHER *et al.*, 2017). A incidência de cepas de MRSP causando infecções em animais ao redor do mundo é bastante variável. Há estudos na Espanha que apontam para níveis baixos (1% de MRSP) (GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2011), enquanto outros identificam índices altos (em torno de 76%) no Japão (ONUMA *et al.*, 2011). Com relação ao Brasil, um estudo realizado no Rio de Janeiro, também identificou uma alta incidência de cepas de *S. pseudintermedius*, sendo a espécie mais isolada (47,4%) em cães acometidos por piodermite, apresentando resistência e multirresistência aos antimicrobianos incluídos no estudo (PENNA *et al.*, 2009).

O risco de infecção humana por MRSP ainda não foi totalmente elucidado, apesar disso, estudos relatam a presença de MRSP em fossas nasais de médicos veterinários, proprietários de animais e em indivíduos que frequentemente possuem contato íntimo com animais (MORRIS *et al.*, 2010). Dessa forma, considerando que MRSP não é um membro da microbiota normal de seres humanos, é possível inferir que há uma transferência importante e o risco de transmissão zoonótica não deve ser ignorado (MORRIS *et al.*, 2010; PAUL *et al.*, 2011).

Algumas dessas cepas apresentam ainda resistência a todos os antimicrobianos comumente usados na clínica, além de serem capazes de transferir essa resistência entre outras espécies de estafilococos, o que representa uma grande preocupação em termos de saúde pública uma vez que o tratamento de MRSP pode ser desafiador por conta de sua multirresistência, bem como sua capacidade de formação de biofilme (SOMAYAJI *et al.*, 2016; WALTHER *et al.*, 2017).

2.1.1 *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus coagulans*

A espécie *Staphylococcus schleiferi*, foi considerada durante muitos anos, coagulase variável, por apresentar duas subespécies divergentes nesse teste: *S. schleiferi* subsp *coagulans*, coagulase positiva e *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, coagulase negativa (CAIN *et al.*, 2011). Entretanto, recentemente um estudo realizado por Madhaiyan e colaboradores em 2020 observou diferenças genotípicas e fenotípicas as quais em

conjunto apoiaram a reatribuição de *S. schleiferi* subsp *coagulans* para a nova espécie *Staphylococcus coagulans* (MADHAIYAN *et al.*, 2020)

O primeiro relato da espécie *S. schleiferi* subsp *schleiferi* foi realizado por Freney e colaboradores em 1988, isolado de espécimes clínicos humanos (FRENEY *et al.*, 1988). Dois anos depois, um caso de otite canina, observado no Japão no ano de 1990 foi classificado como o primeiro relato de isolamento da espécie *S. schleiferi* subsp *coagulans* (IGIMI *et al.*, 1990). A partir de então há registros dessa espécie em casos de piodermite, otite externa, infecções urinárias, infecções do trato respiratório e fluido cerebrospinal em cães (BES *et al.*, 2002; CAIN *et al.*, 2011; PENNA *et al.*, 2013). Além disso, os antigos integrantes dessa espécie possuem diversos fatores de virulência associados às infecções de pele e tecidos moles, como a capacidade de formar biofilme, produzir lipase e esterases (CAIN *et al.*, 2011).

Na medicina humana, ambos patógenos também têm seu valor, uma vez que já foram recuperados de infecções de sítios cirúrgicos, infecções de material protético implantado, incluindo marca passo (CELARD *et al.*, 1997). Um estudo retrospectivo entre 2000 e 2020, identificou quatro registros na literatura de casos de *S. schleiferi* causando meningite em seres humanos (AZIMI *et al.*, 2020).

S. schleiferi sempre foi considerado um patógeno bastante susceptível aos tratamentos com antimicrobianos. Porém, estudos recentes têm mostrado a sua emergência como uma espécie resistente a diversas drogas, sendo de maior preocupação, *S. schleiferi* resistente à meticilina (MRSS). Um estudo realizado por Vanni e colaboradores (2009) na Itália, encontrou 4,1% de amostras de *S. schleiferi* resistente à meticilina isolados de cães entre as analisadas (VANNI *et al.*, 2009). Outro estudo realizado nos Estados Unidos identificou altos níveis de resistência para esta espécie, onde 57,3% das amostras analisadas, foram identificadas como *S. schleiferi* resistentes à meticilina. Embora seja um número alto de amostras resistentes, os pesquisadores verificaram que, pelo menos 50% dessas amostras, eram susceptíveis aos antibióticos não β -lactâmicos (CAIN *et al.*, 2011).

No Brasil, um estudo realizado por Penna e colaboradores (2013) observou a presença de isolados de *S. schleiferi* em amostras coletadas de cães aparentemente saudáveis ou acometidos por piodermite e otite, dentre as quais, 10% foram identificadas como MRSS. Outro estudo realizado no Brasil, por Teixeira e colaboradores (2019), obteve 42% de seus isolados de cães aparentemente saudáveis ou acometidos por piodermite e otite identificados como *S. schleiferi* representando a espécie mais isolada

nesse estudo. Além disso, foi observada uma taxa de 10,2% de amostras resistentes à meticilina das quais 52,9% eram MRSS (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Recentemente, um estudo realizado na Coreia por Lee e colaboradores (2019) avaliou cepas de *S. schleiferi* quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos observando a presença de cepas resistentes à meticilina. Do total de amostras analisadas nesse estudo 23,8% foram identificadas como MRSS. Além disso, ao avaliarem fatores de virulência dos estafilococos frequentemente associados a infecções de pele e tecidos moles, como a formação de biofilme por exemplo, observaram que os isolados de MRSS foram mais capazes de formar biofilme quando comparadas com cepas de *S. schleiferi* sensíveis à meticilina (MSSS) isoladas de cães saudáveis ou com otite externa (LEE *et al.*, 2019).

Além da resistência a beta-lactâmicos, a resistência a outras classes de antimicrobianos também já foi reportada em amostras de *S. schleiferi*. Por exemplo, um estudo realizado por Intorre e colaboradores em 2007 verificou que quatro das 10 amostras de *S. schleiferi* se mostraram susceptíveis a todas as fluoroquinolonas. Esse fator representa um grande desafio no tratamento de infecções bacterianas, uma vez que as opções de antimicrobianos tornam-se restritas além da possibilidade dessas cepas resistentes propiciarem infecções permanentes (INTORRE *et al.*, 2007).

Amostras de *S. schleiferi* resistentes à meticilina também já foram encontradas causando infecções em seres humanos. No ano de 2016, Swe e colaboradores descreveram em seus estudos de forma detalhada e pioneira, infecção causada por *S. coagulans* resistente à meticilina em um homem diagnosticado com carcinoma hepático (SWE *et al.*, 2016). Embora infecções por *S. schleiferi* em humanos ainda sejam eventos raros, estudos anteriores revelaram serem mais comuns em indivíduos do sexo masculino e em imunossuprimidos (HÉRNANDEZ *et al.*, 2001).

2.2. BIOFILME EM *Staphylococcus sp*

O biofilme pode ser caracterizado como uma comunidade de células envolvidas por uma matriz exopolimérica autoproduzida, fixada em uma superfície, podendo apresentar diversas substâncias tais como polissacarídeos, proteínas e DNA (KIEDROWSKI & HORSWILL, 2011).

Além de dificultarem o acesso da terapia antimicrobiana e das defesas do hospedeiro às bactérias, os biofilmes conferem proteção contra a falta de nutrientes e demais estresses do meio externo, são facilitadores da comunicação célula-célula através

do mecanismo de *Quorum sensing* e dos processos de transferência de material genético dentro dessa população bacteriana (WOLSKA *et al.*, 2016). O biofilme pode ainda ser um importante fator de disseminação, uma vez que as células podem se desprender, voltar ao estado planctônico e se dispersar pelo meio, chegando a novos ambientes passíveis de colonização (PAHARIK; HORSWILL, 2016).

Dentro do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* e *S. epidermidis* são as espécies mais estudadas quanto ao processo de formação de biofilme (PAHARIK & HORSWILL, 2016). *S. aureus* produz biofilme de aspecto liso com uma matriz extracelular composta por células mortas e DNA extracelular (eDNA) liberado após a morte das bactérias que compõem o biofilme. Além disso, já foi evidenciada a presença de substâncias produzidas e secretadas pelas células bacterianas tais como ácidos teicóicos, proteínas estafilocócicas e do hospedeiro (WOLSKA *et al.*, 2016).

Embora os constituintes moleculares envolvidos no desenvolvimento do biofilme bacteriano variem entre as espécies, o processo de formação do biofilme é comumente descrito possuindo três estágios sequenciais básicos: adesão, proliferação/maturação e dispersão (O'TOOLE *et al.*, 2000; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; KOSTAKIOTI *et al.*, 2013).

Em *S. aureus*, já foram relatados estágios semelhantes de desenvolvimento desse complexo processo (LE *et al.*, 2014) contudo, mais recentemente, novos ensaios elaborados revelaram uma visão detalhada do desenvolvimento do biofilme dessa espécie, onde foi possível observar cinco estágios que constituem o processo de formação de biofilme em *S. aureus* incluindo: adesão, multiplicação, êxodo, maturação e dispersão (Fig. 1) (MOORMEIER *et al.*, 2014; MOORMEIER *et al.*, 2017).

A adesão, caracterizada como o primeiro estágio da formação do biofilme corresponde à fixação das células planctônicas a uma superfície. Para que ocorra essa adesão, *S. aureus* por exemplo, utiliza-se de diversas proteínas de superfície coletivamente denominadas MSCRAMMs (do inglês *Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules*). Estas moléculas promovem a ligação com componentes da superfície do hospedeiro como fibronectina, colágeno e fibrinogênio (MARRAFFINI *et al.*, 2006; SPEZIALE *et al.*, 2010; MOORMEIER *et al.*, 2017).

O segundo estágio corresponde a multiplicação bacteriana. Durante esse processo ocorre a formação de uma espécie de “tapete” de células, bem como a produção da matriz extracelular e DNA extracelular (eDNA) na qual as bactérias ficam envoltas (MIZDAL, 2014; MOORMEIER *et al.*, 2017). O terceiro estágio, denominado de êxodo foi

recentemente caracterizado como uma fase do desenvolvimento do biofilme em *S. aureus* e consiste na liberação coordenada de células após aproximadamente 6 horas do início do estágio de multiplicação do biofilme (MOORMEIER *et al.*, 2017). Logo em seguida, ocorre a etapa de maturação final da arquitetura do biofilme com a formação de microcolônias e intensa multiplicação celular e produção de matiz extracelular (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; STEWART & FRANKLIN, 2008). E por fim, a liberação das bactérias envoltas na matriz ocorre na fase de dispersão mediada pelo mecanismo de *Quorum sensing* (YARWOOD *et al.*, 2004; PERIASAMY *et al.*, 2012). Essas bactérias retornam então a forma de vida planctônica e passam a formar biofilme em outras superfícies (MIZDAL, 2014).

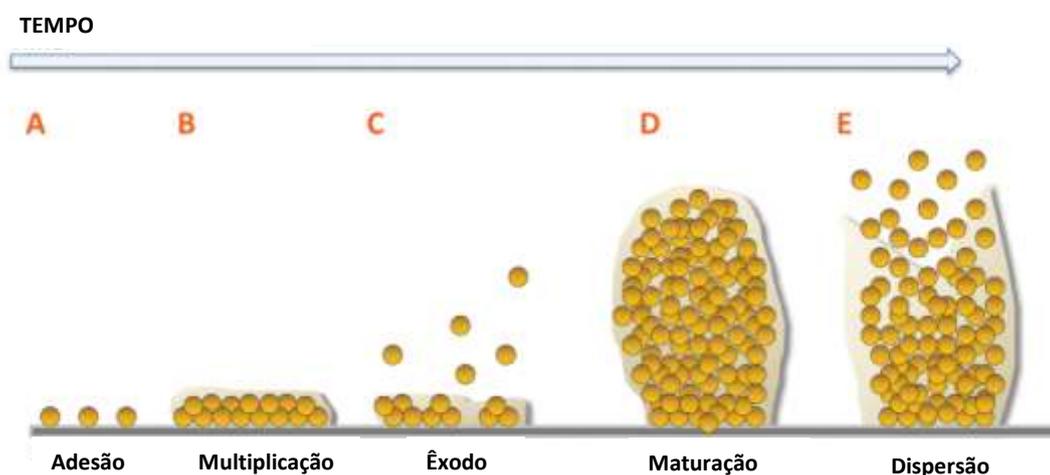


Figura1. Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano. **A.** Adesão das células planctônicas a uma superfície; **B.** Multiplicação bacteriana, formação de microcolônias e produção da matriz extracelular; **C.** Êxodo - liberação coordenada de células após aproximadamente 6 horas do início do estágio de multiplicação do biofilme; **D.** Maturação do biofilme com a formação de microcolônias; **E.** Dispersão das células que irão dar início a novos biofilmes mediada pelo mecanismo de *Quorum sensing*. Adaptado de (MOORMEIER *et al.*, 2017).

A formação do biofilme depende diretamente da combinação de fatores genéticos e ambientais (WOLSKA *et al.*, 2016). Dentre os fatores ambientais, destacam-se: fontes de nutrientes disponíveis, fatores estressantes à célula bacteriana, presença de antimicrobianos (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004), presença de glicose, etanol, além da ocorrência de altas temperaturas e osmolaridade (LIM *et al.*, 2004). Por outro lado, é

necessário a presença de informações genéticas e a expressão de um conjunto de genes específicos relacionados à regulação do desenvolvimento dos biofilmes para que a célula bacteriana produza esse complexo sistema (WOLSKA *et al.*, 2016).

Com relação ao tipo de biofilme existem dois grupos principais dentro do gênero *Staphylococcus*: aqueles classificados como “*ica*-dependentes” e os “*ica*-independentes”. Os biofilmes *ica*-dependentes, como o nome sugere, são biofilmes produzidos por bactérias que expressam um conjunto de genes que fazem parte do operon *ica*, responsáveis pela codificação do Polissacarídeo de Adesão Intracelular (PIA- *Polysaccharide Intercellular Adhesin*), molécula que geralmente está relacionada à formação de biofilme em espécies do gênero *Staphylococcus*. em especial *S. aureus* (WOLSKA *et al.*, 2016). O operon *ica* apresenta genes (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*) que vão ser responsáveis pela formação do PIA (O’GARA, 2007).

O gene *icaA* codifica a enzima N-acetilglicosamina transferase, responsável por sintetizar moléculas de N-acetilglicosamina, constituinte do PIA. O gene *icaD* atua ativando a enzima codificada pelo *icaA*, contribuindo com a produção de N-acetilglicosamina. Já a expressão do gene *icaC* juntamente com os genes *icaA* e *icaD* permitem a formação de polímeros de N-acetilglicosamina mais longos. O gene *icaB* é o menos conhecido, mas acredita-se que ele codifique uma desacetilase que remove grupamentos de acetila, fazendo com que as longas cadeias de N-acetilglicosamina fiquem carregadas positivamente (ARCIOLA *et al.*, 2005).

Já os biofilmes *ica*-independentes ocorrem sem a presença desse polissacarídeo de adesão intracelular. Nesses casos, outros componentes atuam na formação do biofilme, tais como a Proteína Associada ao Biofilme (*Biofilm Associated Protein – bap*) cuja função é promover a adesão célula a célula, assim como o eDNA liberado no início da formação desse processo (MANN *et al.*, 2009). Proteínas homologas também podem estar associadas à formação de biofilmes, como é o caso da Bhp produzida por estafilococos coagulase negativos (O’GARA, 2007). A Proteína associada à acumulação (Aap) produzida por *S. aureus* e sua homóloga SasG produzida por *S. epidermidis* também já foram associadas à formação de biofilmes nessas espécies (CHRISTNER *et al.*, 2010).

