# Universidade Regional do Cariri – URCA

## Chamada CNPq/MCTIC/BRICS-STI Nº 03/2019

**Área Temática**: Biotecnologia e biomedicina, incluindo saúde humana e neurociência.

Henrique Douglas Melo Coutinho
(Coordenador e Pesquisador)

Link para acessar o Currículo Lattes:
http://lattes.cnpq.br/3199766197573928

# AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTRA LINHAGENS DE *Burkholderia* spp.

**Palavras chaves:** *Burkholderia* spp., Resistência Bacteriana, Novos antibióticos naturais e sintéticos.

**Área do conhecimento predominante:** Biotecnologia

**Àreas do conhecimento correlatas:** Biotecnologia de Recursos Naturais; Doenças Infecciosas e Parasitárias; Doenças Infecciosas de Animais.

Crato-Ceará
Maio 2019

## SUMÁRIO


- **INFORMAÇÕES DOS MEMBROS DA EQUIPE BRASILEIRA PARTICIPANTES DO PROJETO.....2**
- **DADOS DO PROPONENTE.....5**
- **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES NO BRASIL.....6**
- **INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE NA CHINA.....7**
- **INFORMAÇÕES DOS MEMBROS DA EQUIPE DA CHINA PARTICIPANTES DO PROJETO (CURRÍCULOS RESUMIDOS DOS INTEGRANTES DA EQUIPE DA CHINA).....8**
- **INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE NA ÍNDIA.....8**
- **INFORMAÇÕES DOS MEMBROS DA EQUIPE DA ÍNDIA PARTICIPANTES DO PROJETO (CURRÍCULOS RESUMIDOS DOS INTEGRANTES DA EQUIPE DA ÍNDIA).....8**
- **RESUMO DO PROJETO.....10**
- **IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA COM DESCRIÇÃO DO PROJETO COOPERATIVO DE PESQUISA.....12**
- **SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTRA LINHAGENS DE *BURKHOLDERIA* spp. .....15**
- **INTERAÇÃO A SER CRIADA PELA ATIVIDADE CONJUNTA DE PESQUISA .....17**
- **OBJETIVO GERAL.....18**
- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....18**
- **METODOLOGIA E DISPONIBILIDADE EFETIVA DE INFRAESTRUTURA PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO.....18**
- **CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....28**
- **PLANO DE PESQUISA.....29**
- **RELEVÂNCIA E IMPACTO DO PROJETO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO OU DE INOVAÇÃO .....30**
- **PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DO PROJETO DE PESQUISA.....30**
- **PERSPECTIVAS CONCRETAS DE COLABORAÇÕES INTERNACIONAIS DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO .....31**
- **COLABORAÇÕES OU PARCERIAS JÁ ESTABELECIDAS PARA EXECUÇÃO DE ATIVIDADES EM REDE.....31**
- **RECURSOS FINANCEIROS DE OUTRAS FONTES APROVADOS PARA APLICAÇÃO NO PROJETO.....34**
- **ORÇAMENTO DETALHADO.....36**
- **REFERÊNCIAS .....38**

## INFORMAÇÕES DOS MEMBROS DA EQUIPE BRASILEIRA PARTICIPANTES DO PROJETO

**Coordenador e Pesquisador:** Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
CPF: 567.670.564-72
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/3199766197573928
Atividades: Coordenação e Pesquisa. Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador**: Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
CPF: 232.480.763-72
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/6262682265095238
Atividade: Caracterização estrutural e espectroscópica de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador:** Dr. Diniz Maciel de Sena Junior
CPF: 678.673.673-49
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/3040267502248395
Atividade: Análise de Estrutura-Atividade por dinâmica molecular e docking molecular.

**Pesquisador**: Dr. Edilberto Rocha Silveira
CPF: 059.118.343-91
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/2646626586269060
Atividade: Caracterização estrutural por RMN de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador**: Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha
CPF: 171.255.454-91
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/3887831555602065
Atividades: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador**: Dr. Hélcio Silva dos Santos
CPF: 770.450.503-30
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/3478842054984497
Atividades: Isolamento de produtos naturais de plantas e síntese de novos compostos orgânicos.

**Pesquisador**: Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
CPF: 880.930.854-91
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/6310868104861653
Atividades: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas e Análise de Estrutura-Atividade por docking molecular.

**Pesquisador**: Dr. Jaime Ribeiro Filho
CPF: 005.343.193-60
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/5885477643638071
Atividades: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador**: Dr. José Galberto Martins da Costa
CPF: 221.096.763-53
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/2559117122403017
Atividades: Isolamento de produtos naturais de plantas e síntese de novos compostos orgânicos.

**Pesquisadora:** Dra**.** Maria Flaviana Bezerra Morais Braga
CPF: 403.805.213-34
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/1557613482101211

Atividades: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisadora**: Dra**.** Marta Regina Kerntopf
CPF: 426.940.193-15
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/9077694744752087
Atividades: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador**: Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire
CPF: 228.469.303-25
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/5396850632263675.
Atividade: Caracterização estrutural e espectroscópica de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisador:** Dr. Paulo Nogueira Bandeira
CPF: 088.381.273-87
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/7212288309449337
Atividade: Isolamento de produtos naturais de plantas e síntese de novos compostos orgânicos.

**Pesquisadores e Pesquisadoras (Estudantes de Doutorado da Equipe do Brasil)**

1. Janaina Esmeraldo Rocha
CPF: 010.013.423-80
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/4919818595808096
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.
2. Jayze da Cunha Xavier
CPF: 950.189.133-04
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/0776521748147834
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.
3. Nadghia Figueiredo Leite
CPF: 026.996.683-89
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/1199949116966674
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.
4. Silvia Sousa Aquino
CPF: 049.427.183-33
Link para o Lattes: http://lattes.cnpq.br/5025372611879080
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

## DADOS DO PROPONENTE

Eu, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, portador do CPF: 567.670.564-72 e do Currículo Lattes disponível no link: http://lattes.cnpq.br/3199766197573928 sou proponente e Coordenador Geral deste projeto submetido à Chamada CNPq/MCTIC/BRICS-STI Nº 03/2019. Possuo graduação em Ciências Biológicas pela UFPB (1996), Mestrado em Genética pela UFPB (2001) e Doutorado em Farmacologia pela UFPB (2008). Atualmente sou Professor Associado da Universidade Regional do Cariri (URCA). Tenho experiência na área de Genética e Microbiologia, com ênfase em Genética Molecular e de Microorganismos, atuando principalmente nos seguintes temas: Análise molecular e mecanismos de resistência a antibióticos, Ecologia de microrganismos do solo e avaliação da atividade antimicrobiana intrínseca ou associadas a substâncias naturais ou sintéticas. Nos últimos anos tenho desenvolvido trabalhos em parceria com pesquisadores da China, Índia, França e Espanha, com pesquisadores de diversas Universidades Brasileiras. Publiquei em colaboração 277 artigos em revistas indexadas que conta com 2182 citações na *Web of Science*, e meu índice H é 21. Atualmente sou Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica/URCA, Líder do Grupo de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, cadastrado no CNPq e Coordenador do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM/URCA. Sou Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica/URCA, do Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza - PPGEtno/URCA/UEPB/UFRPE e do Programa de Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO - Polo UECE). Também sou Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular - PPBM/URCA. Orientei 24 Dissertações de Mestrado, 06 Teses de Doutorado e supervisionei um Projeto de Pós-Doutorado. Possuo uma patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o título: "Avaliação da atividade moduladora de vitaminas lipossolúveis caracterizada", sob o número de registro: BR1020120283603. Sou revisor de periódicos internacionais e membro do corpo editorial dos periódicos: *Ethnobiology & Conservation* e *Journal of Biologically Active Products from Nature*. Também tenho atuado como avaliador de projetos das agências de fomento: CNPq, FUNCAP e CAPES.

## INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES NO BRASIL

1) Instituição executora nacional:

- **Universidade Regional do Cariri (URCA)** – As atividades de pesquisas serão desenvolvidas nas dependências dos Laboratórios do Departamento de Química Biológica. Endereço: Rua Cel. Antônio Luis, 1161 - 63.105-000 - Pimenta – Crato-CE – Brasil. Site da Instituição: http://www.urca.br/novo/portal/. Contatos: e-mail do Coordenador do Projeto Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho: hdmcoutinho@gmail.com; Fone/FAX: +55 (88) 3102.1294.

2) Instituições co-financiadoras nacionais alocando recursos humanos e infraestrutura de pesquisa, na execução de partes do projeto:

- **Universidade Federal do Ceará (UFC)**

Anuências dos Pesquisadores e Infraestrutura de Pesquisa:

✓ Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire, Professor Titular da Universidade Federal do Ceará e Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri (URCA). CPF: 228.469.303-25; Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/5396850632263675; E-mail: tarso@fisica.ufc.br. Infraestrutura de Pesquisa : Laboratório de cristalografia estrutural e Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Laboratório de cristalografia estrutural entre outros necessários a execução deste projeto (http://www.fisica.ufc.br/wp/?page_id=2455).

✓ Dr. Edilberto Rocha Silveira, Professor Titular da Universidade Federal do Ceará e Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri (URCA). CPF: 228.469.303-25; Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/2646626586269060; E-mail: edil@ufc.br. Infraestrutura de Pesquisa : Laboratório Multiusuário do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM).

- **Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)**

Anuência de Pesquisador e Infraestrutura de Pesquisa:

✓ Dr. Hélcio Silva dos Santos, Professor Associado da Universidade Estadual Vale do Acaraú –(UVA) e Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri (URCA). CPF: 770.450.503-30; Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/3478842054984497 E-mail: helciodossantos@gmail.com. Infraestrutura de Pesquisa: Laboratório de Química Orgânica.

✓ Dr. Paulo Nogueira Bandeira, Professor Associado da Universidade Estadual Vale do Acaraú –(UVA). CPF: 088.381.273-87; Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/7212288309449337. E-mail: bandeirapn@yahoo.com.br. Infraestrutura de Pesquisa: Laboratório de Química Orgânica.

- **Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) -Salvador-BA.**

✓ Dr. Jaime Ribeiro Filho, Pesquisador em Saúde Pública da Fiocruz. CPF: 005.343.193-60. Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/5885477643638071; E-mail: jaime.ribeiro@fiocruz.br.

## INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE NA CHINA

**Universidade de Macau, Macau, China**. As atividades de pesquisas serão desenvolvidas nas dependências da *Institute of Chinese Medical Sciences* da *University of Macau*, China. Site da Instituição: https://www.um.edu.mo/pt-pt/campus/campus.html; https://www.um.edu.mo/zh-hant/;
Endereço Institucional: 中國澳門氹仔大學大馬路 AVENIDA DA UNIVERSIDADE, TAIPA, MACAU, CHINA
電話 Tel.: 8822 8833 傳真 Fax.: 8822 8822.

## INFORMAÇÕES DOS MEMBROS DA EQUIPE DA CHINA PARTICIPANTES DO PROJETO (CURRÍCULOS RESUMIDOS DOS INTEGRANTES DA EQUIPE DA CHINA)

**Pesquisador:** Prof. Dr. Jianbo Xiao, é Professor Adjunto da Universidade de Macau na China. Possui graduação em Química Analítica (2001) pela *Yancheng Institute of Technology*, China, Mestre em Química Orgânica (2005) pela *Central South University*, China e Doutorado em Ciências Nutricionais (2009) pela *Okayama Prefectural University*, Japão. Publicou71 artigos científicos em periódicos internacionais que conta com 5881 citações na *Web of Science*, e seu índice H é 36. É autor correspondente e/ou primeiro auto em 101 desses artigos. Vale ressaltar que 28 artigos foram selecionados como mais altamente citados no ESI. Revisou mais de 500 manuscritos para periódicos internacionais tais como: Journal of Agricultural and Food Chemistry, Food Chemistry, Food Research International, Food & Function, Molecular BioSystems, Pharmaceutical Research, Analytica Chimica Acta and Journal of Chromatography A. Foi agraciado com o prêmio Peer Review Award 2018 (Top reviewer) da Publons e da American Chemical Society nos anos 2011 à 2013. É editor para dos seguintes periódicos internacionais:

2019.04- Editor-in-Chief, Food Frontiers (New journal on Wiley)
2017.04- Associate Editor, Journal of Berry Research (IF 2.175)
2017.01- Associate Editor, Phytochemical Analysis (IF 2.337)
2019.05- Editorial board, Current Research in Biotechnology (New journal on Elsevier)
2019.02- Editorial board, Phytochemistry (IF 3.186)
2018.07- Editorial board, Environmental Toxicology and Pharmacology (IF 2.776)
2018.05- Editorial Board, Heliyon (SCIE index)
2018.02- Editorial Board, Food Chemistry (IF 4.946)
2018.01- Editorial Advisory Board, Critical Reviews in Food Science and Nutrition (IF 6.202)
2017.11- Editorial Board, Food and Chemical Toxicology (IF 3.977)
2017.04- Editorial Board, International Journal of Molecular Sciences (IF 3.687)
2016.04- Editorial Board, Research Journal of Pharmacognosy (SCIE index)
2015.08- Editorial Board, Industrial Crops and Products (IF 3.849)
2015.07- Editorial Board, Molecules (IF 3.098)
2015.05- Editorial Board, Phytomedicine (IF 3.61)

ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3311-770X.
**Tel:+853-88228522; Mobile:+853-65718163;**

**E-mail: jianboxiao@yahoo.com**; **jianboxiao@umac.mo.**
Site da Instituição: https://www.um.edu.mo/pt-pt/campus/campus.html; https://www.um.edu.mo/zh-hant/;
Endereço Institucional: 中國澳門氹仔大學大馬路 AVENIDA DA UNIVERSIDADE, TAIPA, MACAU, CHINA
電話 Tel.: 8822 8833 傳真 Fax.: 8822 8822

**Pesquisadores e Pesquisadoras (Estudantes de Doutorado da Equipe da China)**

**Pesquisador:** M.Sc. Minglong Wang, é orientando de Doutorado do Prof. Dr. Jianbo Xiao na University of Macau, Macau, China

**Pesquisadora:** M.Sc. Lingchao Miao, é orientando de Doutorado do Prof. Dr. Jianbo Xiao na University of Macau, Macau, China.

## INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE NA ÍNDIA

- **St. Xavier's College (Autonomous)** afiliada da Universidade de Manonmaniam Sundaranar na Índia – As atividades de pesquisas serão desenvolvidas nas dependências no *Centre for Plant Biotechnology – Department of Botany.* Endereço: 12B/1 Saint Paul's Road, Palayamkottai, Tirunelveli- 627 002, Tamil Nadu – Índia. Site da Instituição: http://stxavierstn.edu.in/. Contatos: e-mail Dr. Johnson Antonysamy: ptcjohnson@gmail.com; FAX: +91 462 25551123, Mob: +91 9786 9243 34.