Apesar do mecanismo pelo qual ocorre a formação de biofilme, assim como as principais moléculas e vias de sinalização envolvidas nesse processo já terem sido descritas e elucidadas para espécies como *S. aureus* e *S. epidermidis*, pouco estudos são encontrados na literatura a respeito de bactérias de interesse clínico veterinário, como *S.*

pseudintermedius (SINGH *et al.*, 2013; PAHARIK; HORSWILL, 2016) e *S. schleiferi*, por exemplo.

Algumas pesquisas não encontraram uma relação significativa entre a presença dos genes *ica* e a formação de biofilme em *S. pseudintermedius* (SINGH *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015). Esses achados indicam que a relação entre os genes do operon *ica* e a formação de biofilme em *S. pseudintermedius* não está clara até o presente momento, e que mais estudos são necessários.

Do mesmo modo, apesar de existirem relatos na literatura da capacidade de formação de biofilme em *S. schleiferi* e *S. coagulans*, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais ocorre a formação de biofilme nessas espécies. Um estudo, realizado no Egito, para avaliação da formação de biofilme em estafilococos provenientes de carne bovina encontrou quatro amostras de *S. coagulans*, das quais duas foram consideradas formadoras de biofilme (OSMAN *et al.*, 2016).

Com relação a *S. schleiferi* já foi relatado a formação de biofilme nessa espécie, inclusive em amostras MRSS que exibiram capacidade elevada de formação biofilme quando comparado a amostras MSSS. Essa formação de biofilme durante a infecção do hospedeiro pode restringir o acesso de importantes antimicrobianos utilizados no tratamento, especialmente β -lactâmicos, propiciando a sobrevivência desses isolados MRSS por mais tempo levando a infecções persistentes (LEE *et al.*, 2019). Porém, nada se sabe sobre os mecanismos por trás da formação do biofilme nesta espécie e se o operon *ica* possui papel crucial nesta formação, sendo mais estudos necessários.

2.3 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS AOS ANTIMICROBIANOS

O primeiro grande marco global referente ao tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928 (apud NICOLAOU *et al.*, 2008). Porém, desde que a penicilina foi introduzida para a utilização na medicina em 1940, as espécies do gênero *Staphylococcus* dentre outras espécies bacterianas foram selecionadas em resposta a essa pressão (MORRIS, 2006). Nos anos seguintes a implementação da penicilina, diversas classes de antibióticos foram descobertas, muitas delas apresentando eficácia no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas tais como outros beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, dentre outros (FERNANDES, 2006).

De 1960 a 1980, antibióticos semissintéticos, análogos aos antibióticos naturais já existentes foram aos poucos sendo introduzidos como as penicilinas semissintéticas (por exemplo, a meticilina e a oxacilina), que permitiram o tratamento de infecções estafilocócicas. Apesar disso, pouco tempo depois, já foram relatadas amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (methicillin resistant *S. aureus* – MRSA) (MEHNDIRATA *et al.*, 2009; FRENCH, 2010).

Com o passar dos anos as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência antimicrobiana (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Atualmente a resistência aos antimicrobianos é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um problema de saúde pública (WHO, 2017). Essa questão vem sendo monitorada de perto pela OMS assim como pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e demais órgãos governamentais nacionais e internacionais (OLIVEIRA & SILVA, 2008). Só nos Estados Unidos, a cada ano mais de 2,8 milhões de pessoas adquirem infecções por bactérias multirresistentes a antibióticos, resultando em mais de 35.000 mortes (WHO, 2019). A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural que ocorre de forma espontânea (GUIMARÃES *et al.*, 2010). A rapidez com que microrganismos resistentes surgem e se disseminam pode ser associada ao uso incorreto dos antimicrobianos e a seleção promovida por esses fármacos (ARIAS & CARRILHO, 2012).

Somado a esse fato, segundo a OMS, a queda do investimento privado e a falta de inovação no desenvolvimento de novos antibióticos estão minando os esforços para combater as infecções resistentes à medicamentos (WHO, 2019). Segundo o relatório de desenvolvimento clínico antibacteriano de 2019, 60 produtos entre antibióticos e produtos biológicos estão em desenvolvimento atualmente e poucos trazem benefícios sobre os tratamentos já existentes e muito poucos tem como alvo bactérias resistentes mais críticas (WHO, 2019). Diante desse cenário desanimador, estudos com plantas como fonte de novas opções terapêuticas para responder ao problema da resistência aos antimicrobianos utilizados na clínica vem se intensificando e ganhando espaço em muitas pesquisas (ROZATTO, 2012).

Historicamente, diversas civilizações como os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos e chineses são conhecidas pela utilização de plantas objetivando a promoção e

manutenção da saúde. O uso dessas plantas medicinais é baseado no conhecimento popular, sendo, muitas vezes transmitidos de geração em geração, como parte de cultura. Esse conhecimento acumulado durante séculos continua sendo valioso para as gerações atuais (BALUNAS & KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005; FERNANDES, 2014).

Aproximadamente 10% das plantas existentes no planeta são utilizadas para fins medicinais e / ou manutenção da saúde (MIRANDA *et al.*, 2015; WFO, 2019). O Brasil, por ser um país com um número estimado acima de 20% do número total de espécies do planeta possui longa aceitação do uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (CARVALHO *et al.*, 2007).

As plantas medicinais possuem princípios ativos, ou seja, compostos químicos produzidos durante o seu metabolismo, que lhe conferem ação terapêutica (WAGNER; WISENAUER, 2006). Esses compostos, geralmente possuem boa atividade microbiana, baixo peso molecular e baixa toxicidade celular, sendo fortes candidatos a novos antimicrobianos (MIRANDA *et al.*, 2015). Extratos brutos obtidos de plantas já demonstraram ação anticancerígena, antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória em modelos experimentais (OLIVEIRA, 2006). Essa atividade é maior ou menor em função da composição de cada extrato e da bactéria testada (LEAL, 2016). Contudo muitos princípios ativos permanecem desconhecidos, sendo necessários mais estudos com produtos de origem vegetal com o intuito de se avaliar o potencial farmacológico destas plantas (CALIXTO, 2003; NAPOLITANO *et al.*, 2005).

2.3.1 *Hypericum brasiliense*

O gênero *Hypericum* é composto por cerca de 450 espécies, dentre as quais 17 ocorrem no Brasil, com predominância nas Regiões Sul e Sudeste (ROBSON, 1990; CARVALHO *et al.*, 2003). Esse gênero apresenta espécies cultivadas como ornamentais (SOUZA & LORENZI, 2005) e outras mais conhecidas por serem utilizadas em fitoterapia e na medicina popular, com propriedades adstringentes, analgésicas, diuréticas e antidepressivas (GALEOTTI, 2017). Uma das espécies mais conhecidas e importantes desse gênero é *H. perforatum*, popularmente conhecida como erva de São João. Além do *H. perforatum* outras espécies possuem destaque por possuírem atividade antimicrobiana comprovada em testes *in vitro* como é o caso de *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* (RABANAL *et al.*, 2002) e *H. brasiliense* que vem sendo bastante estudada

por sua composição fitoquímica e por suas atividades biológicas conhecidas até o momento (ROCHA *et al.*, 1995; LIALYZ, 2017).

Conhecida popularmente como orelha de gato, alecrim bravo, mil facadas e mil furadas, *Hypericum brasiliense* (Figura 2) é uma espécie nativa, não endêmica do Brasil, predominante nas regiões Sul e Sudeste do país (ROBSON, 1990). No estado do Rio de Janeiro, já foi encontrada na região serrana, no município de Nova Friburgo (ROCHA *et al.*, 1991).

Já foram isolados dessa planta, diversas classes de substâncias químicas que acredita-se serem as responsáveis pelas propriedades analgésica, antidepressiva, antifúngica e antibacteriana demonstradas por essa espécie (CARVALHO *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 1994). Além disso, *H. brasiliense* é utilizada popularmente como uma planta medicinal conhecida por suas propriedades adstringente, aromáticas, excitante, antiespasmódica, antiofídica e no combate de aftas e estomatite (JIMÉNEZ, 1980; ROCHA, 1994; LORENZI & ABREU MATOS, 2002).



Figura2. Fotografia da planta inteira de *Hypericum brasiliense*. Fonte: flora digital da Universidade Federal De Santa Catarina.

Dentre as substâncias isoladas de *H. brasiliense*, os flavonóides, as xantonas e os floroglucínóis são os que possuem maior destaque e importância (ROCHA *et al.*, 1995, 1996; PERAZZO *et al.*, 2008). As xantonas encontradas nessa espécie apresentam propriedade de inibição sobre a enzima monoamina oxidase (MAO), além de atividade

antifúngica e antibacteriana em modelo *in vitro* (PERAZZO *et al.*, 2008). Os flavonóides glicosídicos quercitrina, isoquercitrina, guaijaverina e hiperos'ideo; e as agliconas luteolina, canferol e quercetina também já foram isolados (ROCHA *et al.*, 1995).

Com relação aos floroglucínóis, a partir da fração hexânica do extrato de *H. brasiliense*, já foram isolados hiperbrasilol-A, hiperbrasilol-B, isohiperbrasilol-B, hiperbrasilol C, isouliginosina B, japonicina e uliginosina A, os quais, com significativos efeitos farmacológicos, acredita-se serem os responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada por essa espécie (ROCHA *et al.*, 1995).

Estudos anteriores evidenciaram, a atividade bactericida e bacteriostática do extrato de *Hypericum brasiliense* contra um isolado clínico de *Staphylococcus aureus* multirresistente e forte formador de biofilme (PEREIRA *et al.*, 2021). Outro estudo elaborado por Caldas em 2018 observou a ação da nano emulsão do extrato de *H. brasiliense* no combate a biofilme maduro de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Esses achados apontam o potencial uso terapêutico dessa espécie de planta para o tratamento de infecções estafilocócicas. Entretanto, não se observa na literatura relatos de estudos com espécies de estafilococos encontrados em pacientes veterinários potencialmente zoonóticas como *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. schleiferi*.

A resistência é um problema global de saúde pública, juntamente com a ausência de novos antimicrobianos no mercado. Somado a esses dois fatores, os biofilmes bacterianos contribuem ainda mais ao permitir que bactérias patogênicas resistentes persistam no hospedeiro, mesmo na presença de antimicrobianos. Desse modo, ao longo dos últimos anos, tem-se observado o aumento de investimentos em estudos *in vivo* e *in vitro* com relação a possíveis propriedades antimicrobianas encontradas em plantas como uma possível alternativa ao problema em questão. Visto que o extrato de *H. brasiliense* vem apresentando resultados significativos ao combate de biofilme em cepas estafilocócicas de espécimes clínicos humanos, estudos que se propõem a estudar os possíveis efeitos antimicrobianos e antibiofilme do extrato de *H. brasiliense* frente a cepas veterinárias potencialmente zoonóticas se fazem necessários e importantes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme *in vitro* do extrato de *Hypericum brasiliense* frente às amostras de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus coagulans* e *Staphylococcus schleiferi*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato de *Hypericum brasiliense* para cada um dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus coagulans* isoladas de cães.
2. Verificar a capacidade de atuação do extrato de *Hypericum brasiliense* na inibição do biofilme em formação, pré formado jovem e pré formado maduro nas cepas bacterianas de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus coagulans* formadoras de biofilme.
3. Analisar a proliferação do biofilme em formação das cepas bacterianas de *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus coagulans* tratadas com o extrato de *Hypericum brasiliense* através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras biológicas utilizadas no presente estudo pertencem à coleção do Laboratório de Cocos Gram Positivos (LCGP), da Universidade Federal Fluminense (UFF). Esta coleção foi formada a partir de amostras coletadas de cães atendidos em clínicas veterinárias localizadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. Para este estudo, foram selecionadas três amostras bacterianas, sendo uma da espécie *Staphylococcus pseudintermedius* (ED99), uma *Staphylococcus schleiferi* (SD42) e uma *Staphylococcus coagulans* (SD84) para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antibiofilme. O perfil de resistência assim como a classificação das amostras quanto à formação de biofilme foram previamente traçados em estudos anteriores (TEIXEIRA *et al.*, 2019). As informações referentes às amostras utilizadas neste trabalho estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das cepas bacterianas utilizadas no estudo.

Sigla	Cepa bacteriana	Origem	Formação de Biofilme	Perfil de Resistência
SD84	<i>Staphylococcus coagulans</i>	Otite canina	Forte produtor	¹ TET ² (R)
ED99	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Piodermite canina	Forte produtor	³ n.d
SD42	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	Otite canina	Forte produtor	⁴ TOB ² (R)

Legenda: ¹TET- Tetraciclina, ² R – Resistente, ³n.d – não determinado, ⁴TOB- Tobramicina.

4.2 LOCAL DE COLETA E PREPARO DO EXTRATO DE *Hypericum brasiliense*

A planta inteira de *H. brasiliense* foi coletada no dia 14/02/2013, na Região Serrana de Trajano de Moraes, município localizado no Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro, entre as coordenadas 22° 12' 17" latitude Sul e 43° 11' 35" Oeste. Foi realizada uma exsicata (RB00819157) depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. O extrato de *H. brasiliense* foi processado no Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN) e gentilmente cedido pelo professor Leandro Machado Rocha para a elaboração desse projeto.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *Hypericum brasiliense*

4.3.1 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Para este teste, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo seriada em diferentes concentrações (512 µg/mL a 4 µg/mL), utilizando microplaca (TPP) com 96 poços de poliestireno estéril. O teste foi realizado em triplicata, com três réplicas técnicas e duas amostras por placa.

2,5mg do extrato de *H. brasiliense* foi diluído 250 µL em dimetilsulfóxido (DMSO - Proquímios, RJ-Brasil). Para o controle positivo foi utilizado o antimicrobiano vancomicina, inicialmente 1µg de vancomicina foi diluída em 1000 µL de DMSO para a produção do estoque denominado de VancoA. Posteriormente 80 µL de VancoA foi diluído em 420 µL de DMSO para a produção do estoque de VancoB, que foi então utilizado na elaboração dos experimentos de CMI.

Foi realizada a técnica de esgotamento de cada inóculo bacteriano a ser testado, em placa de Ágar Triptona de Soja (ATS), incubada por 24 horas a 37 °C.

Na placa de 96 poços de poliestireno (Figura 3), foi adicionado 180 µL de meio ágar infusão de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion) nos poços 1, 2, 4, 6, 7 e 9 da fileira A e completado as respectivas colunas com 100 µL do meio. Na coluna 12 foi adicionado 100 µL de meio BHI em todos os poços (Branco) e nas colunas 3 e 8 foi adicionado 100 µL de BHI nos poços A, B, C e D e nos poços E, F, G e H, foi adicionado 90 µL de BHI e 10 µL de DMSO para o controle de esterilidade.

Nos poços 1A, 2A, 6A e 7A foi adicionado 20 µL da substância teste diluída, logo em seguida, 100 µL dos respectivos poços foram transferidos para os poços 1B, 2B, 6B e 7B. Esse procedimento foi repetido sucessivamente até a linha H, descartando-se os últimos 100 µL. No poço 4A e 9A foi aplicado 20 µL de VancoB, sendo procedida a diluição seriada, transferindo 100 µL para os poços 4B e 9B e assim sucessivamente, descartando os últimos 100 µL.

Após o tempo de incubação, foi realizado o ajuste da concentração do inóculo bacteriano para 0,5 na escala McFarland. Posteriormente, 100 µL de cada inóculo foi aplicado nas colunas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9. A placa então foi levada a estufa a 37°C por 24 horas.

Após a incubação, em cada poço foi adicionado 15 µL do corante Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) diluída em água estéril a 0,01% (Sigma, US), e

a placa incubada novamente por 1 hora. Passado este período foi realizada a leitura visual da placa, onde a cor púrpura indica ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa a presença de células viáveis (PEREIRA *et al.*, 2021).

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	512µg/mL	512µg/mL				512µg/mL	512µg/mL					
B	256µg/mL	256µg/mL				256µg/mL	256µg/mL					
C	128µg/mL	128µg/mL				128µg/mL	128µg/mL					
D	64 µg/mL	64 µg/mL				64 µg/mL	64 µg/mL					
E	32 µg/mL	32 µg/mL				32 µg/mL	32 µg/mL					
F	16 µg/mL	16 µg/mL				16 µg/mL	16 µg/mL					
G	8 µg/mL	8 µg/mL				8 µg/mL	8 µg/mL					
H	4 µg/mL	4 µg/mL				4 µg/mL	4 µg/mL					

Figura 3: Esquema da placa para observação da concentração mínima inibitória do extrato de *Hypericum brasiliense*. Colunas 1, 2, 6 e 7: extrato de *H. brasiliense* + inóculo bacteriano; coluna 3 e 8, linhas A, B, C e D: controle negativo (meio BHI e inóculo bacteriano); coluna 3 e 8, linhas E, F, G e H: meio BHI, DMSO e inóculo bacteriano; coluna 4 e 9: controle positivo (vancomicina + inóculo bacteriano); coluna 12: branco (meio de cultura BHI);

4.3.2 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Para determinação da CMB, após o período de incubação da CMI e antes da adição da solução de resazurina, foi retirado 1µL de cada poço da placa de 96 poços, com auxílio de uma pipeta com ponteira estéril e estes foram semeados em spots em placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton, incubados a 37 °C por 24 horas (Figura 4), sendo posteriormente observadas a presença ou ausência de crescimento bacteriano (PEREIRA *et al.*, 2021).

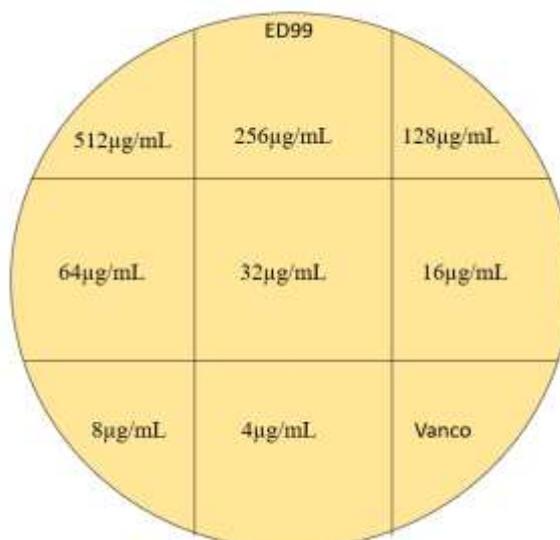


Figura 4 Esquema da placa Petri para observação da concentração mínima bactericida do *Hypericum brasiliense*. Cada quadrante apresenta uma diluição da substância teste no inóculo após 24 h de incubação à 37 °C.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE *Hypericum brasiliense*

A atuação do extrato sobre o biofilme foi avaliada em três momentos: em formação, pré formado jovem e pré formado maduro. As concentrações do extrato utilizadas neste ensaio foram determinadas pelo valor da CMI, $\frac{1}{2}$ CMI, $\frac{1}{4}$ CMI e $\frac{1}{8}$ CMI para o biofilme em formação e 2X CMI, CMI, $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI para o biofilme pré-formado jovem e maduro. Todos os experimentos de biofilme em formação, pré-formado jovem e pré-formado maduro, foram realizados em triplicata e com três réplicas técnicas. Os valores das réplicas utilizadas para a elaboração dos gráficos encontram-se no apêndice 1. O esquema da microplaca para a avaliação do efeito do extrato de *H. brasiliense* sob o biofilme, realizada neste estudo, está presente na Figura 5.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	CMI	½ CMI	¼ CMI	1/8 CMI	CN			CN	CMI	½ CMI	¼ CMI	1/8 CMI
B	CMI	½ CMI	¼ CMI	1/8 CMI	CN			CN	CMI	½ CMI	¼ CMI	1/8 CMI
C	CMI	½ CMI	¼ CMI	1/8 CMI	CN			CN	CMI	½ CMI	¼ CMI	1/8 CMI
D	CMI Vanco	½ CMI Vanco	¼ CMI Vanco	1/8 CMI Vanco	Branco Vanco			Branco Vanco	CMI Vanco	½ CMI Vanco	¼ CMI Vanco	1/8 CMI Vanco
E	CMI Vanco	½ CMI Vanco	¼ CMI Vanco	1/8 CMI Vanco	Branco Vanco			Branco Vanco	CMI Vanco	½ CMI Vanco	¼ CMI Vanco	1/8 CMI Vanco
F	CMI Vanco	½ CMI Vanco	¼ CMI Vanco	1/8 CMI Vanco	Branco Vanco			Branco Vanco	CMI Vanco	½ CMI Vanco	¼ CMI Vanco	1/8 CMI Vanco
G	Branco HY	Branco HY	Branco HY	Branco HY	Branco Vanco			Branco Vanco	Branco HY	Branco HY	Branco HY	Branco HY
H	Branco HY	Branco HY	Branco HY	Branco HY					Branco HY	Branco HY	Branco HY	Branco HY

Figura 5: Esquema da placa para realização da técnica de biofilme em formação, pré formado jovem e maduro. Colunas 1, 2, 3 e 4 com fileira A, B e C: extrato de *H. brasiliense* com amostra 1; Colunas 9, 10, 11 e 12 com fileira A, B e C: extrato de *H. brasiliense* com amostra 2; Coluna 5 e 8 com fileiras A, B e C: controle negativo (meio BHI, DMSO e inóculo bacteriano); Colunas 1, 2, 3 e 4 com fileira D, E e F: VancoA com amostra 1 (controle positivo); Colunas 9, 10, 11 e 12 com fileira D, E e F: VancoA com amostra 2 (controle positivo). Coluna 5 e 8 com fileira D, E e F: VancoA com meio BHI (branco vanco); Coluna 1, 2, 3 e 4 com fileira G e H: *H. brasiliense* com meio BHI (branco *Hypericum*); Coluna 9, 10, 11 e 12 com fileira G e H: *H. brasiliense* com meio BHI (branco *Hypericum*).

4.4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO SOB O BIOFILME EM FORMAÇÃO

Este ensaio foi realizado seguindo o protocolo descrito por Pinheiro e colaboradores (2020), onde o tratamento das cepas com o extrato foi realizado quando ainda não existia nenhuma formação do biofilme. Amostras bacterianas foram semeadas por esgotamento em ATS e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Decorrido este tempo, uma colônia de cada amostra bacteriana foi introduzida em 2 mL de BHI com 1% de glicose e incubada sob agitação vigorosa (150-200 rpm) por 20 horas.

No dia seguinte, foi feita a diluição de 200 µL de cada um dos inóculos em 19.800 µL de BHI glicosado (1:100). Em seguida, o extrato de *H. brasiliense* e o antimicrobiano Vancomicina (VancoA) foram diluídos nas concentrações equivalentes a CMI, ½ CMI, ¼ CMI e 1/8 CMI utilizando como veículo o inóculo 1:100, e nas mesmas concentrações, porém, utilizando BHI estéril como veículo (branco de cada substância em cada

concentração). Como controle negativo (C-) foi utilizado 975 µL do inóculo (1:100) e 25 µL de DMSO.

Utilizando microplacas com 96 poços (placa 1), foi aplicado 200 µL de cada concentração da substância teste e VancoA diluídos, em três poços (triplicata) da placa, do mesmo modo também foi aplicado o controle negativo (figura 5). A placa então foi incubada a 37 °C por 24 horas. Passado este período, procedeu-se uma primeira leitura do crescimento em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm de comprimento de onda (leitura 1). Em seguida foi realizada a remoção cuidadosa da cultura celular (sobrenadante), seguida de duas lavagens delicadamente com água destilada estéril. Após as lavagens, foi feita a fixação do biofilme a 70 °C em estufa de secagem por aproximadamente 1:30 h. A biomassa aderida foi corada com 150 µL de solução aquosa de cristal violeta genciana a 0,1%, adicionada em cada poço, mantida em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois, o corante foi desprezado e a placa foi lavada na pia na posição vertical (90° em relação ao plano) e seca em estufa de secagem a 70 °C por aproximadamente 1:30h. Após a secagem, foram adicionados 200 µL de álcool a P.A em cada poço e a placa mantida em temperatura ambiente, sem agitar, durante 30 minutos, em seguida, procedeu-se a leitura em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm (leitura 2). Para a redução de erros de leitura e padronização, em uma nova placa (placa 2) de 96 poços, foi aplicado 180 µL de água destilada em cada poço e em seguida foi retirado 20 µL do poço correspondente da placa 1 e introduzido no poço correspondente na placa 2, seguindo de uma nova leitura em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm (leitura 3).

4.1.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO SOB O BIOFILME PRÉ-FORMADO JOVEM

O tratamento das cepas com o extrato foi feito no biofilme recém-formado jovem (estágio de formação inicial do biofilme). As amostras bacterianas foram ativadas em ATS e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Em seguida, uma colônia de cada amostra bacteriana foi introduzida em 2mL de BHI com 1% de glicose e incubada sob agitação vigorosa (150-200rpm) por 20 horas. No dia seguinte, foi feita a diluição de 200 µL de cada um dos inóculos em 19.800 µL de BHI glicosado (1:100). Utilizando microplacas com 96 poços (placa 1), foi aplicado 200 µL de cada inóculo diluído 1:100 e de BHI puro (controle), seguindo de incubação a 37 °C por 6 horas. O extrato de *H. brasiliense* e a VancoA foram diluídos nas concentrações equivalentes a 2X CMI, CMI,

½ CMI e ¼ CMI utilizando BHI estéril como veículo. Como controle negativo (C-) foi utilizado 975 µL do inóculo (1:100) e 25 µL de DMSO. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado delicadamente dos poços da placa, seguido da aplicação de 200 µL em cada poço, da substância teste, Vanco A e meio de cultura puro de acordo com o esquema da figura 5. A placa então foi incubada novamente a 37 °C por 24 horas. Após, foi realizada a remoção cuidadosa da cultura celular (sobrenadante), seguida de duas lavagens delicadamente com água destilada estéril. Após as lavagens, foi feita a fixação do biofilme a 70 °C em estufa de secagem por aproximadamente 1:30 h. A biomassa aderida foi corada com 150 µL de solução aquosa de cristal violeta genciana a 0,1%, adicionada em cada poço, mantida em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois, o corante foi desprezado e a placa foi lavada na pia em pé (90° em relação ao plano) e seca em estufa de secagem a 70 °C por aproximadamente 1:30h. Após a secagem, foram adicionados 200 µL de álcool a P.A em cada poço e a placa mantida em temperatura ambiente, sem agitar, durante 30 minutos, em seguida, procedeu-se a leitura em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm (leitura 1).

Para a redução de erros de leitura e padronização, em uma nova placa (placa 2) de 96 poços, foi aplicado 180 µL de água destilada em cada poço e em seguida foi retirado 20 µL do poço correspondente da placa 1 e introduzido no poço correspondente na placa 2, seguindo de uma nova leitura em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm (leitura 2) (PINHEIRO *et al.*, 2020).

4.1.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO SOB O BIOFILME PRÉ - FORMADO MADURO

Para este ensaio, seguiu-se o protocolo descrito por Pierce e colaboradores (2008), com adaptações. O ensaio com o biofilme consolidado avaliou a atuação do extrato em biofilme totalmente formado. As amostras bacterianas foram ativadas em ATS e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Em seguida, uma colônia de cada amostra bacteriana foi introduzida em 2mL de BHI com 1% de glicose e incubada sob agitação vigorosa (150-200rpm) por 20 horas. No dia seguinte, foi feita a diluição de 200 µL de cada um dos inóculos em 19.800 µL de BHI glicosado (1:100). Utilizando microplacas com 96 poços (placa1), foi aplicado 200 µL de cada inóculo diluído 1:100 e de BHI puro (controle), seguindo de incubação a 37 °C por 24 horas. O extrato de *H. brasiliense* e a Vanco A foram diluídos nas concentrações equivalentes a 2X CMI, CMI,

½ CMI e ¼ CMI utilizando BHI estéril como veículo. Como controle negativo (C-) foi utilizado 975 µL do inóculo (1:100) e 25 µL de DMSO. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado delicadamente dos poços da placa, seguido da aplicação de 200 µL em cada poço, da substância teste, Vanco A e meio de cultura puro de acordo com o esquema da figura 5. A placa então foi incubada novamente a 37 °C por 24 horas. Decorrido este tempo, foi realizada a remoção cuidadosa da cultura celular (sobrenadante), seguida de duas lavagens delicadamente com água destilada estéril. Após as lavagens, foi feita a fixação do biofilme a 70 °C em estufa de secagem por aproximadamente 1:30 h. A biomassa aderida foi corada com 150 µL de solução aquosa de cristal violeta genciana a 0,1%, adicionada em cada poço, mantida em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois, o corante foi desprezado e a placa foi lavada na pia em pé (90° em relação ao plano) e seca em estufa de secagem a 70 °C por aproximadamente 1:30h. Após a secagem, foram adicionados 200 µL de álcool a P.A em cada poço e a placa mantida em temperatura ambiente, sem agitar, durante 30 minutos, em seguida, procedeu-se a leitura em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm (leitura 1) (PINHEIRO *et al.*, 2020).

Para a redução de erros de leitura e padronização, em uma nova placa (placa 2) de 96 poços, foi aplicado 180 µL de água destilada em cada poço e em seguida foi retirado 20 µL do poço correspondente da placa 1 e introduzido no poço correspondente na placa 2, seguindo de uma nova leitura em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm (leitura 2).

4.2 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DO BIOFILME

A análise da proliferação do biofilme foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Pereira *et al.* (2011). As amostras utilizadas neste estudo foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Após este período, duas colônias de cada amostra foram suspensas em solução fisiológica estéril de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e ajustadas para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / mL). As amostras foram colocadas em 8 poços de uma placa de 24 poços (contendo discos de vidro no fundo de cada poço), com 950 µL de caldo BHI suplementado com glicose a 1% e 50 µL da suspensão bacteriana (controle negativo) e 8 poços com 950 µL de caldo BHI suplementado com glicose a 1%, extrato de *H. brasiliense* nas concentrações CMI referentes a cada uma das amostras bacterianas e 50 uL da suspensão bacteriana a 0,5 na escala de McFarland (grupo com tratamento). As amostras foram incubadas a 37 °C por

24 h, e após esse período, 6 discos contendo as amostras foram lavados assepticamente com 2 mL de solução fisiológica estéril e colocados em tubos com 10 mL de solução fisiológica estéril e sonicados (Cuba de ultrassom CRISTÓFOLI) por 30 segundos para dispersar os biofilmes. Considerou-se que a suspensão tinha um fator de diluição de 10^{-1} e foi diluída com a adição de solução fisiológica estéril a até 10^{-8} . Alíquotas de 10 μ L foram semeadas em placas de BHI ágar e incubadas por 24 h a 37°C. O número de colônias foi contado, calculado em UFC / mL e transformado em Log_{10} . Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dois discos restantes de cada teste foram encaminhados para a microscopia eletrônica de varredura.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para ilustrar biofilmes formados pelas amostras nos discos de vidro descritos no item 4.2. Os discos tratados com *H. brasiliense*, correspondentes a etapa de biofilme em formação, também foram submetidos a MEV. Os discos foram fixados por 1 h em glutaraldeído a 2,0% e desidratados em várias lavagens com etanol (10, 25, 50, 75 e 90% por 20 minutos e 100% por 1 h). As amostras foram secas durante a 24h a 37 ° C e, posteriormente, foram revestidos com ouro em atmosfera de baixa pressão com um revestimento de pulverização de íons. As topografias de superfície dos biofilmes foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss® Evo MA 15) (PEREIRA *et al.*, 2021).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados referentes ao ensaio de antibiofilme e proliferação do biofilme foram apresentados como: média \pm desvio padrão. O desvio padrão está representado no gráfico pelas barras de erro. Para avaliação dos dados do tratamento com o extrato foi feita análise estatística utilizando o teste t não pareado ($p < 0,05$) disponível no software GraphPad Prism 8.0.2. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados com diferenças estatisticamente significativas. Os gráficos foram elaborados usando o programa GraphPad Prism 8.0.2.

5. RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA E DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA

O resultado da concentração mínima inibitória observado para a amostra de *S. pseudintermedius* (ED99) foi de 8µg / mL enquanto que para as amostras de *S. schleiferi* (SD 42) e *S. coagulans* (SD84), ambas as espécies obtiveram valor de CMI de 32µg / mL. Com relação a concentração mínima bactericida (CMB), o resultado observado na amostra de *S. pseudintermedius* (ED99) foi de 32µg / mL enquanto as amostras de *S. schleiferi* (SD42) e *S. coagulans* (SD84) obtiveram como CMB o valor de 256 µg / mL. O controle positivo, vancomicina, apresentou a faixa de valor definido pelo CLSI, de 2 µg/mL para a amostra *S. pseudintermedius* (ED99) (CLSI, 2018) e 4 µg/mL para *S. schleiferi* (SD42) e *S. coagulans* (SD84) (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) do extrato de *Hypericum brasiliense* e Vancomicina frente as amostras de *Staphylococcus coagulans*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi*.

AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO	<i>Hypericum brasiliense</i>		Vancomicina
		CMI	CMB	CMI
SD84	<i>Staphylococcus coagulans</i>	32 µg/mL	256 µg/mL	4 µg/mL
ED99	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	8 µg/mL	32 µg/mL	2 µg/mL
SD42	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	32 µg/mL	256 µg/mL	4 µg/mL

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE *Hypericum brasiliense*

5.2.1 ENSAIO ANTIBIOFILME EM FORMAÇÃO

O extrato hexânico de *H. brasiliense* demonstrou capacidade em reduzir a formação do biofilme dos três isolados (ED99, SD84 e SD42) em todas as concentrações testadas (CMI, $\frac{1}{2}$ CMI, $\frac{1}{4}$ CMI e $\frac{1}{8}$ CMI), quando comparado ao controle negativo (p valor $< 0,000001$) (Figuras 6, 7 e 8).

No que se refere à capacidade de atuação do antimicrobiano Vancomicina, houve redução significativa da formação do biofilme na concentração de CMI para amostra de *S. pseudintermedius* ED99 (p valor $< 0,000001$) e todas as concentrações testadas para a amostra *S. schleiferi* SD42 (p valor $< 0,05$) quando comparada ao grupo controle, sem tratamento. Entretanto, com relação a amostra *S. coagulans* SD84, foi possível observar o estímulo proporcional a concentração da Vancomicina na formação do biofilme.

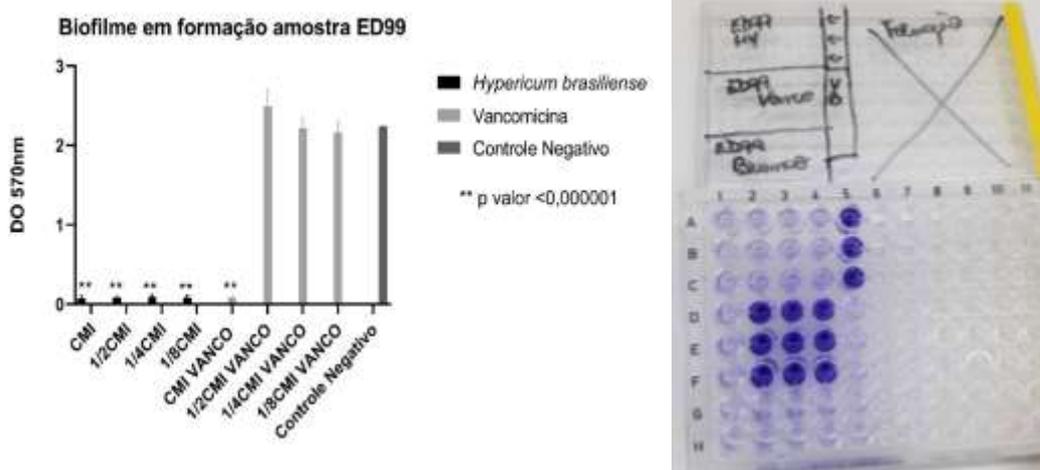


Figura 6: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme em formação de *Staphylococcus pseudintermedius* amostra ED99, comparada ao controle negativo (meio BHI+ inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

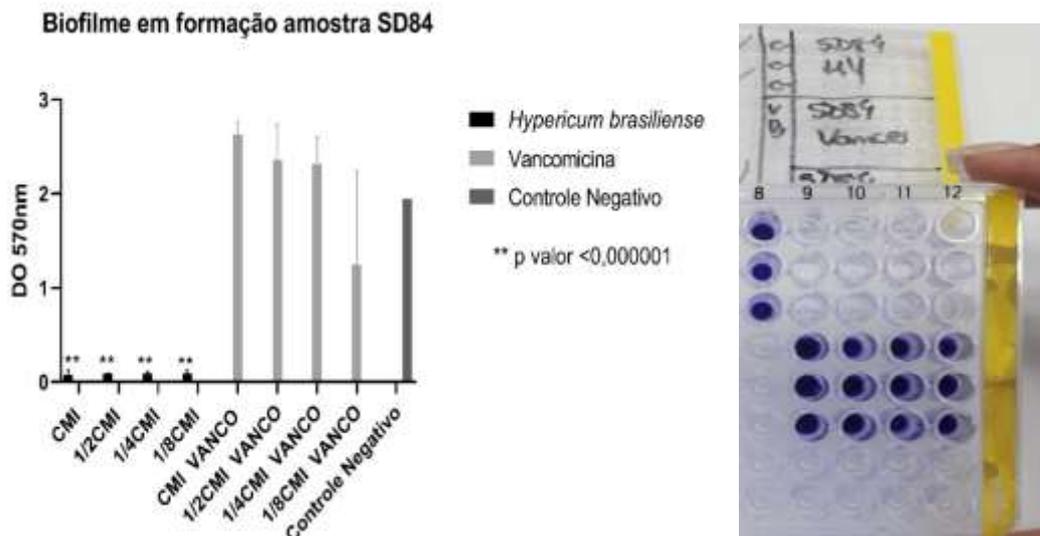


Figura 7: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme em formação de *S. coagulans* amostra SD84, comparada ao controle negativo (meio BHI + inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

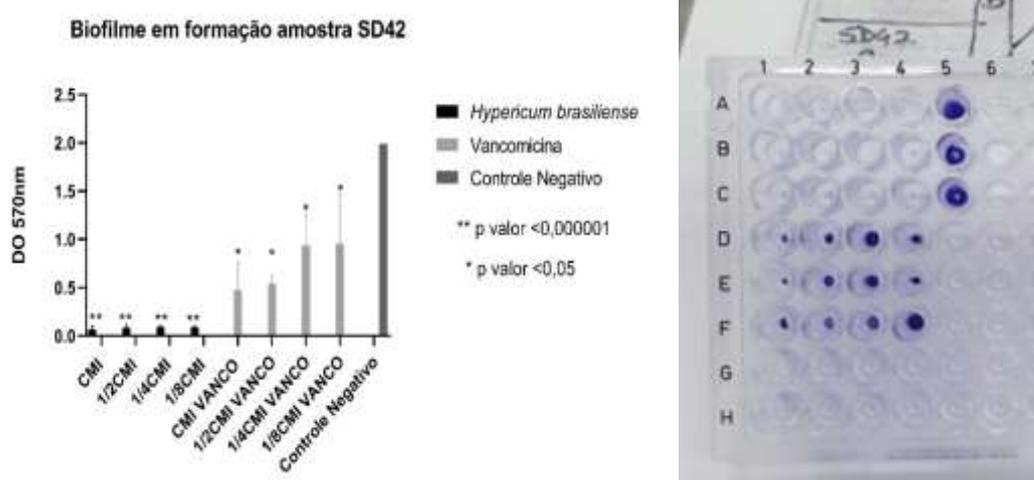


Figura 8: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme em formação de *S. schleiferi* amostra SD42, comparada ao controle negativo (meio BHI + inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

5.2.2 ENSAIO ANTIBIOFILME PRÉ FORMADO JOVEM

Em relação à capacidade de atuação do extrato de *H. brasiliense* sobre o biofilme pré formado jovem de 6 horas, o extrato de *H. brasiliense* apresentou atividade frente à amostra de *S. pseudintermedius* ED 99 com redução estatisticamente significativa (p valor < 0,0001), em todas as concentrações testadas (2X CMI, CMI ½ CMI e ¼ CMI) quando comparado com o controle negativo (sem tratamento) (Figura 9). Com relação à capacidade de atuação do antimicrobiano vancomicina, houve redução significativa da formação do biofilme na concentração de 2xCMI para amostra de *S. pseudintermedius* ED99 (p valor < 0,0001) quando comparado com o controle negativo (sem tratamento).

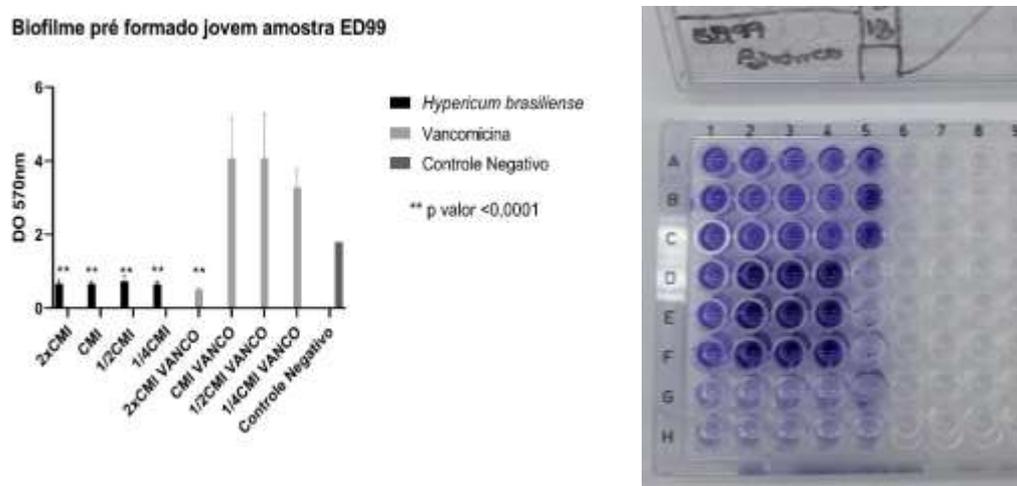


Figura 9: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme pré-formado jovem de *Staphylococcus pseudintermedius* amostra ED99, comparada ao controle negativo (meio BHI+ inóculo) e ao antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

No que se refere à capacidade de atuação do extrato sobre a amostra de *S. coagulans* SD84 e a amostra de *Staphylococcus schleifeiri* SD 42 foi possível observar redução estatisticamente significativa (p valor < 0,005) do biofilme pré formado jovem em todas as concentrações testadas (2X CMI, CMI ½ CMI e ¼ CMI) quando comparado com o controle negativo (sem tratamento) (figura 10 e 11). Já com relação ao antimicrobiano vancomicina, não foi possível observar sua atuação na inibição do biofilme formado por ambas as amostras, de maneira significativa.

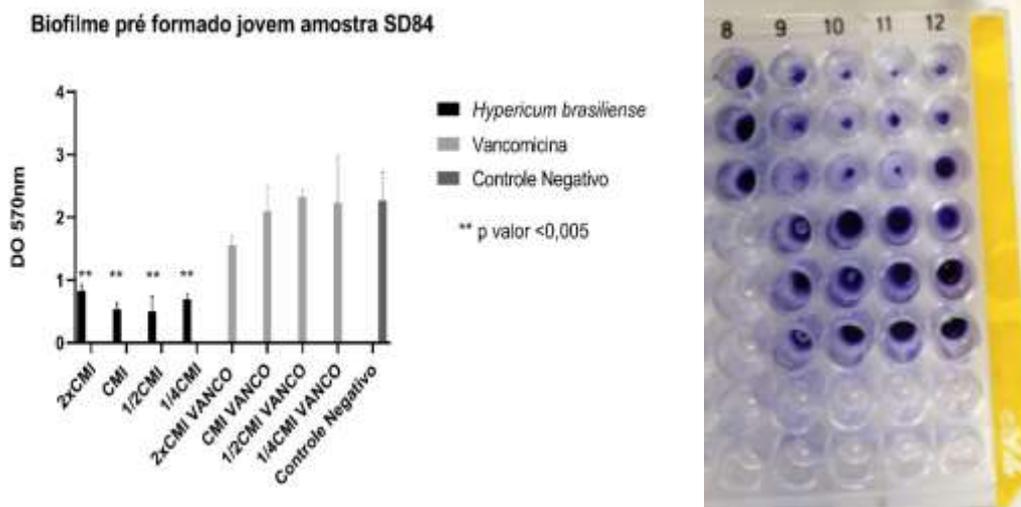


Figura 10: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme pré formado jovem de *S. coagulans* amostra SD84, comparada ao controle negativo (meio BHI + inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

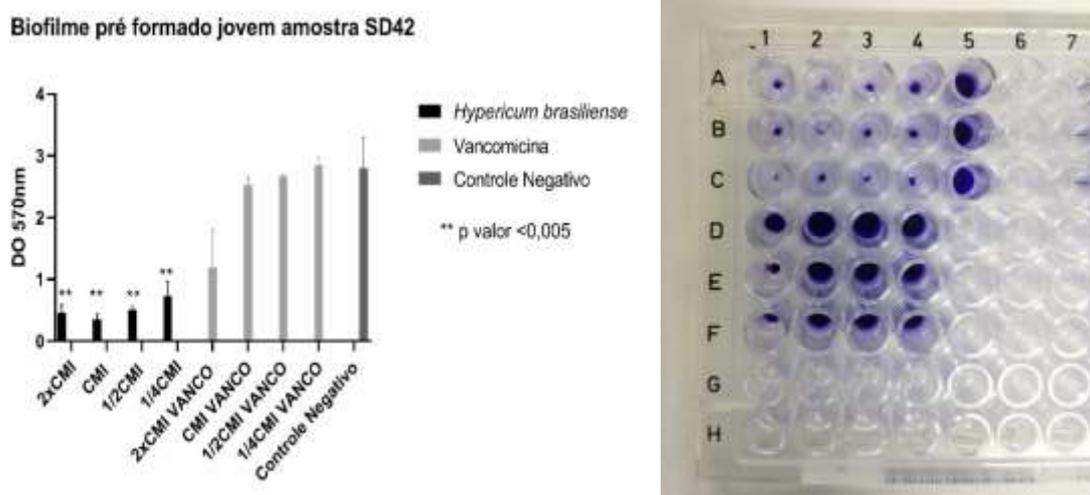


Figura 11: Atividade do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme pré formado jovem de *S. schleiferi* amostra SD42, comparada ao controle negativo (meio BHI + inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

5.2.3 ENSAIO ANTIBIOFILME PRÉ FORMADO MADURO

A capacidade de atuação do extrato de *H. brasiliense* sobre o biofilme maduro de 24 horas da amostra de *S. pseudintermedius* ED99 foi avaliada nas concentrações de 2x CMI, CMI, ½ CMI e ¼ CMI onde foi possível observar redução estatisticamente significativa (p valor <0,05) do biofilme em todas as concentrações quando comparado ao controle negativo (sem tratamento). Já com relação ao antimicrobiano vancomicina, foi possível observar estímulo a formação do biofilme maduro em todas as concentrações testadas (Figura 12).