## INFORMAÇÕES DOS MEMBROS DA EQUIPE DA ÍNDIA PARTICIPANTES DO PROJETO (CURRÍCULOS RESUMIDOS DOS INTEGRANTES DA EQUIPE DA ÍNDIA)

**Pesquisador:** Dr. Johnson Marimuthu Alias Antonisamy concluiu seu doutorado em 2003 pela Universidade de Manonmaniam Sundaranar na Índia. Seu trabalho de tese intitulada: "*In Vitro* studies on Some Rare and Endangered Ferns of Western Ghats" foi premiada no ano de 2004. Atualmente é Professor Assistente e Diretor do Centre for Plant Biotechnology – Department of Botany da St. Xavier's College (Autonomous) afiliada da Universidade de Manonmaniam Sundaranar na Índia. Publicou em colaboração 224 artigos em revistas indexadas, 31 capítulos de livros e submeteu 31 Sequências de Gene submetidas no Gen Bank. Os principais projetos desenvolvidos foram: (i) CSIR Sponsored - Large scale propagation and restoration of medicinally important ferns of the Western Ghats, India; (ii) DBT Sponsored - Morpho-Anatomical and Histochemical Studies on Pteridophytes using Foldscope; (iii) UGC Sponsored - Ex situ Conservation through in vitro propagation and restoration of medicinally important risky Ferns of the Western Ghats, India (iv) SERB

Sponsored - Micropropagation and restoration of medicinally important Ferns of the Western Ghats, India.
Perfil no ResearchGate:
https://www.researchgate.net/profile/Johnson_Marimuthu_Alias_Antonisamy.
Endereço Institucional: St. Xavier's College (Autonomous) - Centre for Plant Biotechnology – Department of Botany - 12B/1 Saint Paul's Road, Palayamkottai, Tirunelveli- 627 002, Tamil Nadu – Índia.
Site da Instituição: http://stxavierstn.edu.in/.
Contatos: e-mail ptcjohnson@gmail.com;
FAX: +91 462 25551123; Mob: +91 9786 9243 34.
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisadores e Pesquisadoras (Estudantes de Doutorado da Equipe da Índia)**

**Pesquisadora**: M.Sc. Vidyarani George é orientanda de Doutorado do Prof. Dr. Johnson Marimuthu Alias Antonisamy na St. Xavier's College (Autonomous) desenvolvendo o projeto: Molecular Ontogeny of Selected Pteridophytes. Ela tem experiência nas técnicas de Isolamento de DNA, Eletroforese, Cromatografia, Preparo médio e inoculação. Publicou em colaboração 07 artigos em revistas indexadas. Foi agraciada com o 1º prêmio na competição Quiz durante a Conferência Nacional sobre Biotecnologia Aplicada realizada pela Universidade de Manonmaniam Sundaranar, Tirunelveli, Índia.
E-Mail: vidyapgb06@gmail.com
Fone: +91-7871268012
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

**Pesquisadora**: M.Sc. I. Silvia Juliet é orientanda de Doutorado do Prof. Dr. Johnson Marimuthu Alias Antonisamy na St. Xavier's College (Autonomous). Ela tem experiência nas técnicas de Isolamento de DNA, Eletroforese, Cromatografia, Preparo médio e inoculação. Recebeu o prêmio de melhor pôster na Conferência Internacional de Fitomedicina da Universidade Bharathiar, em Coimbatore, Índia, no ano de 2018.
Endereço: St. Xavier's College (Autonomous) - Centre for Plant Biotechnology – Department of Botany -12B/1 Saint Paul's Road, Palayamkottai, Tirunelveli- 627002
Atividade: Avaliação da atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas.

## RESUMO DO PROJETO

O gênero *Burkholderia* compreende cerca 30 espécies, algumas das quais são patogênicos para humanos, animais ou plantas. Dentre a família Burkholderiaceae, a bactéria *Burkholderia mallei* é a mais conhecida. sendo encontrada no solo, representa um patógeno para diversos mamíferos, inclusive o homem. Essa bactéria é o agente etiológico causador do Mormo, uma zoonose infectocontagiosa, caracterizada por lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas, principalmente em equídeos. As infecções por bactérias do gênero *Burkholderia* são difíceis de tratar através da antibioticoterapia, algumas sendo altamente resistentes a diversos antibióticos. Esta resistência aos antimicrobianos se deve a vários mecanismos, como bombas de efluxo. Devido a isso, uma alternativa viável do ponto de vista econômico é a associação de antibióticos já disponíveis na clínica com produtos de origem natural e sintética como forme de detectar sinergismo entre elas, potencializando a atividade antibacteriana dos antibióticos contra microrganismos. Devido a isso, este projeto visa testar substâncias naturais e sintéticas para verificar sua atividade antibacteriana contra linhagens de *Burkholderia* spp. isoladas de amostras de plantas e de solos de criatórios de animais dos municípios Crato, Juazeiro e Barbalha, localizados na região nordeste do estado do Ceará, Brasil. As atividades serão divididas entre as equipes dos diferentes países da seguinte maneira: No Brasil serão realizados todos os ensaios envolvendo microrganismos; Na Índia serão avaliados os efeitos citotóxicos dos produtos sintéticos e naturais avaliados; Na China, serão realizados os ensaios de modificação de compostos por adição de grupos funcionais por diferentes reações de esterificação, além da complexação com outros compostos e diferente polimeros, como ciclodextrinas. Outro ponto realizado na China são as metodologias analíticas para análise desses novos compostos através de NMR, HPLC e outras metodologias analíticas. As linhagens isoladas terão seu perfil de resistência a aminoglicosídios, macrolídeos e beta-lactâmicos determinado por difusão em disco. As linhagens serão então ensaiadas contra os produtos naturais e sintéticos de forma direta. Em seguida, será avaliada a possibilidade dessa substâncias afetarem os mecanismos de resistência destas linhagens, potencializando a ação do antibiótico. Em caso dos resultados comprovarem a atividade antibiótica e moduladora da ação antibiótica dos produtos testados, isto pode representar uma interessante fonte de compostos com forte aplicação na saúde pública não só

como agentes antibacterianos de uso direto, mas como adjuvantes na antibioticoterapia animal e na prevenção da transmissão dessa zoonose.

## IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA COM DESCRIÇÃO DO PROJETO COOPERATIVO DE PESQUISA

As bactérias do gênero *Burkholderia* compreende um grupo bacteriano que possui 30 espécies, algumas das quais são patogênicos para humanos, animais ou plantas (COENYE et al., 2003). Elas também apresentam grande interesse científico pela sua capacidade em degradar poluentes, produzir compostos antimicrobianos, promover crescimento vegetal, fixar nitrogênio atmosférico e por estarem presentes em vários ecossistemas (GILLIS et al. 1995, COMPANT et al., 2008).

Dentre a família Burkholderiaceae, a bactéria *Burkholderia mallei* é a mais conhecida, além de está presente no solo, e é um patógeno encontrado em mamíferos. Em cavalos e éguas possuem uma alta susceptibilidade à infecção por essa bactéria, sendo também considerados reservatórios naturais, embora outros animais, como mulas e burros também possam ser susceptíveis (TELES et al., 2012). Importante do ponto de vista zoosanitário, essa bactéria é o agente etiológico causador do Mormo, uma doença caracterizada como zoonose, infectocontagiosa, piogranulomatosa (inflamação de caráter purulento), caracterizada por lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas, principalmente em equídeos (asininos, muares e equinos). A doença também é conhecida como catarro de burro, catarro de mormo, lamparão, garrotilho atípico e cancro nasal (MEGID et al., 2016; BERNHARDS et al., 2017). Na equideocultura possui grande importância econômica e social no Brasil e algumas doenças como o Mormo causam prejuízos consideráveis aos proprietários, principalmente, aquelas onde é obrigatória a eutanásia dos animais positivos.