Biofilme pré formado maduro amostra ED99

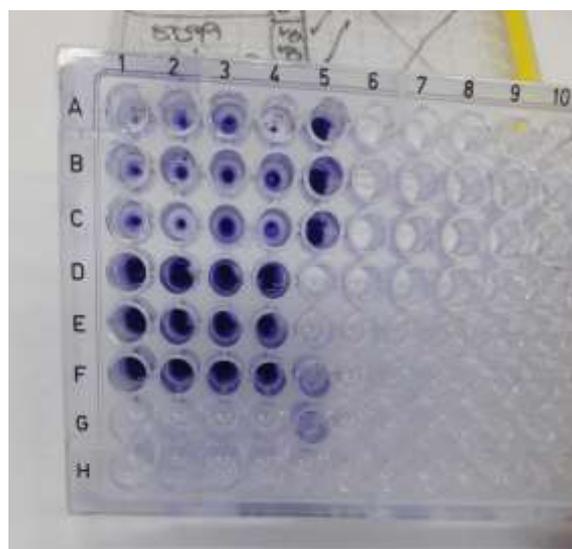
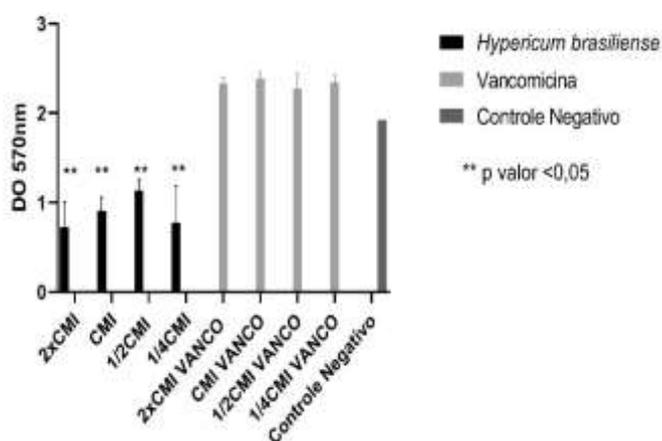


Figura 12: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme maduro de *Staphylococcus pseudintermedius* amostra ED99, comparada ao controle negativo (meio BHI+ inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

Em relação à capacidade de atuação do extrato sobre o biofilme maduro de 24 horas da amostra de *S. coagulans* SD84 foi possível observar redução estatisticamente significativa (p valor <0,0005) do biofilme maduro nas concentrações 2xCIM e CIM testadas, quando comparadas ao grupo controle negativo, sem o tratamento com o extrato de *H. brasiliense*. *Staphylococcus schleifeiri* SD42 também apresentou redução estatisticamente significativa (p valor <0,0001) do biofilme maduro de 24 horas na concentração 2x CMI quando comparada ao controle negativo, sem o tratamento com o extrato de *H. brasiliense*. Já com relação ao antimicrobiano vancomicina, possível

observar sua atuação, estimulando o biofilme formado por ambas as amostras. (Figura 14).

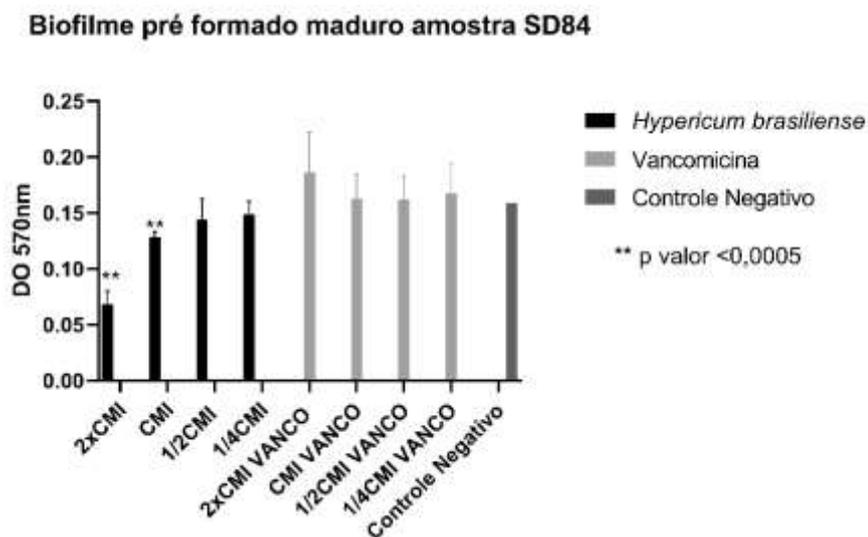


Figura 13: Ação do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme pré formado maduro de *S. coagulans* amostra SD84, comparada ao controle negativo (meio BHI + inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

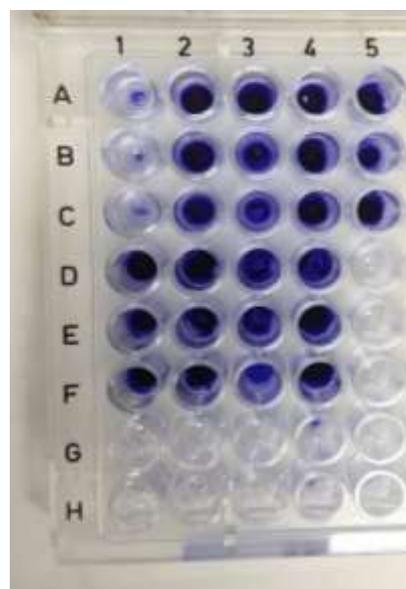
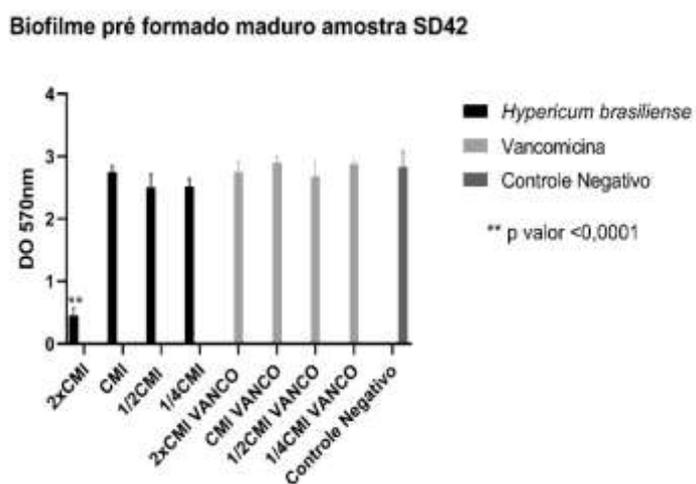


Figura 14: Atividade do extrato de *Hypericum brasiliense* no biofilme pré formado maduro de *S. schleiferi* amostra SD42, comparada ao controle negativo (meio BHI + inóculo) e a ação do antimicrobiano vancomicina. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

5.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DO BIOFILME E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foi possível realizar a análise da formação do biofilme através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e em seguida transformado em uma escala de Log₁₀. Esse experimento foi realizado em triplicata e os valores das réplicas encontram-se no apêndice 1.

Em todas as três amostras analisadas neste estudo observamos a redução estatisticamente significativa (p valor < 0,000001) da proliferação do biofilme no momento em formação, das amostras ED99, SD84 e SD42 quando comparado o grupo sem tratamento com o extrato de *H. brasiliense* (controle negativo) e com o grupo com tratamento com o extrato de *H. brasiliense* nas concentrações CMI referentes a cada uma das amostras bacterianas (Figuras 15, 17 e 19).

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura das amostras, *S. pseudintermedius* (Figura 16), *S. schleiferi* SD42 (Figura 18) e *S. coagulans* SD84 (Figura 20), sem tratamento com extrato de *Hypericum brasiliense* (controle negativo) e com tratamento com o extrato de *Hypericum brasiliense*. As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura permitiram a visualização do arranjo e formato do biofilme bacteriano das amostras sem tratamento, bem como a redução massiva do biofilme quando tratado com o extrato de *H. brasiliense*.

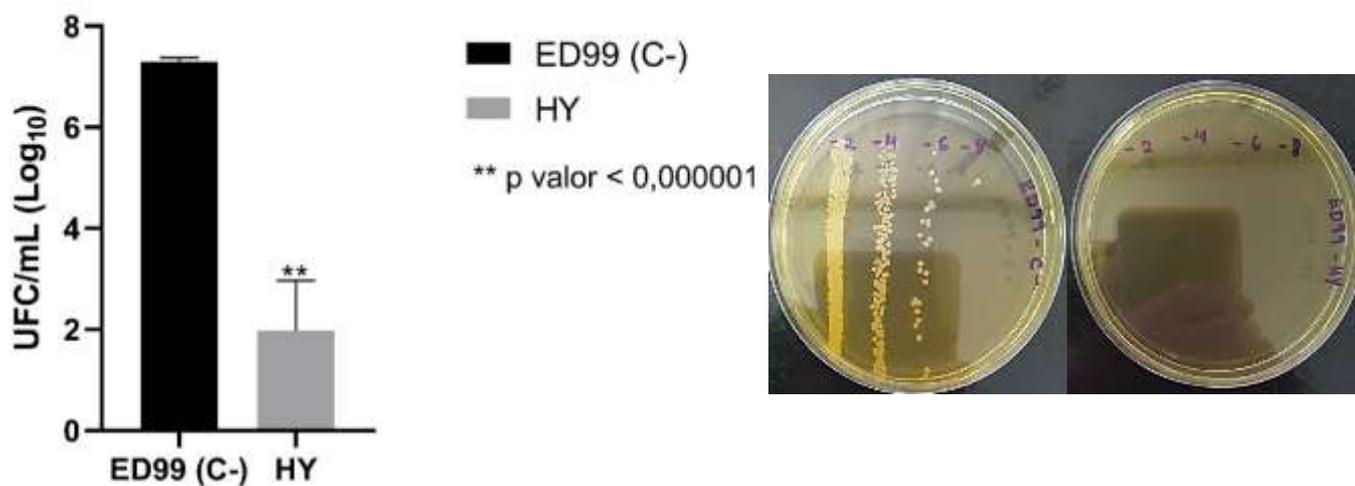


Figura 15: Valores de UFC/mL (Log₁₀) do biofilme formado pela amostra de *S. pseudintermedius* ED99 sem tratamento com extrato de *Hypericum brasiliense*: ED99 (C) e com tratamento com o extrato de *Hypericum brasiliense* (1/2 CMI): HY. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

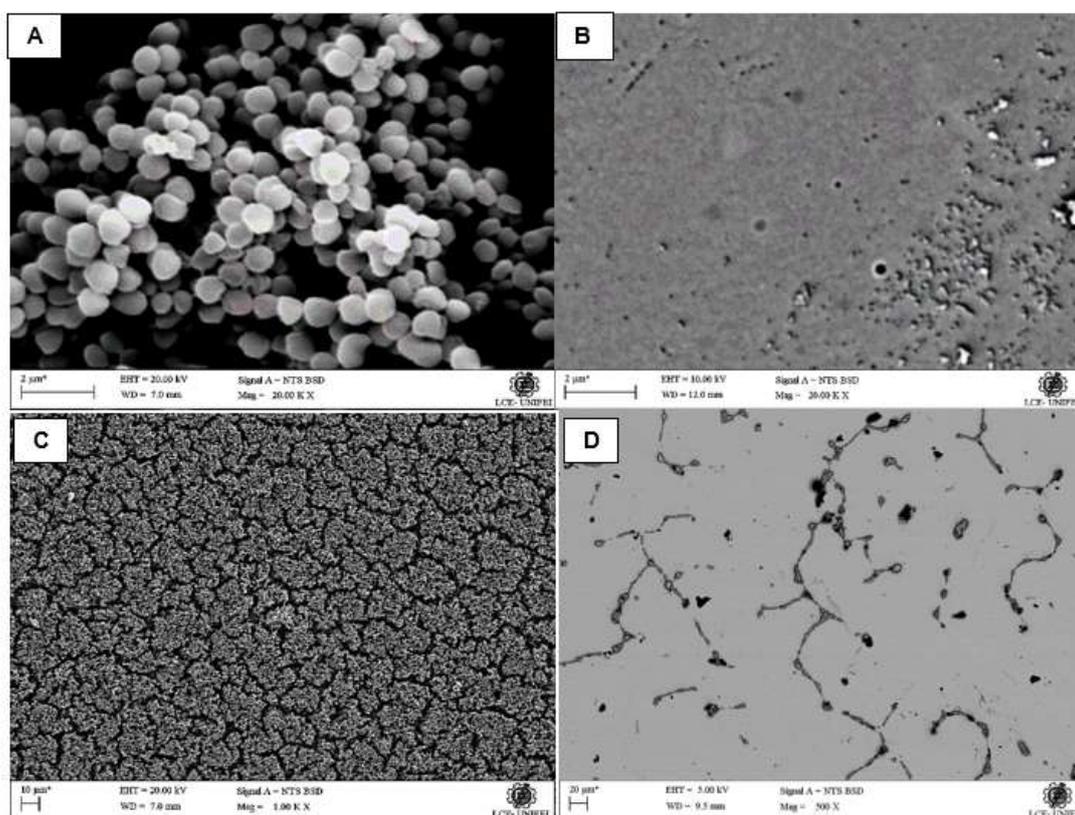


Figura 16: Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da amostra *S. pseudintermedius* ED99, onde é possível observar (A e C) a presença da formação de um tapete de biofilme na magnificação de 20.000x e 1.000x; e (B e D) a

ausência de formação de biofilme quando submetida ao tratamento com o extrato de *H. brasiliense*.

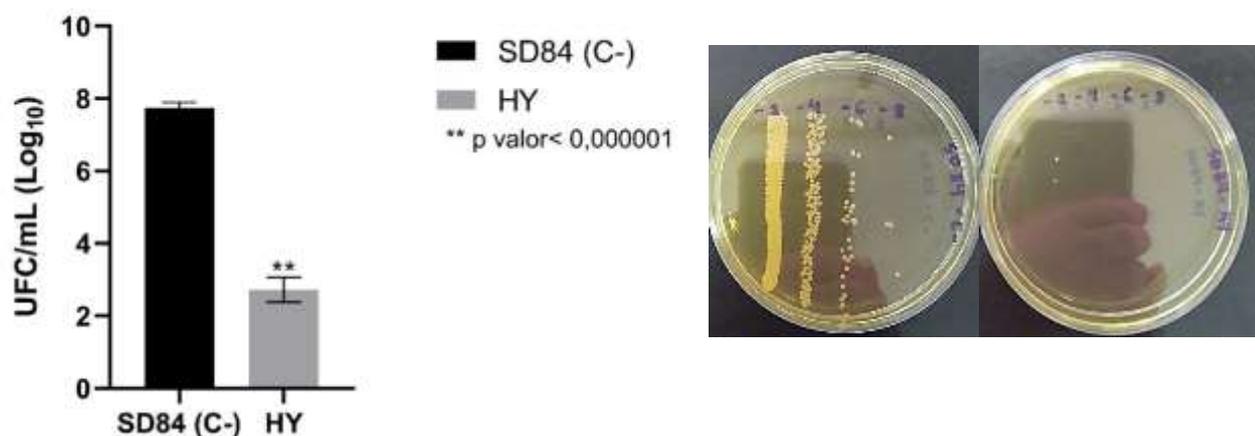


Figura 17: Valores de UFC/mL (Log₁₀) do biofilme formado pela amostra de *S. coagulans* SD84 sem tratamento com extrato de *Hypericum brasiliense* (1/2 CMI): SD84 (C-) e com tratamento com o extrato de *Hypericum brasiliense*: HY. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

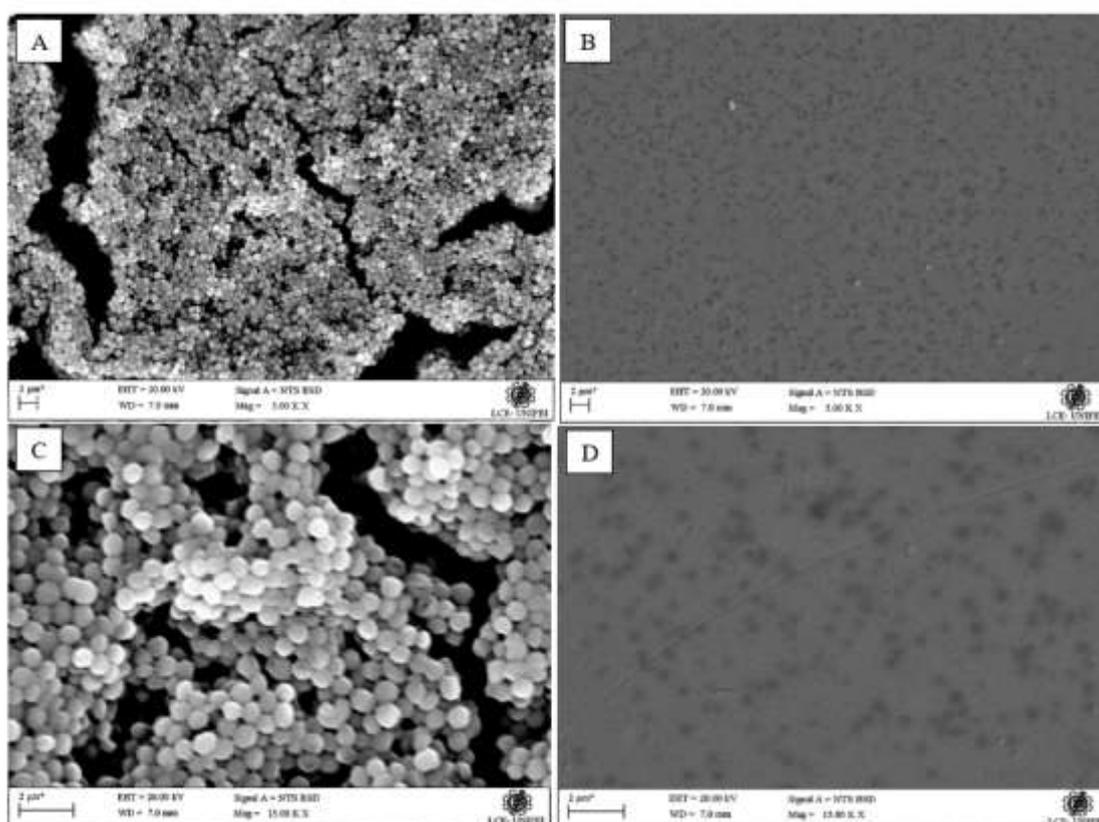


Figura 18: Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da amostra *S. coagulans* SD84, onde é possível observar (A e C) a presença da formação de

um tapete de biofilme na magnificação de 5.000x e 15.000x; e (B e D) a ausência de formação de biofilme quando submetida ao tratamento com o extrato de *H. brasiliense*.

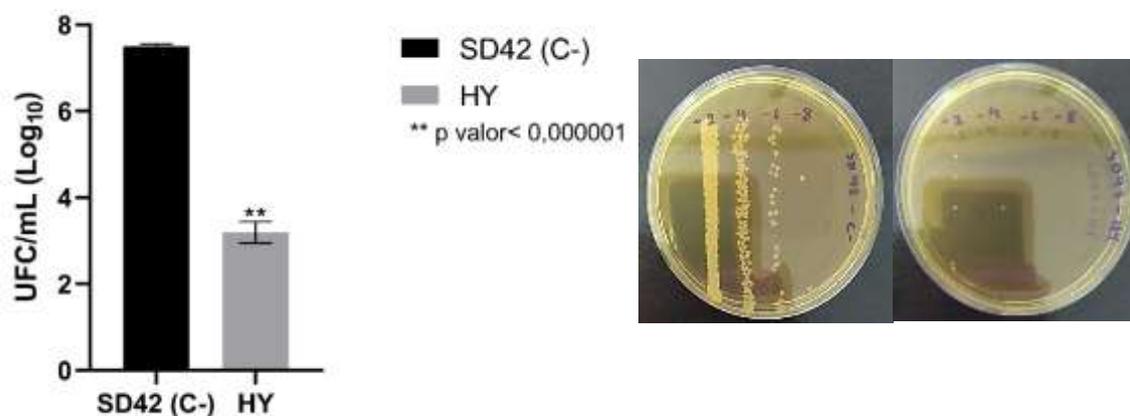


Figura 19: Valores de UFC/mL (Log₁₀) do biofilme formado pela amostra de *S. schleiferi* SD42 sem tratamento com extrato de *Hypericum brasiliense* (1/2 CMI): SD42 (C-) e com tratamento com o extrato de *Hypericum brasiliense*: HY. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

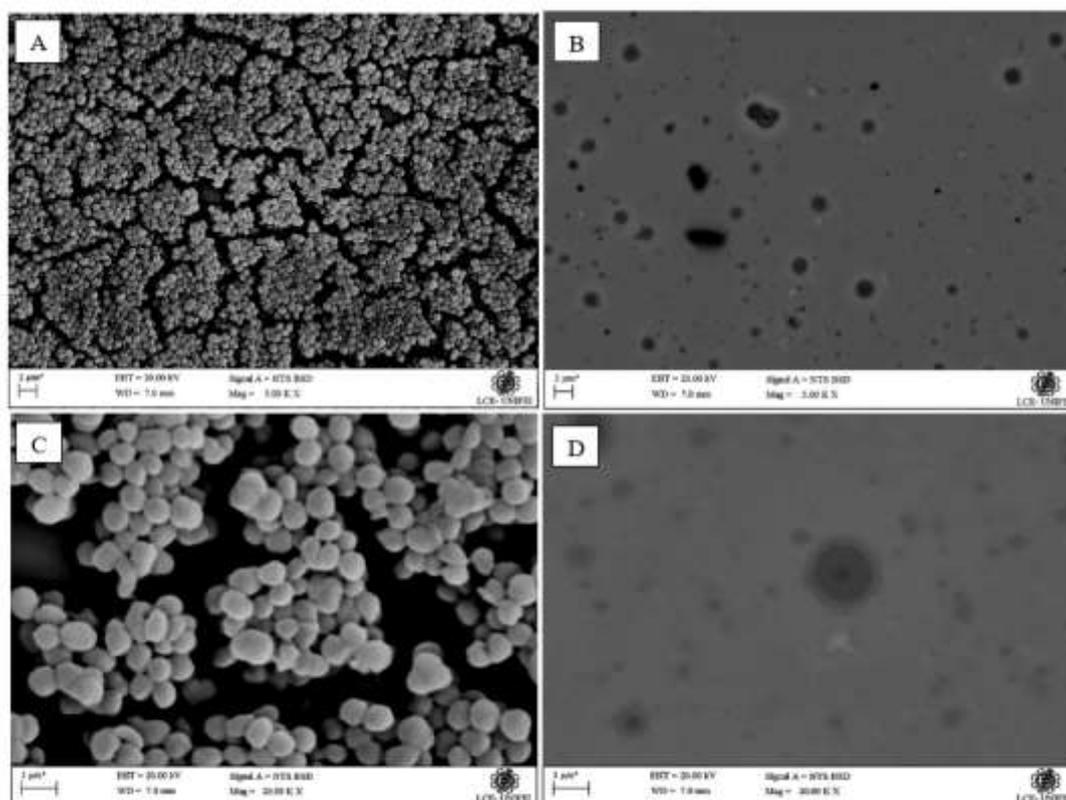


Figura 20: Micrografias obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura da amostra *S. schleiferi* SD42, onde é possível observar (A e C) a presença da formação de

um tapete de biofilme na magnificação de 5.000x e 20.000x; e (B e D) a ausência de formação de biofilme quando submetida ao tratamento com o extrato de *H. brasiliense*.

6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram a eficiência do extrato hexânico de *H. brasiliense* frente a outras espécies do gênero *Staphylococcus* (*S. aureus* e *S. epidermidis*), não somente para as atividades bactericidas e bacteriostáticas como também a atividade antibiofilme, tanto do extrato bruto como a da versão nano emulsionada (CALDAS 2018; PEREIRA *et al.*, 2021). Nesse estudo, foi analisada a atividade do extrato de *Hypericum brasiliense* frente a amostras de *Staphylococcus coagulans*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleifeiri* e também foi possível observar tanto a atividade inibitória ou bacteriostática (CMI) como a bactericida (CMB), além da antibiofilme.

Comparando os resultados dos estudos elaborados por Pereira *et al.* (2021) e por CALDAS (2018), com o presente estudo, pode-se perceber que os valores de CMI e CMB encontrados no primeiro trabalho foram de 4 µg/mL para CMI tanto para *S. aureus* como para *S. epidermidis* e os de CMB também foram semelhantes (4 µg/mL). Em relação ao segundo estudo, os resultados (entre 4 µg/mL e 32 µg/mL para CIM e 32 µg/mL para CMB) são iguais ou estão próximos aos obtidos para as espécies analisadas nesse estudo. Os valores observados em nosso trabalho, encontram-se dentro do valor de tolerância (CMB/CMI > ou = 32 µg/mL) CMB sugerindo se tratar de um alvo interessante para estudo de mecanismos de tolerância e resistência bacterianas (TRASTOY *et al.*, 2018). Nossos achados evidenciam a atividade antibacteriana apresentada pelo *H. brasiliense* além de corroborarem com a literatura, como no trabalho realizado por França e colaboradores (2009) onde amostras de espécies do gênero *Staphylococcus* tais como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* além de cepas MRSA foram analisadas e inibidas pelo extrato hexânico de *H. brasiliense*, apresentando halos de inibição que variaram entre 10 e 12 mm no método de difusão em disco (FRANÇA *et al.*, 2009).

O gênero *Hypericum* tem atraído considerável atenção devido aos seus metabólitos secundários farmacologicamente importantes. Além da espécie *H. brasiliense*, outras vem sendo estudadas por potencial atividade antibacteriana (NAHRSTEDT & BUTTERWECK., 2010). Um estudo recente realizado na Turquia por Aygü e Şerbetçi (2020), por exemplo, se propôs a investigar a atividade antibacteriana do *Hypericum lydium* contra amostras de *S. aureus* resistentes (MRSA) encontrando valores

de CMI entre 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$. Os autores sugerem de acordo com os resultados observados, que o *H. lydiium* possui potencial para estar envolvido em formulações de medicamentos no combate a tal patógeno.

Do mesmo modo, estudos com outros tipos de produtos naturais, tais como os óleos essenciais para o combate de infecções estafilocócicas, também vem ganhando destaque. Recentemente um estudo realizado por Sharif e colaboradores (2017) se propôs a investigar os efeitos dos óleos essenciais das plantas *Thymus daenensis* e *Satureja hortensis* no crescimento planctônico e na formação de biofilme de isolados de *S. aureus* fortes produtores de biofilme, observando serem bons candidatos na prevenção da formado de biofilme por essa espécie.

Tais resultados observados na literatura, associado ao crescente número de infecções estafilocócicas resistentes aos antimicrobianos disponíveis, reforçam e corroboram com a importância de estudos que se propõem a investigar novos alvos terapêuticos, tais como o nosso trabalho.

Diversos estudos ao redor do mundo já notificaram o isolamento de amostras resistentes de origem veterinária (WINDAHL *et al.*, 2016; PRIYANTHA *et al.*, 2016; BOURGUIGNON *et al.*, 2016; KUNDER *et al.*, 2015; GÓMEZ-SANZ *et al.*, 2011). Essas amostras geralmente apresentam resistência tanto a drogas de primeira escolha como a clindamicina, como a drogas de segunda escolha como as fluoroquinolonas (enrofloxacina), para tratar piodermite (HILLIER *et al.*, 2014).

Em relação ao tratamento de otites, as drogas de primeira escolha são os aminoglicosídeos (GUARDABASSI *et al.*, 2008) e também já foram encontradas altas taxas de resistência a aminoglicosídeos na espécie *S. schleiferi* (DETWILER *et al.*, 2013). Esse fato justifica amplo estudo dos produtos naturais e sua busca por novos alvos terapêuticos mais seguros e eficientes para o tratamento de infecções (ANGIOLELLA *et al.*, 2018), em especial aquelas causadas por cepas resistentes que causam infecções de difícil tratamento, e com opções limitadas de antimicrobianos.

O gênero *Hypericum* mostrou ser uma alternativa com grande potencial para este problema em especial *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995). Os valores de CMI encontrados neste estudo demonstram atividade antibacteriana contra *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. schleiferi*, e esses resultados animadores, demonstram que o *H. brasiliense* tem grande potencial de combate a essas cepas de origem veterinária.

A formação de biofilme é considerada um dos principais mecanismos de agressão que pode ser encontrado em espécies do gênero *Staphylococcus* spp. (HILL & IMAI, 2016) uma vez que a capacidade de produção de biofilme pelas cepas bacterianas contribui para sua persistência no local de infecção, o que torna o tratamento com antimicrobianos mais difícil (ASLANTAŞ & DEMIR, 2016; LIMA *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, foi evidenciada a formação de biofilme das amostras de *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. schleiferi* e a ação do extrato de *H. brasiliense* em três estágios diferentes do biofilme: em formação, pré formado jovem (6 horas) e pré formado maduro (24 horas) nas concentrações de 2x CMI, CMI, ½ CMI, ¼ CMI e 1/8 CMI, frente a essas amostras.

O estudo realizado por Pereira e colaboradores (2021), observou que o extrato de *Hypericum brasiliense* obteve resultados significativos tanto no momento da formação como na desestruturação dos biofilmes pré-formados por *S. aureus*. Isso sugere que a atuação do extrato de *H. brasiliense* ocorra tanto na aderência das bactérias às superfícies como na etapa de liberação das células. Em nosso trabalho, também foi possível observar a ação do extrato de *H. brasiliense* no biofilme, e de forma mais expressiva no momento em formação e pré formado jovem, onde o extrato foi capaz de inibir a formação do biofilme em todas as amostras e respectivas concentrações testadas, corroborando com os dados descritos na literatura.

Apesar de já terem sido isoladas da fração hexânica do extrato de *H. brasiliense*, substâncias que se acredita serem as responsáveis pela atividade antibacteriana apresentada por essa espécie (ROCHA *et al.*, 1995), o mecanismo de ação antimicrobiana do extrato utilizado neste estudo, ainda não foi muito bem elucidado.

Diversos estudos já demonstraram que a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* pode ser estimulada em até 4 vezes na administração de concentrações sub inibitórias (sub CMIs) de alguns antibióticos, como cefalotina, cefalexina, vancomicina e linezolida (MIRANI, 2011; HADDADIN *et al.*, 2010; FRANK *et al.*, 2007). Em nosso trabalho também foi observado que em alguns momentos parecia haver o estímulo da formação do biofilme em algumas concentrações sub CMIs de vancomicina, que apesar de ser indicado como última escolha para o tratamento de infecções estafilocócicas, não foi capaz de inibir a formação do biofilme produzido em especial pela amostra SD84 em todos os estágios da formação de biofilme.

Essas observações nos levam a crer que em baixas concentrações ocorre um estímulo do sistema de defesa da bactéria, o que faz com que se desenvolvam mais

rapidamente na tentativa de se defender. Além disso, tem sido demonstrado que o *quorum sensing* desempenha um papel importante na adesão celular, conferindo ao biofilme uma maior proteção em relação aos agentes antimicrobianos. Essa comunicação possibilita às bactérias executarem funções biológicas importantes, muitas delas envolvidas com a virulência desses patógenos (ANTUNES, 2003; JENUL & HORSWILL, 2018).

Com relação à análise da proliferação do biofilme através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi possível observar a eficiência do extrato de *H. brasiliense* na redução significativa da proliferação do biofilme em todas as três amostras analisadas neste estudo quando comparado o grupo sem tratamento, reforçando mais uma vez a capacidade antibacteriana apresentada por essa planta. Do mesmo modo, as micrografias realizadas por microscopia eletrônica de varredura foram capazes de constatar de forma visual a inibição da formação do biofilme tratado com o extrato apresentado neste estudo.