As bactérias *Burkholderia* spp. integrantes do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) podem causar doenças em seres humanos que ficam vulneráveis a infecção bacteriana ( MAHENTHIRALINGAN et al., 2001). Em plantas a bactéria *Burkholderia cepacia* é um patógeno oportunista em enfermos de fibrose cística e apresenta uma grande capacidade degradativa de contaminantes orgânicos.

Segundo a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos feita pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017) a *Burkholderia cepacia* é classificada na classe de risco 2 (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade). Já a *Burkholderia mallei* (Mormo) e *Burkholderia pseudomallei* (Melioidose) estão na classe de risco 3 (alto risco individual e

moderado risco para a comunidade). Estas duas últimas são também classificadas como possíveis agentes microbiológicos que podem ser usadas como armas biológicas (DANCE et al., 2005).

As infecções por bactérias do gênero *Burkholderia* são difíceis de tratar com antibióticos (WHITLOCK et al., 2007). Embora a profilaxia ou terapia eficaz existam para tratamento de algumas doenças contra as linhagens de *Burkholderia* spp., a resistência aos antibióticos por mais que seja um processo natural, vem aumentando de forma acelerada nos últimos anos devido, entre outros fatores, à má utilização dos antimicrobianos, desta forma prejudicando o tratamento, e como consequência aumentando tanto a morbidade quanto a mortalidade nas populações (COUTINHO et al., 2015).

As cepas *Burkholderia cenocepacia* K56-2 e C6433 são altamente resistentes aos antibióticos cefepima, imipenem, ciprofloxacina, amicacina, ticarcilina, ampicilina+sulbactam, aztreonam e rifampicina (SEMLER et al., 2014). Esta resistência aos antimicrobianos ocorre devido a vários fatores, incluindo as mudanças regulatórias e também genéticas, essas envolvem atividades fisiológicas como é o caso das bombas de transporte de membranas que levam à uma expulsão do medicamento. Essas mudanças geneticamente codificadas, podem conferir elevados níveis de resistência a agentes múltiplos ou específicos. Essa resistência é consequência da adaptação evolutiva dos microrganismos e o aumento do uso de antimicrobianos de forma inadequada, tem levado ao rápido aumento da resistência dos microrganismos.

Devido ao uso de antimicrobianos de forma exagerada e indiscriminada houve a dispersão de bactérias resistentes e isso é considerado um problema de saúde pública no mundo todo, onde afeta a efetividade dos antimicrobianos, desta forma, tornando inviável o tratamento de infecções comuns. Ela ocorre através de mutações genéticas sofridas pelos microrganismos, quando os mesmos são expostos as drogas, e essa mutação permite que as bactérias fiquem protegidas dos efeitos do medicamento, impedindo tanto o tratamento da doença quanto à cura (CHENG et al., 2016; WHO, 2009)

A outra parte do problema é que a resistência aos antimicrobianos não é acompanhada do desenvolvimento de novos medicamentos. Isso devido, dentre outras causas, ao tratamento com antimicrobianos terem uma duração mais limitada, dessa forma tornando menos lucrativo

do que outros medicamentos, como para doenças crônicas por exemplo (ZIEMSKA et al., 2013; FAIR e TOR, 2014).

Para a OMS (Organização Mundial de Saúde), a melhor fonte para extrair uma variedade de drogas, deveria ser as plantas, pois no Brasil o sistema de saúde pública não contém uma política farmacêutica que tenha a capacidade de suprir as necessidades medicamentosas existentes da população, em especial na região do Nordeste brasileiro (LOBO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2007).

Devido ao crescente aumento de resistência bacteriana, e as poucas opções para terapia, se faz necessário que haja pesquisas de novos agentes que tenham ação antimicrobiana provindos tantos de extratos vegetais quanto de outros produtos que possuam essa origem, para que os mesmos possam ser utilizados com finalidade farmacêutica, especialmente no Brasil que possui e oferece uma vasta biodiversidade. Neste sentido, várias são as pesquisas que estão sendo desenvolvidas e preparadas a fim de descobrir atividades farmacológicas de novos agentes antibacterianos para serem utilizados em microrganismos que possuem múltipla resistência (PUPO, 2007; OSTROSKY et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011; SHAIK et al., 2014).

Extratos de plantas agem como uma alternativa com finalidade terapêutica para o tratamento de microrganismos resistentes, pois possuem diversas vantagens para esse fim, dentre elas, um efeito colateral menor, uma melhor tolerância ao medicamento, o custo econômico é mais viável, possui melhor aceitação na população por ser utilizado há muito tempo na medicina popular, dentre outros (GUR et al., 2006).

A pesquisa com composto bioativos de origem natural, para prevenção, aplicação e tratamento de doenças em humanos vem cada vez mais aumentando a sua importância. E o potencial destas plantas com atividade antimicrobiana é de grande interesse na área farmacêutica, tanto devido à crescente resistência dos microrganismos a medicamentos tradicionais quanto às inúmeras doenças de origem microbiana (DONADIO et al., 2010; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Alguns dos estudos com plantas medicinais, centralizam-se na bioprospecção de produtos naturais que têm uma origem microbiana, sendo que neste sentido mais de vinte e dois mil metabólitos secundários que possuem bioatividades já foram descritos (BERDY, 2005).

Outra alternativa que possui bastante importância e é viável do ponto de vista econômico é a associação de antibióticos já disponíveis na clínica com produtos de origem natural, uma vez que eles podem apresentar sinergismo, dessa forma, proporcionando uma potencialização da atividade antibacteriana contra microrganismos tanto sensíveis quanto resistentes, servindo como uma estratégia nova para tratar pacientes com infecções e também combater cepas multirresistentes (KUMAR et al., 2009).

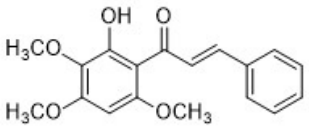
Atividades sinérgicas de pares de agentes antimicrobianos contra complexo de *Burkholderia cepacia* isolados de pacientes com fibrose cística são raramente verificadas (ZHOU et al., 2007). Daí a importância de investigar além da atividade antibacteriana direta de novas substâncias naturais e sintéticas contra linhagens de *Burkholderia* spp., também investigar a atividade modificadora da ação antibiótica quando associadas com antibióticos visando diminuir a resistência bacteriana à cepas resistentes de espécies do gênero *Burkholderia*.

## SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTRA LINHAGENS DE *BURKHOLDERIA* SPP.

A biodiversidade provê espécies que possuem substâncias biologicamente ativas as quais podem servir direta ou indiretamente para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de novas substâncias (FELLOWS, 1992).

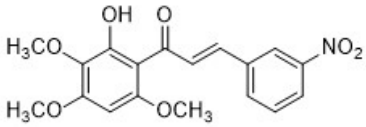
Estudos anteriores colocam o *Croton anisodontus* Müll.Arg. como uma fonte alternativa de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona com potencial atividade antibacteriana (OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2019). Recentemente, temos realizado modificações moleculares na estrutura do composto natural 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona derivado de *Croton anisodontus* Müll.Arg. que resultou na síntese de quinze chalconas. As chalconas pertencem a uma classe privilegiada na química medicinal (ZHUANG et al., 2017), e por essa razão são candidatas promissoras para os testes de atividade propostos neste projeto. Portanto, iniciaremos os nossos trabalhos com essas chalconas, cujas estruturas e seus nomes químicos são apresentados abaixo.