Poucos são os estudos encontrados na literatura a respeito da atividade antibiofilme do extrato de *H. brasiliense* frente a espécies estafilocócicas, dentre os quais, nenhum se dedica as espécies de cunho veterinário e com potencial zoonótico como *S. pseudintermedius*, *S. coagulans* e *S. schleiferi*. Diante desse fato, mais pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar os mecanismos pelos quais ocorre a atividade antibiofilme apresentada por essa espécie assim como análises de sua atuação frente a cepas veterinárias.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou o perfil antibacteriano e antibiofilme do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* frente às cepas de *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus coagulans* e *Staphylococcus pseudintermedius*.

Foi possível observar a capacidade do extrato em inibir o crescimento (obteve valores de Concentração Mínima Inibitória - CMI) e ainda agirem matando as células bacterianas (obteve valores de Concentração Mínima Bactericida - CMB) nas amostras bacterianas estudadas.

Ainda foi possível observar de forma conclusiva a atividade antibiofilme do extrato de *H. brasiliense*, evidenciada nos momentos em formação, pré formado jovem e pré formado maduro.

Na análise da proliferação do biofilme e nas imagens capturadas por Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível confirmar que o extrato *H. brasiliense* foi capaz de reduzir significativamente a proliferação do biofilme em todas as três amostras analisadas, se mostrando uma possível alternativa terapêutica que pode contribuir para o tratamento eficaz dos casos de piodermite canina e otite canina associada a essas cepas estafilocócicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES EG.; VINHOLIS AHC.; CASEMIRO LA.; FURTADO NAJC.; SILVA MLA.; CUNHA WRC, MARTINS CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim Nova**. 31(5): p1224-1229. 2008

ANDRÉ LSP, PEREIRA RFA, PINHEIRO FR, PASCOAL ACRF, FERREIRA VF, DA SILVA FC, GONZAGA DTG, COSTA DCS, RIBEIRO T, SACHS D, AGUIAR-ALVES F. Biological Evaluation of Selected 1,2,3-triazole Derivatives as Antibacterial and Antibiofilm Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 20, 1-6. 2020.

ANGIOLELLA L, SACCHETTI G, EFFERT T. Antimicrobial and antioxidant activities of natural compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**., v.2018, p1-3. 2018.

ANTUNES ALS, TRENTIN DS, BONFANTI JW, PINTO CCF, PEREZ LRR, MACEDO AJ, BARTH AL. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. **APMIS**. v.118, p.873-877. 2010.
ANTUNES, L. C. M. A Linguagem das bactérias. **Ciência hoje**, v. 33, n. 193, p. 16-20, 2003.

ARCIOLA, C. R.; GAMBERINI, S.; CAMPOCCIA, D.; VISAI, L.; SPEZIALE, P.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. A Multiplex PCR Method for the Detection of All Five Individual Genes of Ica Locus in *Staphylococcus epidermidis*. A Survey on 400 Clinical Isolates from Prosthesis-Associated Infections. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 75, n. 2, p. 408–413, 2005.

ARIAS, M. V. B.; DE MAIO CARRILHO, C. M. D. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 775–790, 2012.

ASLANTAŞ O & DEMIR C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **J. Dairy Sci.**, v.99, p.8607-8613. 2016.

AZIMI, T.; MIRZADEH, M.; SABOUR, S.; NASSER, A.; FALLAH, F.; POURMAND, M. R. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) meningitis: a narrative review of the literature from 2000 to 2020. **New Microbes and New Infections**, [s. l.], v. 37, p. 100755, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100755>>

AYGÜL, A., & ŞERBETÇI, T. The antibacterial and antivirulent potential of *Hypericum lydiium* against *Staphylococcus aureus*: inhibition of growth, biofilm formation, and hemolytic activity. **European Journal of Integrative Medicine**, 101061. 2020. doi:10.1016/j.eujim.2020.101061

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 253-e52, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>>

BES M, GUÉRIN-FAUBLÉE V, FRENEY J, ETIENNE J. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from two cases of canine pyoderma. **Vet Rec**. Apr 13, 2002.

BORJESSON S, GÓMEZ-SANZ E, EKSTRÖM K, TORRES C, GRÖNLUND U. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 34:839–844. 2015.

BOURGUIGNON, E.; VIÇOSA, G. N.; CORSINI, C. M. M.; MOREIRA, M. A. S.; NERO, L. A.; CONCEIÇÃO, L. G. Description of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* from Canine Pyoderma in Minas Gerais State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 68, n. 2, p. 299–306, 2016.

CAIN, C. L.; MORRIS, D. O.; RANKIN, S. C. Clinical characterization of *Staphylococcus schleiferi* infections and identification of risk factors for acquisition of oxacillin-resistant strains in dogs: 225 cases (2003–2009). **JAVMA**, [s. l.], v. 239, n. 12, p. 1566–1573, 2011. a.

CAIN, C. L.; MORRIS, D. O.; RANKIN, S. C. Clinical characterization of *Staphylococcus schleiferi*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 239, n. 12, p. 13–15, 2011. b.

CALDAS, G.R. Preparação de nanoemulsão contendo extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* como proposta para o combate de biofilmes bacterianos. Trabalho de conclusão de curso (farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro. 2018.

CALIXTO, J. B. Biodiversity as a source of medicines. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37- 39, 2003.

CARVALHO, E. S.; FERREIRA, J. L. P.; ARCENIO, F.; ROCHA, L.; SHARAPIN, N. Caracterização química do óleo essencial de *Hypericum brasiliense* Choisy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 13, p. 34–36, 2003.

CARVALHO, P. E. R. Brazilian Arboreal Species. **Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras**, vol. 1. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 1.039p. 2003.

CELARD, M.; VANDENESCH, F.; DARBAS, H.; GRANDO, J.; JEAN-PIERRE, H.; KIRKORIAN, G.; ETIENNE, J. Pacemaker infection caused by *Staphylococcus schleiferi*, a member of the human preaxillary flora: Four case reports. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1014–1015, 1997.

CHRISTNER M, FRANKE GC, SCHOMMER NN, WENDT U, WEGERT K, PEHLE P, KROLL G, SCHULZE C, BUCK F, MACK D, AEPFELBACHER M, ROHDE H.

The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. **Molecular Microbiology**, v. 75, p. 187-207, 2010.

CHUANG, C.; YANG, Y.; HSUEH, P.; LEE, P. Catheter-Related Bacteremia Caused by *Staphylococcus pseudintermedius* Refractory to Antibiotic-Lock Therapy in a Hemophilic Child with Dog Exposure. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 4, p. 1497–1498. 2010.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; TwentyEight Informational Supplement. CLSI document M100-S28. **Wayne, Pa.** CLSI, Clinical and laboratory Standards Institute, 2018.

CORREAL, J. et al. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 31- 46, set. 2013.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 564-582, 1999.

COX, H. U.; HOSKINS, J. D.; NEWMAN, S. S.; FOIL, C. S.; TURNWALD, G. H. & ROY, A. F. Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, n.49, p. 747-51, 1988.

DAVIS, M. F.; CAIN, C. L.; BRAZIL, A. M.; RANKIN, S. C. Two coagulase-negative staphylococci emerging as potential zoonotic pathogens: Wolves in sheep's clothing? **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. MAY, p. 1–4, 2013.

DETWILER, A.; BLOOM, P.; PETERSEN, A.; JR, E. J. R. Multi-Drug and Methicillin Resistance of Staphylococci from Canine Patients at a Veterinary Teaching Hospital (2006 – 2011). **Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 2, p. 37–41, 2013.

DEVRIESE, L. A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 206–207, 2009.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 1569–1573, 2005.

DIAZ MAN, ROSSICC, MENDONÇA VR, SILVA DM, RIBON AOB, AGUILAR AP, MUÑOZ G.D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20(5), p.724-728. 2010.

FERNANDES, P.; **Nat. Biotechnol**, 24, 1497. 2006.

FERNANDES, T. J. S. Atividade antimicrobiana e determinação da CIM de extratos e fases particionadas de produtos vegetais. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- **Universidade Estadual da Paraíba**, Campina Grande, 2014.

FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M.; RITO, P. D. N.; DE OLIVEIRA, A. P.; TEIXEIRA, L. A.; ROCHA, L. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *hypericum brasiliense*. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 1103–1106, 2009.

FRANK, K. L.; REICHERT, E. J.; PIPER, K. E., PATEL, R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 51, p. 888 –895, 2007.

FREITAS VR, VAN DER SAND ST, SIMONETTI AB. Formação *in vitro* de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Rev. Odontol. UNESP**. v.39(4), p.193-200. 2010.

FRENEY, J.; BRUN, Y.; BES, M.; MEUGNIER, H.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; NERV1, C.; FLEURETTE ', J. Two Species from Human Clinical Specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], n. 32, p. 168–172, 1988.

FRENCH, G.L.; The continuing crisis in antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents** 36, S3-7, 2010.

GALEOTTI, N. *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 200, n. February, p. 136–146, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.016>>

GHARSA, H.; SLAMA, K. Ben; GÓMEZ-SANZ, E.; LOZANO, C.; KLIBI, N.; JOUINI, A.; MESSADI, L. Antimicrobial Resistance , Virulence Genes , and Genetic Lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in Healthy Dogs in Tunisia. [s. l.], p. 363–368, 2013.

GIBBONS, S.; OHLENDORF, B.; JOHNSEN, I. The genus *Hypericum* - A valuable resource of anti-Staphylococcal leads. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 300–304, 2002.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M. Detection and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* in Healthy Dogs in La Rioja, Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, p. 447–453, 2011.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; ZARAZAGA, M. High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 83–94, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.10.001>>
GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. *Guia de Antimicrobianos em Veterinária*. 1ª ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos

agentes. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HADDADIN, R. N.; SALEH, S.; AL-ADHAM, I. S.; BUULTJENS, T. E.; COLLIER, P. J. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 1281–1291, 2010.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 686–699, 2005.

HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol.** 2:95–108, 2004.

HAN J-I.; YANG C-H.; PARK H-M. Emergence of biofilm-producing *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in South Korea. **Vet Q.**35:207–10, 2015.

HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S. A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. household pets. [s. l.], v. 50, n. September, p. 954–958, 2009.

HERNÁNDEZ, J. L.; CALVO, J.; SOTA, R.; AGÜERO, J.; GARCÍA-PALOMO, J. D.; FARIÑAS, M. C. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 153–158, 2001.

<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html> - data de acesso: 26/10/2020.

HILL, P. B.; IMAI, A. The immunopathogenesis of staphylococcal skin infections – A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 49, p. 8–28, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.08.004>>

HILLIER, A., LLOYD, D. H., WEESE, J. S., BLONDEAU, J. M., BOOTHE, D., BREITSCHWERDT, E., SYKES, J. E. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). **Veterinary Dermatology**, 25(3), 163–e43. 2014. doi:10.1111/vde.12118

INTORRE, L.; VANNI, M.; BELLO, D. D. I. Antimicrobial Susceptibility and Mechanism of Resistance to Fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. **Journal of Veterinary Pharmacological Therapy**, n. 30, p. 464–469, 2007.

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, A. N. D. T. from the External Auditory Meatus of Dogs with External Ear Otitis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 409–411, 1990.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 1–21, 2019.

JEVONS, P. "Celbenin"-resistant staphylococci. **British Medical Journal**, v.1, n. Jan, p.124-125, 1961.

JIMÉNEZ, C. R. Flora ilustrada catarinense: Hipericaceae. **SANTA CATARINA**: Itajaí, p. 23-27, 1980.

KANG, M.; CHAE, M.; YOON, J.; KIM, S.; LEE, S.; YOO, J.; PARK, H. Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Dogs. **Veterinary Science**, v. 15, n. 3, p. 409–415, 2014.

KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1241, n. 1, p. 104–121, 2011.

KIZERWETTER-ŚWIDA, M.; CHROBAK-CHMIEL, D.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Changes in the population structure of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Poland. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 208, n. March, p. 106–109, 2017.

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

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2013.

KUNDER, D. A.; CAIN, C. L.; O'SHEA, K.; COLE, S. D.; RANKIN, S. C. Genotypic Relatedness and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus schleiferi* in Clinical Samples from Dogs in Different Geographic Regions of the United States. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 406–411, 2015.

LEAL, P. M. Ação antimicrobiana de compostos majoritários presentes em óleos essenciais sobre bactérias causadoras de infecções hospitalares. 2013.

LE, K.Y.; DASTGHEYB, S.; HO, T.V.; OTTO, M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. **Front Cell Infect Microbiol** 4: 167. 2014.

LEE, G. Y.; LEE, H. H.; HWANG, S. Y.; HONG, J.; LYOO, K. S.; YANG, S. J. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: Antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. **Journal of Veterinary Science**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 1–11, 2019.

LEHNER, G.; LINEK, M.; BOND, R.; LLOYD, D. H.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; THOM, N.; STRAUBE, I.; VERHEYEN, K.; LOEFFLER, A. Case – Control Risk Factor Study of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) Infection in Dogs and Cats in Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 154–160, 2014.

LIMA JLC, ALVES LR, PAZ JNP, RABELO MA, MACIEL MAV, MORAIS MMC. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Rev Bras Ter Intensiva**, v.29(3), p.310-316. 2017.

LIM Y, JANA M, LUONG TT, LEE CY. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.**186:722–9. 2004.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J. Plantas medicinais no Brasil: nativase exóticas cultivadas. **Nova Odessa:** Instituto Plantarum, p.228-9. 2002.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; PÉREZ-LAGUNA, V.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-RIPA, L.; REVILLO, M. J.; TORRES, C. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 268–270, 2017.

MADHAIYAN M, WIRTH JS, SARAVANAN VS. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2020 Nov;70(11):5926-5936. doi: 10.1099/ijsem.0.004498. PMID: 33052802.

MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antibiotic resistance in *Staphylococci* associated with cats and dogs. **J. Appl. Microbiol.** v.99, p.1283-1293, 2005.

MANN EE, RICE KC, BOLES BR, ENDRES JL, RANJIT D, CHANDRAMOHAN L, TSANG LH, SMELTZER MS, HORSWILL AR, BAYLES KW Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PLoS One**, v. 4, n. 6, 2009.

MARRAFFINI, L.A.; DEDENT, A.C.; SCHNEEWIND, O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. **Microbiol Mol Biol R** 70: 192. 2006.

MATSUHASHI, M. M. D.; SONG, F.; ISHIMO, M.; WACHI, M.; DOI, M.; INOUE, K.; UBUKATA, N.; YAMASHITA, M. K. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to betalactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 167, p. 975–980, 1986.

MAY, E. R.; KINYON, J. M.; NOXON, J. O. Nasal carriage of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma or both. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 160, n. 3–4, p. 443–448, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.020>>

MEHNDRIRATTA, P.L.; BHALLA, P.; AHMED, A.; SHARMA, Y.D. Molecular typing of methicilin-resistant staphylococcus aureus strains by PCR-RFLP of SPA gene: A reference laboratory perspective. **Indian Journal of Medical Microbiology** 27 (2), 116-22. 2009.

MIRANDA JAL, ROCHA JA, ARAÚJO KM, QUELEMES PV, MAYO SJ, ANDRADE IM. Avaliação antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v.17(4), supl. III, p.1142-1149. 2015.

MIRANI, Z.A.; JAMIL, N. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Basic Microbiol.** v. 51, p. 191–195, 2011.