**CHALCONA BENZALDEIDO**

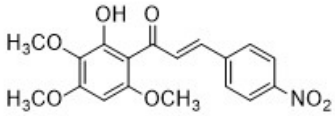


(E) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-fenilprop-2-en-1-ona

**CHALCONAS COM GRUPO NITRO**

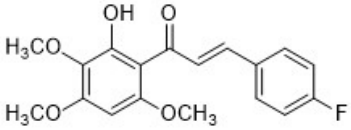


(E) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3- (3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona

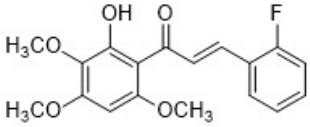


(E) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-(4-nitrofenil) prop-2-en-1-ona

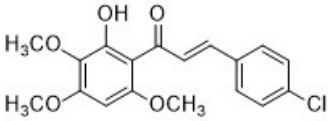
**CHALCONAS COM HALOGÊNIOS**



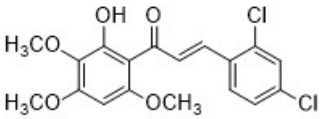
(E) -3- (4-fluorofenil) -1- (2-hidroxi-3,4,6- trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona



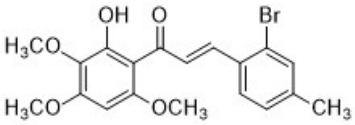
(E) -3- (2-fluorofenil) -1- (2-hidroxi-3,4,6- trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona



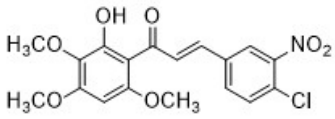
(E) -3- (4-clorofenil) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona



(E) -3- (2,4-diclorofenil) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona

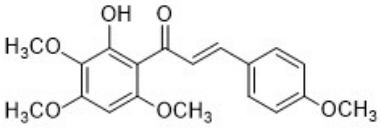


(E) -3- (2-bromo-4-metilfenil) -1- (2-hidroxi-3,4,6- trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona

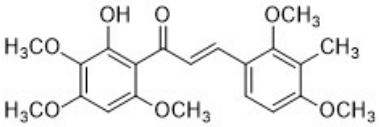


(E) -3- (4-Cloro-3-nitrofenil) -1- (2-hidroxi-3,4,6- trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona

**CHALCONAS COM GRUPO METÓXI**

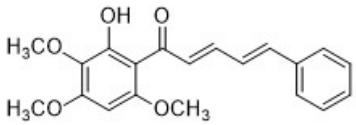


(E) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3- (4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona



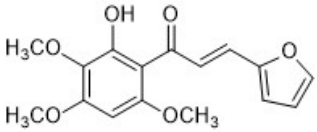
(E) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3- (2,4-dimetoxi-3-metilfenil) prop-2-en-1-ona

**CHALCONA CINAMALDEIDO**

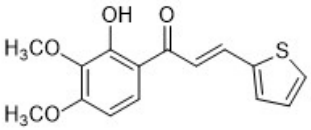


(2E, 4E) -1- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona

**CHALCONAS COM HETEROCICLO AROMÁTICO**

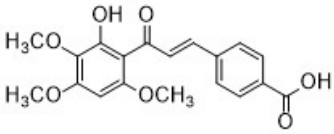


(E) -3- (furan-2-il) -1- (2-hidroxi-3,4,6- trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona



(E) -1- (2-hidroxi-3,4-dimetoxifenil) -3- (tiofen-2-il) prop-2-en-1-ona

**CHALCONA COM GRUPO CARBOXILA**



4 - ((E) -3- (2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-oxoprop-1- enil) ácido benzóico

Ao longo do desenvolvimento deste projeto serão obtidas outras substâncias orgânicas naturais e sintéticas que serão usadas nos testes de atividade antibacteriana contra linhagens de *Burkholderia* spp. Dentre elas: extratos e óleos essenciais, compostos naturais isolados extraídos de plantas, substâncias sintéticas derivadas de produtos naturais e de compostos sintéticos derivados de outros compostos sintéticos.

## INTERAÇÃO A SER CRIADA PELA ATIVIDADE CONJUNTA DE PESQUISA

A interação a ser criada pela atividade conjunta de pesquisa com as equipes de pesquisadores da China e da Índia tem como propósito:

i. Unir esforços para descobrir novos medicamentos antibacterianos contra linhagens de *Burkholderia* spp.;
ii. Estabelecer colaborações que proporcione o intercâmbio de alunos e professores-pesquisadores das instituições integrantes deste projeto. Esta colaboração deverá ocorrer tanto nos aspectos da troca de conhecimentos e ideias, mas também na utilização da infraestrutura pertencentes às instituições colaboradoras. Também poderá contribuir para capacitação de recursos humanos no Brasil, na Índia e na China;
iii. Propor pesquisas inovadoras que se adequem às necessidades e possibilidades de pesquisa dos países integrantes desta proposta para produzir novos conhecimentos e produtos agregados ao uso sustentável dos recursos naturais;
iv. Publicações conjuntas com pesquisadores da Índia e da China em periódico de circulação internacional com alto valor de impacto;
v. Patenteamento de bioproduto(s) gerado(s) das atividades desenvolvidas no âmbito deste projeto.

## OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas contra linhagens de *Burkholderia* spp.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar por técnicas de determinação estrutural, espectroscópica e cálculos computacionais (Docking Molecular, Dinâmica Molecular e/ou *ab initio*) as amostras de substâncias naturais extraídas de plantas e obtidas por métodos de síntese.
- Avaliar a atividade antibacteriana de substâncias naturais e sintéticas contra linhagens de espécies de *Burkholderia*;
- Avaliar a atividade modificadora da ação antibiótica de substâncias naturais e sintéticas quando associados com antibióticos visando a diminuir a resistência bacteriana à cepas resistentes de espécies de *Burkholderia*.

## METODOLOGIA E DISPONIBILIDADE EFETIVA DE INFRAESTRUTURA PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

**Caracterização das substâncias naturais e sintéticas**

As substâncias naturais e sintéticas serão caracterizadas por técnicas de determinação estrutural, espectroscópicas e cálculos computacionais (Docking Molecular, Dinâmica Molecular e/ou *ab initio*) pelos membros das equipes que possuem a infraestrutura e têm expertise nestas áreas do conhecimento.

**Obtenção dos extratos e isolamento dos metabólitos secundários das plantas**

O material vegetal coletado será constituído de folhas, caule, raízes, flores e frutos no ato da coleta será feita a exsicata da amostra vegetal, que consiste na separação das partes

aéreas da planta com flores e frutos condição esta fundamental para a determinação inequívoca do gênero e espécie da planta, esta amostra será enviada aos herbários das Universidade Federal do Ceará e Universidade Estadual Vale do Acaraú e da Universidade Regional do Cariri para a identificação botânica do material vegetal. Em seguida será seco à temperatura ambiente, triturado e submetido a extração à frio, com hexano e etanol. As soluções obtidas serão destiladas sob pressão reduzida, à temperatura média de 60 °C, para obtenção dos extratos hexânico e etanólico. Cada extrato será adsorvido em quantidade apropriada de sílica-gel por meio de atrito mecânico em gral de porcelana e acondicionado sobre silica-gel em coluna cromatografica e eluído com hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, para obtenção dos respectivos eluatos. Os metabólitos secundários existentes nos eluatos serão isolados e purificados após sucessivos tratamentos cromatográficos, onde os eluatos serão adsorvidos e empacotados em colunas cromatográficas contendo silica-gel. O comprimento e diâmetro das colunas irão variar de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia. As quantidades de sílica-gel utilizadas serão variáveis para cada fracionamento, conforme a quantidade e o grau de pureza da amostra. Os fracionamentos cromatográficos serão acompanhados através da obtenção de frações, as quais serão reunidas conforme semelhança dos perfis revelados através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). As revelações das substâncias nas cromatoplacas analíticas serão realizadas por meio da exposição destas, com solução de vanilina, seguida de aquecimento.

**Obtenção de substâncias sintéticas**

As substâncias sintéticas serão obtidas por meio de reações convencionais ou por novas metodologias a serem estabelecidas nos procedimentos usados para realização das modificações moleculares desejadas. Os desenvolvimentos das reações serão monitoradas por meio de CCD. A purificação dos produtos finais serão realizadas usando-se cromatografia em coluna de sílica gel..

**Obtenção e análise de óleos essenciais**

O material vegetal será submetido ao processo de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger por 2 h. O óleo obtido será seco com sulfato de sódio anidro ($Na_2SO_4$) e mantido sob refrigeração até as análises.

A análise dos óleos essenciais será realizada em espectrômetro Shimadzu GC-MS QP 2010, operando com energia de ionização de 70 eV. Utilizando-se coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm de espessura do filme) e carreador de gás hélio com fluxo de 1 mL/min com split. As temperaturas do injetor e detector serão programadas de 250°C e 200ºC, respectivamente. A temperatura da coluna será determinada de 35ºC a 180ºC a 4°C/min e, em seguida de 180ºC a 280ºC a 10ºC/min. Os espectros de massa serão obtidos de 30 a 450 m/z. Componentes individuais serão identificados por correspondências de seus espectros de massa com os da base de dados, bem como através de comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura.

**Componentes Fixos por Cromatografia Líquida**

Frações semi-purificadas ou enriquecidas serão obtidas através dos extratos por cromatografia em coluna clássica ou HPLC, usando sílica gel e solventes orgânicos puros ou em combinações de acordo com ordem crescente de polaridade, e monitoradas por cromatografia em camada delgada.

**Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^{1}$H) e de Carbono – 13 (RMN $^{13}$C).**

Os espectros de ressonância magnética nuclear protônica (RMN$^{1}$H) e ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN$^{13}$C) uni– e bidimensionais serão registrados em espectrômetros Bruker, modelos Avance DPX – 300 e Avance DRX – 500, operando na freqüência de 300 e 500 MHz para o hidrogênio e 75 e 125 MHz para carbono - 13, respectivamente. Os deslocamentos químicos ( d ) serão expressos em parte por milhão ( ppm ), tendo como referência no caso dos espectros de RMN $^{1}$H, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio ( $CDCl_3$, d 7,24 ), piridina ( $C_5D_5N$, d 8,71 7,55 e 7,19 ), metanol ($CD_3OD$, d 4,78 ) e dimetilsulfóxido ( DMSO – $d_6$, d 2,49).

Para os espectros de RMN$^{13}$C, as referências utilizadas serão: clorofórmio (d 77,0), metanol ( d 49,0 ) e dimetilsulfóxido ( d 39,7 ). As multiplicidades dos sinais em RMN $^{1}$H serão indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo

dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multipleto). O padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN $^{13}C$ será determinado através da técnica de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulo de nutação de 135° e descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), $CH_2$(carbono metilênico) e $CH_3$ (carbono metílico). Os carbonos não hidrogenados serão caracterizados através da subtração dos sinais espectrais observados nos espectros BB (Broad Band) e DEPT 135°.

**Espectrometria de Massas (EM).**

Os espectros de massas serão registrados em espectrômetro Hewlett – Packard, modelo HP5971 A, acoplado a cromatógrafo gás líquido, modelo HP – 5890 A, série II (CG/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone DB-5, com 25,0 m de comprimento 0,20 mm de diâmetro interno e 0,30 mm de diâmetro externo, utilizando-se um gradiente de temperatura de 4° C/min de 50 a 180° C e 20° C/min de 180 a 280° C, sendo a temperatura do injetor de 250° C; e VG analytical 7070 E – HF, operando em impacto eletrônico a 70 eV.

**Isolamento e Cultivo das Cepas de *Burkhoderia* spp.**

**Processamento**

As cepas de *Burkhoderia* spp. serão isoladas a partir de amostras de plantas e de solos de criatórios de animais nos municípios de Crato, Juazeiro e Barbalha, na Região Nordeste do Brasil. As amostras serão processadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM da Universidade Regional do Cariri - URCA, em Crato, Ceará.

**Isolamento e Identificação das Cepas**

Para o diagnóstico microbiológicos será realizado a identificação e observação das características das colônias em meios de culturas e prova bioquímicas.

O isolamento será realizado nos meios de cultura Agar Sangue e Mac Conkey, e também usaremos um meio seletivo para *Burkhoderia* spp. o Ashdown's no qual serão inoculadas as cepas tanto na apresentação de caldo como ágar, haja vista que esse meio é mais

seletivo para crescimento deste microorganismo. Todas as amostras inoculadas serão incubadas a 37 ºC durante 2 dias exceto as amostras cultivadas em meio Ashdown's que serão inoculadas a 37 ºC por 4 dias para verificar o crescimento das colônias.

As amostras também serão inoculadas no meio de cultura Muller Hinton e caldo BHI para que sejam realizadas as respectivas análises bioquímicas

**Provas Bioquímicas**

Após cultivo e isolamento das amostras as mesma serão submetidas as seguintes provas bioquímicas: produção de oxidase, produção de catalase, presença de motilidade em ágar semi-sólido, arginina didrolase, descarboxilação de lisina em descaboxilase de *Moeller,* prova de orto-nitrofenil-*B-D* galactopiranosdeo(ONPG), indol, redução de nitrato, nitrato agás, ctrato, hidrolise de ureia, hidrolise da gelatina, hidrolise da esculina, provas de oxidação-fermentação de Hugh Leifson, utilizando os seguintes carboidratos e álcoois: adonitol, dulcitonol, eritritol, lactose, maltose, manitol e glucose. As provas acima relatadas serão incubadas a 37º enquanto que as de oxidação-fermentação serão avaliadas por 48h, e as reações de oxidação e fermentação serão acompanhada durante 15 dias. Será realizada a capacidade de resistência das cepas em questão a Polimixina B, que é uma das características do gênero *Burkholderia* spp.