MITTAL N, TESHU HH, HOGAN AM, CARDONA ST, SORENSEN JL. 2019. Synthesis and antibiotic activity of novel acylated phloroglucinol compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antibiot** (Tokyo) [Internet]. 72(5):253–259. <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-019-0153-4>

MIZDAL CR. Avaliação de novos compostos antimicrobianos na inibição da formação do biofilme de *Escherichia coli*. Dissertação da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da **Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria , 67p. 2014.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 365–376, 2017. MOORMEIER, D.E.; BOSE, J.L.; HORSWILL, A.R.; BAYLES, K.W. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. **MBio** 5: e01341–e01314. 2014.

MORRIS DO, BOSTON RC, O'SHEA K, RANKIN SC. The prevalence of carriage of methicillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. **Vet Dermatol.**21:400–7. 2010.

MORRIS, D.O.; ROOK, K.A.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). **Veterinary Dermatology** 17 (5), 332-7. 2006

MORRISON S.; SINGH A.; ROUSSEAU J.; WALKER M.; NAZARALI A.; CRAWFORD E. Impact of polymethylmethacrylate additives on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* biofilm formation in vitro. **Am J Vet Res**,76:395–401, 2015.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th editio ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.

NAHRSTEDT, A., & BUTTERWECK, V. Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of *St. John's Wort*. **Journal of Natural Products**, 73(5), 1015–1021. 2010. doi:10.1021/np1000329

NAPOLITANO, D.R. et al. Downmodulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. *Molecules that Changed the World*, Wiley-VCH: Weinheim, cap. 13. 2008.

O'GARA JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett** .270:179–88. 2007.

O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**. 54:49–79. 2000.

OSLAND AM, VESTBY LK, FANUELSEN H, SLETTEMEÅS JS, SUNDE M. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Antimicrob Chemother**. 67:841–8. 2012.

OLIVEIRA AC & SILVA RS. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v.10(1), p.189- 197. 2008.
OLIVEIRA, R. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira Farmacogn** 16.1. 77-82. 2006.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1–17, 2018.

ONUMA, K.; TANABE, T.; SATO, H. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Healthy Dogs and Dogs Affected with Pyoderma in Japan. **Veterinary Dermatology**, n. 23, p. 17–23, 2011.

OSMAN, K. M.; AMER, A. M.; BADR, J. M.; HELMY, N. M. Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation and mecA Characterization of Non- *Staphylococcus aureus* of Beef Meat Origin in. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–12, 2016.

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1–27, 2016.

PAUL NC, MOODLEY A, GHIBAUDO G, GUARDABASSI L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoonoses Public Health** ;58:533–9. 2011.

PENNA, B.; MENDES, W.; RABELLO, R.; LILENBAUM, W. Carriage of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus schleiferi* among dog with or without topic infections. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 298–299, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.022>>

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G. M.; MARTINS, R. R.; LILENBAUM, W. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio De Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 40, p. 490–494, 2009.

PERAZZO, F. P.; LIMA, L. M.; ROCHA, L.; FRANÇA, H. S.; CARVALHO, J.C.T. Antidepressant activity evaluation of *Hypericum brasiliense* standardized extract. **Phcog. Mag**, v. 4, p. 155-158, 2008.

PEREIRA, C.A.; ROMEIRO, R.L.; COSTA, A.C.B.; MACHADO, A.K.S.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus*

aureus, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. **Lasers in Medical Science**, p. 1-8, 2010.

PEREIRA R.F.A., ANDRE L.S.P., PINHEIRO F.R., SCAFFO J., CORRÊA A.L., RIBEIRO T.A.N., SACHS D., ROCHA L & AGUIAR-ALVES F. *Hypericum brasiliense*: bactericidal and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus in vitro*, **Natural Product Research** 2021.

PERRETEN, V.; FINN, M.; GREKO, CHRISTINAKADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRO, U.; MOODLEY, A.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; BEMIS, D. A.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; DUIJKEREN, E. Van; WEESE, J. S.; FITZGERALD, J. R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America : an international multicentre study. [s. l.], n. **March**, p. 1145–1154, 2010.

PERIASAMY, S., JOO, H.S., DUONG, A.C., BACH, T.H., TAN, V.Y., CHATTERJEE, S.S., ET AL. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proc Natl Acad Sci USA** 109: 1281–1286. 2012.

PIERCE C, UPPULURI P, TRISTAN AR, WORMLEY FL JR, MOWAT E, RAMAGE G, LOPEZRIBOT JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc.** v.3, p.1494–1500. 2008.

PINHEIRO, L C S., HOELZ, L V B., FERREIRA, M L G., OLIVEIRA, L G., PEREIRA, R F A., DO VALLE A.M., ANDRE L.S.P., SCAFFO J., PINHEIRO F.R., RIBEIRO T.A.N., SACHS D., PASCOAL, A.C.R.F. P., BOECHAT N., AGUIAR-ALVES F. Synthesis of benzoylthiourea derivatives and analysis of their antibacterial performance against planktonic *Staphylococcus aureus* and its biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, 2020.

PRIYANTHA, R.; GAUNT, M. C.; RUBIN, J. E. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* Colonizing Healthy Dogs in Saskatoon, Canada. **Canine Veterinary Journal**, n. 57, p. 65–69, 2016.

RABANAL, R.M. et al. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 297-292. 2002.

RAVENS, P. A. .; VOGELNEST, L. J. .; EWEN, E. .; BOSWARD, K. L. .; NORRIS, J. M. Canine superficial bacterial pyoderma: evaluation of skin surface. [s. l.], v. 92, n. 5, p. 149–155, 2014.

RIEGEL P, JESEL-MOREL L, LAVENTIE B, BOISSET S, VANDENESCH F, PRÉVOST G. Coagulase positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. **Int J Med Microbiol.** 301:237–9. 2011.

ROBSON, N. K. B.; Bulletin of the British Museum (**Natural History**), v.1, n.20, 1990.
ROCHA, Leandro. Investigation phytochimique de *Hypericum brasiliense* (Guttiferae). Tese de doutorado. Intitut de Pharmacognosie et Phytochimie, Univestite de Lausanne, Suisse, 1995.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; STOECKLIEVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**. n. 40, p. 1447-1452, 1995.

ROCHA, L.M.; RUPPELT, B.; KAPLAN, M.A.; PEREIRA, N.A.; **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 72, p. 67, 1991.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M.A C.; STOECHLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K.; **Phytochemistry**, n.36, p.1381, 1994.

ROZATTO MR. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP. 101p. 2012.

SADDIQE, Z., NAEEM, I., & MAIMOONA, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, 131(3), 511–521. doi:10.1016/j.jep.2010.07.034

SANTOS, A.L; et al. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423. 2007

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SHARIFI, A., MOHAMMADZADEH, A., ZAHRAEI SALEHI, T., & MAHMOODI, P. Antibacterial, antibiofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, 124(2), 379–388. 2018. doi:10.1111/jam.13639

SINGH, A.; WALKER, M.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Characterization of the Biofilm Forming Ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from Dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 93, 2013.

SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M. A. R.; RUBIN, J. E.; CHURCH, D. Human Infections due to *Staphylococcus Pseudintermedius*, an Emerging Zoonosis of Canine Origin: Report of 24 Cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 471–476, 2016.

SPEZIALE S.W.; P., T.J FOSTER. Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of *Staphylococcus aureus* with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. **Microbiology** 156: 920–928. 2010.

STEGMANN R, BURNENS A, MARANTA CA, PERRETEN V. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **J Antimicrob Chemother** ;65:2047–8. 2010.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. Di; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates. **Apmis**, [s. l.], v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. [S.l.: s.n.], 2012.

SWE, T.; NAING, A. T.; BAQUI, A.; KHILLAN, R. Methicillin-Resistant *Staphylococcus schleiferi* Subspecies *coagulans* Infection in a Patient With Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 4, n. 3, p. 232470961667114, 2016.

TEIXEIRA, I. M.; DE OLIVEIRA FERREIRA, E.; DE ARAÚJO PENNA, B. Dogs as reservoir of methicillin resistant coagulase negative staphylococci strains – A possible neglected risk. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 135, n. July, p. 103616, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103616>>

TRASTOY R, MANSO T, FERNÁNDEZ-GARCÍA L, BLASCO L, AMBROA A, PÉREZ DEL MOLINO ML, BOU G, GARCÍA-CONTRERAS R, WOOD TK, TOMÁS M. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. **Clin Microbiol Rev** 31:e00023-18. 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-18>.

TRENTIN DS, GIORDANI RB, ZIMMER KR, DA SILVA AG, SILVA MV, CORREIA MTS, BAUMVOL IJR, MACEDO AJ. Potential of medicinal plants from the Brazilian semiarid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**. v.137(1), p.327-335. 2011.

WAGNER H.; WISENAUER M., Fitoterapia - Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas. 2 ed. São Paulo: **Pharmabook**. 2006.

WINDAHL, U.; AGREN, J.; HOLST, B. S.; BORJESSON, S. Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* in Multi-Dog Households: A Longitudinal Study Using Whole Genome Sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 189, p. 8–14, 2016.

VANDENESCH, F.; LEBEAU, C.; BES, M.; LINA, G.; LINA, B.; GREENLAND, T.; BENITO, Y.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J.; ETIENNE, J. Clotting activity in *Staphylococcus schleiferi* subspecies from human patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 388–392, 1994.

VAN DUIJKEREN, E.; CATRY, B.; GREKO, C.; MORENO, M. A.; POMBA, M. C.; PYÖRÄLÄ, S.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E. J.; TORRENEDO, J.; TÖRNEKE, K. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 2705–2714, 2011.

VANNI, M.; TOGNETTI, R.; PRETTI, C.; CREMA, F.; SOLDANI, G.; MEUCCI, V.; INTORRE, L. Research in Veterinary Science Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Isolated from Dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 192–195, 2009.

VAN HOOVELS L, VANKEERBERGHEN A, BOEL A, VAN VAERENBERGH K, DE BEENHOUWER H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. **J Clin Microbiol** ;44:4609–12. 2006

VERÇOZA GL.; FEITOZA DD.; ALVES AJ.; AQUINO TM.; LIMA JG. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. **Química Nova**. 32(6): 1405-1410. 2009.

WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 200, p. 71–78, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.017>>

WANG N, NEILAN AM, KLOMPAS M. *Staphylococcus intermedius* infections: case report and literature review. **Infect Dis Rep** 5:e3. 2013.

WEESE, J.; ROUSSEAU, J.; KADLEC, K.; GUPTIL, L.; GOERING, R.; SCHWARZ, S. Direct repeat unit (dru) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from North America and Europe. In: Abstracts of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases Conference; San Francisco; 2012 Nov 14–17. Davis (CA): **International Society for Companion Animal Infectious Diseases**; 2012.

WEESE JS, VAN DUIJKEREN E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet Microbiol**.140:418–29. 2010.

WFO – World Flora Online. An international initiative of the global partnership for plant conservation. Disponível em: <http://about.worldfloraonline.org/> Acesso em: 06 ago 2020.

WHO – World Health Organization – What is antimicrobial resistance? 2017. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/75/en/> Acesso em: 09 out 2020.

WHO – World Health Organization - Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 48pag. 2019.

WOLSKA KI, GRUDNIAK AM, RUDNICKA Z, MARKOWSKA K. Genetic control of bacterial biofilms. **J Appl Genet** ;57:225–38. 2016

YARWOOD, J.M.; BARTELS, D.J.; VOLPER, E.M.; GREENBERG, E.P. *Quorum sensing* in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Bacteriol** 186: 1838–1850. 2004.

VINCENT O. M.; NGUTA J. M.; MITEMA E. S.; MUSILA F. M.; NYAK D. M.; MOHAMMED A. H.; GERVASON M. A. Ethnopharmacology, pharmacological

activities, and chemistry of the Hypericum genus. **The Journal of Phytopharmacology**, 2021;10(2):105-113 DOI: 10.31254/phyto.2021.10206

9. APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice 1 - Réplicas utilizadas para a elaboração dos gráficos do experimento biofilme em formação. Leitura realizada em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm.

Biofilme em formação	<i>Hypericum brasiliense</i>			Vancomicina			Controle Negativo		
ED99 CMI	0,0855	0,0435	0,1015	0,09	0,09	0,064			
ED99 ½ CMI	0,082	0,079	0,098	2,688	2,519	2,28	2,237	2,238	2,241
ED99 ¼ CMI	0,079	0,074	0,13	2,096	2,335	2,234			
ED99 ⅛CMI	0,084	0,053	0,12	2,138	2,307	2,042			
SD84 CMI	0,125	0,031	0,083	2,731	2,678	2,483			
SD84 ½ CMI	0,0855	0,0895	0,0935	1,975	2,714	2,39	1,946	1,947	1,946
SD84 ¼ CMI	0,1175	0,0595	0,0935	2,375	2,57	2,002			
SD84 ⅛CMI	0,067	0,126	0,078	1,53	0,1424	2,07			
SD42 CMI	0,031	0,07	0,105	0,396	0,25	0,788			
SD42 ½ CMI	0,067	0,065	0,113	0,596	0,588	0,443	1,991	1,990	1,1991
SD42 ¼ CMI	0,0985	0,0785	0,0985	1,276	0,896	0,636			
SD42 ⅛CMI	0,0815	0,0885	0,0965	0,708	0,597	1,552			

Apêndice 2 - Réplicas utilizadas para a elaboração dos gráficos do experimento

biofilme pré formado jovem. Leitura realizada em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm.

Biofilme pré formado jovem	<i>Hypericum brasiliense</i>			Vancomicina			Controle Negativo		
	ED99 2X CMI	0,642	0,769	0,587	0,565	0,46	0,521		
ED99 CMI	0,713	0,574	0,681	2,775	4,706	4,724	1,7956	1,7956	1,7956
ED99 ½ CMI	0,5765	0,7925	0,8325	2,678	4,764	4,782			
ED99 ¼ CMI	0,661	0,552	0,715	2,716	3,705	3,422			
SD84 2X CMI	0,934	0,75	0,799	1,523	1,719	1,413			
SD84 CMI	0,525	0,441	0,636	2,532	1,773	2,001	2,566	2,489	1,754
SD84 ½ CMI	0,229	0,67	0,597	2,234	2,31	2,443			
SD84 ¼ CMI	0,6135	0,7815	0,6905	1,385	2,849	2,458			
SD42 2X CMI	0,5305	0,5315	0,2955	1,85	0,632	1,099			
SD42 CMI	0,328	0,275	0,442	2,56	2,636	2,373	2,704	3,334	2,369
SD42 ½ CMI	0,4625	0,5605	0,5025	2,698	2,649	2,668			
SD42 ¼ CMI	0,9835	0,6815	0,5085	2,92	2,917	2,714			

Apêndice 3 - Réplicas utilizadas para a elaboração dos gráficos do experimento

biofilme pré formado maduro. Leitura realizada em leitor de ELISA (BioTek) a 570nm.

Biofilme pré formado maduro	<i>Hypericum brasiliense</i>			Vancomicina			Controle Negativo		
	ED99 2X CMI	0,4285	0,7955	0,9605	2,412	2,294	2,282		
ED99 CMI	0,862	1,082	0,778	2,474	2,354	2,337	1,9246	1,9246	1,9246
ED99 ½ CMI	0,9985	1,1715	1,2405	2,192	2,151	2,473			
ED99 ¼ CMI	0,3755	1,1855	0,7775	2,35	2,273	2,425			
SD84 2X CMI	0,075	0,055	0,075	0,184	0,223	0,151			
SD84 CMI	0,131	0,131	0,123	0,185	0,141	0,162	0,159	0,159	0,159
SD84 ½ CMI	0,1645	0,1395	0,1285	0,138	0,172	0,176			
SD84 ¼ CMI	0,1565	0,1545	0,1355	0,148	0,198	0,156			
SD42 2X CMI	0,585	0,34	0,429	2,715	2,926	2,606			
SD42 CMI	2,749	2,646	2,845	2,848	3,013	2,825	2,556	3,018	2,928
SD42 ½ CMI	2,564	2,683	2,272	2,712	2,923	2,395			
SD42 ¼ CMI	2,569	2,38	2,62	2,853	2,939	2,83			