**Atividade Antibacteriana das substâncias naturais e sintéticas**

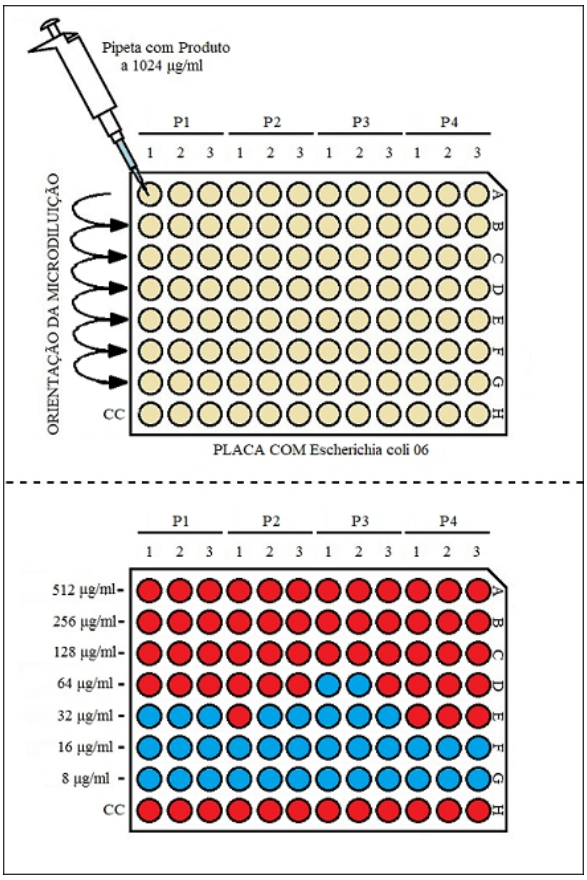
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM):

Os procedimentos para a análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) serão adaptados a partir da recomendação CLSI (2013), M100-S23, para testes de microdiluição em caldo. As cepas bacterianas em estudo serão cultivadas em placas de petri por um período de 24 horas. Um arrasto bacteriano será colhido destas placas e diluídos em tubos de ensaio com solução salina a 0,9 %, em triplicatas. Cada solução preparada será comparada com a escala 0,5 de McFarland (1 x $10^8$ UFC/mL), utilizada como padrão. Após a padronização, estes inóculos serão utilizados na proporção de 10 % do volume da solução teste.

A solução teste será composta de BHI (Brain Heart Infusion Broth) diluído a 10 % do volume, valor ideal para o crescimento bacteriano. Esta solução será despejada em eppendorfs®, juntamente com os inóculos bacterianos, nos valores de 900 µL e 100 µL, respectivamente.

O conteúdo de cada Eppendorf® preencherá uma coluna por placa, e cada poço será preenchido com 100 µL. Após o preenchimento de toda a placa, será feita a microdiluição, em triplicata, com cada composto a ser testado, conforme Fig. 4. As concentrações das substâncias irão variar de 512 a 8 µg/mL. Após a microdiluição, as placas serão levadas à incubadora por 24 horas a 37 ºC. Após esse período, a determinação da CIM será feita utilizando-se a adição de 20 µL de resazurina em cada poço e observação ocular após 1 hora (Fig. 1).

Figura 1: Microdiluição seriada (A); Leitura da placa (B).




Fonte: Autor. CC: controle de crescimento.

A mudança de cor da resazurina de azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida) indica crescimento bacteriano acima de acima de $10^6$ UFC/mL nos poços (GALLUCCI et al.,

2009).

A CIM será expressa como média geométrica dos valores dos poços nos quais a resazurina permaneceu na sua forma oxidada, constatando qual a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento bacteriano.

**Efeito Modificador da Atividade de Antibióticos de Uso Clínico**

Para avaliar o efeito modificador da atividade antibiótica frente às cepas bacterianas de *Burkholderia*, será utilizado o método proposto por Coutinho e colaboradores (2008). Para tanto, os compostos serão testados em concentrações sub-inibitória (CIM/8) para cada bactéria, evitando que os mesmos exerçam efeitos antibacterianos diretos.

As placas de microdiluição serão preenchidas no seu sentido numérico, sendo os tubos eppendorfs® preenchidos com um volume total de 1500 µL. Deste volume total, 10 % corresponderá à suspensão bacteriana (150 µL) e o restante será composto pelo volume correspondente a CIM/8 do composto a ser testado e BHI 10%. Para o controle, serão preparados tubos eppendorfs® com 1,5 mL de solução, contendo 1.350 µL de BHI 10 % e 150 µL de suspensão de microrganismos. Os antibióticos usados na modulação serão aqueles usualmente utilizados para o tratamento dos patogênicos causados em humanos, animais ou plantas.

Cada poço da placa de microdiluição será preenchida com 100 µL da solução dos eppendorfs®. Em seguida, 100 µL do antibiótico será homogeneizado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até o penúltimo poço. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Na tentativa de inferir um mecanismo de atuação das substâncias naturais e sintéticas, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida na modulação, será comparada entre controle antibiótico, as amostras das substâncias naturais e sintéticas e clorpromazina.

**Análise Estatística**

Os dados serão analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando a média geométrica das triplicatas como dado central e o Desvio Padrão, através do programa

estatístico *GraphPad Prisma 5.0.* Em seguida será realizado um teste de Bonferroni *post hoc* (onde $p < 0,05$ é considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo).

**Disponibilidade Efetiva de Infraestrutura das equipes de pesquisadores do Brasil, da China e da Índia**

Os pesquisadores desta proposta contam com toda a infraestrutura dos laboratórios de pesquisa vinculados aos Pesquisadores da equipe Brasileira, bem como aquela associada aos laboratórios dos Pesquisadores das equipes da China e da Índia.

**Laboratórios de Pesquisa no Brasil:**

i) **Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular:** 01 Estufa 37; 01 Estufa 100; 01 Balança 8100; 01 Balança 210; 02 Centrífuga; 01 Destilador; 01 Fluxo Laminar grande;01 Fluxo lamina pequeno; 01 Banho Maria; Micro-ondas; 01 Homogeneizador; 01 Liofilizador; 02 Geladeira; 01 Agitador; 01 Espectrômetro; 01 Regulador de montagem automático; 01Eletroforese mini; 01 Eletroforese power.

ii) **Laboratório de Farmacologia e Química Molecular:** 01 MEV; 01 Liofilizador; 02 Computadores; 01 Banho de órgãos; 03 Balança comum; 01 Banho Maria; 01 Placa quente; 01 Vonfrey; 01 Rota Road; 01 Destilador; 01 Espectrômetro; 01 Centrífuga; 01 HPLC; 02 Phgâmetro; 01 Tail-flick; 01 Guilhotina; 03 Placa aquecedora.

iii) **Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais:** 02 Balanças analíticas; 01 Balança semi-analítica; 01 Estufa de secagem; 02 Extrator de óleo; 01 Evaporador Rotativo; 01 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência; 01 Espectrofluorímetro; 01 Espectrofotômetro UV; 01 Cromatografo Gasoso acoplado a Espetrometro de Massas; Cromatografo Gasoso com Detector por Ionização de Chamas; Mesa Agitadora Orbital com Controle de Temperatura; Bomba Peristáltica; Purificador de Água; Destilador de Água; 01 Autoclave; 02 Geladeiras.

iv) **Laboratório de Simulação e Espectroscopia Molecular:** 01 Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier; 04 Computadores de alto desempenho; 01 Balança de precisão; 01 Estufa; 01 Mesa Óptica; 01 Laser. Também dispomos da infraestrutura computacional do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho-CENAPAD-SP, ligado à Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP, para utilização remota (Projeto Ativo: proj373 cadastrado para uso de softwares e processamento de alto desempenho. Contamos também com projeto ativo no Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho – SINAPAD do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) que dispõe do maior supercomputador da América Latina, o Santos Dumont.

Vale ressaltar também que a equipe Brasileira conta com anuência dos pesquisadores: Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire do Departamento de Física e do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal

do Ceará, e do Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos, Professor Adjunto da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) que também são membros do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA (http://www.urca.br/ppqb/portal/index.php/o-corpo-docente). Portanto, a infraestrutura de pesquisa dos laboratório destes pesquisadores serão utilizadas na execução de partes deste projeto. Eles são:

v) **Laboratórios do Departamento de Física da UFC**: Laboratório de Espectroscopia Vibracional (Espectrômetros FT-Raman e FT-IR); Laboratório de cristalografia estrutural (Difratômetro Bruker D8 VENTURE Kappa, equipado com um detector de CPAD PHOTON II, uma fonte de microfocal MoKα INCOATEC IμS 3.0 (λ = 0,71073 Å) e software de controle APEX 3), e outros equipamentos que são apresentados no link: http://www.fisica.ufc.br/wp/?page_id=2455 que possam virem a serem necessários a execução deste.

vi) **Laboratório Multiusuário do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC:** Espectrômetro Bruker Avance DRX-500 ($^{1}$H 500 MHz, $^{13}$C 125 MHz).

vii) **Laboratórios do Departamento de Química Orgânica da UVA:** Na Universidade Estadual Vale do Acaraú serão realizados os procedimentos cromatográficos utilizando cromatografia gravitacional em coluna, HPLC e CCD para o isolamento dos metabólitos secundário das plantas a serem escolhidas para o estudo. Este laboratório dispõe dos equipamentos: Sistema de Cromatografia Líquida (HPLC), Equipamento de Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR), Cromatografo Gasoso Acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-MS), Espectrômetro UV-VIS, Evaporadores Rotativos, Banho-Maria, Balanças, Estufas, Colunas Cromatográficas, Câmara UV para visualização das plaquinhas..

E por meio da anuência de Colaboração neste projeto do Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho dispomos da infraestrutura de pesquisa do seu laboratório de pesquisa na Fiocruz.

**Equipamentos do Laboratório de Pesquisa na Índia:** Espectrofotômetro, Centrífuga, Micrótomo, Câmara de Fluxo de Ar Laminar, Medidor de pH, Microscópio de Luz (OPTIKA), Microscópio de Luz (EUROMEX), Microscópio Estéreo (EUROMEX), Transiluminador Uv-VIS, Balança de precisão, Unidade de Destilação de Vidro, Geladeiras (Whirlpool e LG), Forno de Ar Quente, Eletroforese submarina, Eletroforese em gel, Aparelho Clevenger, Câmera SLR, Sistema de Purificação de Água Alta, Unidade Extratora Soxhlet, Forno de micro-ondas.

**Equipamentos do Laboratório de Pesquisa na China:** A Universidade de Macau conta uma infraestrutura moderna de equipamentos de pesquisa nas áreas de Química Analítica e Química Orgânica. Entres eles: Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Tunelamento de Varredura e Microscopia de Transmissão, Sistema de Cromatografia Líquida (HPLC), Equipamento de Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR), Cromatografo Gasoso Acoplado a um Espectrômetro de Massa (CG-MS), Espectrômetro UV-VIS, Espectrometria de absorção atômica.

## CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

| ATIVIDADES | BIMESTRE | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Revisão de literatura | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Missões Internacionais (Brasil-China) | | | | ■ | | | | | | ■ | | | | | | | | |
| Missões Internacionais (Brasil-Índia) | | | | | ■ | | | | | | ■ | | | | | | | |
| Coleta de material biológico | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Isolamento e caracterização de produtos naturais | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Síntese e caracterização de novos compostos orgânicos | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Ensaios e avaliação de atividades biológicas | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Análise de Estrutura-Atividade por dinâmica molecular e/ou *docking* molecular | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Escrita e submissão de artigos | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| Solicitação de Patente em caso de desenvolvimento de novo(s) produto(s) | | | | | | ■ | | | | | | ■ | | | | | ■ | |
| Participação do Coordenador na reunião da avaliação intermediária e final do projeto | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | ■ |
| Relatórios Parciais | | | | | | | ■ | | | | | | | ■ | | | | |
| Relatório Final | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |

**Missões de Pesquisa Brasil-China**

1. No 4º bimestre dois membros da equipe brasileira irá para a Universidade de Macau na China onde permanecerá por 10 dias desenvolvendo as seguintes atividades de pesquisas:

    a) Realizar caracterização química das substâncias sintéticas e naturais por meio de técnicas analíticas.

    b) Discutir resultados e trabalhar em conjunto com a equipe chinesa nos artigos pertinentes aos trabalhos em conjunto nesta rede de colaboração internacional contra linhagens de *Burkholderia* spp.

2. No 10º bimestre dois membros da equipe brasileira irá para a Universidade de Macau na China onde permanecerá por 10 dias desenvolvendo as seguintes atividades de pesquisas:

    a) Realizar caracterização química das substâncias sintéticas e naturais por meio de técnicas analíticas.

    b) Discutir resultados e trabalhar em conjunto com a equipe chinesa nos artigos pertinentes aos trabalhos em conjunto nesta rede de colaboração internacional contra linhagens de *Burkholderia* spp.

**Missões de Pesquisa Brasil-Índia**

1. No 5º bimestre dois membro da equipe brasileira irá para a **St. Xavier's College (Autonomous)** na Índia onde permanecerá por 10 dias desenvolvendo as seguintes atividades de pesquisas:

    a) Ensaios de bioatividade relacionados aos aspectos pró e antioxidantes das substâncias sintéticas e naturais utilizadas neste projeto, pois toda a parte de toxicidade e relacionada à processos oxidativos será realizada na Índia.

    b) Discutir resultados e trabalhar em conjunto com a equipe indiana nos artigos pertinentes aos trabalhos em conjunto nesta rede de colaboração internacional contra linhagens de *Burkholderia* spp.

2. No 11º bimestre dois membros da equipe brasileira irá para **St. Xavier's College (Autonomous)** na Índia onde permanecerá por 10 dias desenvolvendo as seguintes atividades de pesquisas:

    a) Ensaios de bioatividade relacionados aos aspectos pró e antioxidantes das substâncias sintéticas e naturais utilizadas neste projeto, pois toda a parte de toxicidade e relacionada à processos oxidativos será realizada na Índia.

    b) Discutir resultados e trabalhar em conjunto com a equipe indiana nos artigos pertinentes aos trabalhos em conjunto nesta rede de colaboração internacional contra linhagens de *Burkholderia* spp.

### Reunião da avaliação intermediária e final do projeto

1. No 9º bimestre ou em data a ser determinada pela comissão do BRICS-STI o Coordenador Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho participará da reunião da avaliação da fase intermediária de desenvolvimento do projeto.

2. No 18º bimestre ou em data a ser determinada pela comissão do BRICS-STI o Coordenador Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho participará da reunião da avaliação final do projeto.

## RELEVÂNCIA E IMPACTO DO PROJETO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO OU DE INOVAÇÃO

Os produtos que podem ser gerados a partir deste projeto visando a combater patogênicos em humanos, animais ou plantas causados por espécies de *Burkholderia* poderão vir a despertar o interesse das indústrias farmacêuticas, de produtos veterinários e de defensivos agrícolas.

## PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DO PROJETO DE PESQUISA

- Descoberta de novos produtos naturais e sintéticos com potencial ação antimicrobiana contra linhagens de *Burkholderia* spp.
- Desenvolvimento de pesquisas inovadoras que se adequem às necessidades e possibilidades de pesquisa no Brasil, e nos países da China e da Índia produzindo novos conhecimentos os quais possam agregar valor científico e tecnológico a novos medicamentos eficazes para combater as doenças causada por bactérias do gênero *Burkholderia*.
- Desenvolvimento de métodos de investigação na produção de conhecimento para atender a demanda da indústria farmacêutica por novos antibióticos capazes de vencerem a resistência bacteriana contra linhagens de *Burkholderia* spp.

## PERSPECTIVA S CONCRETAS DE COLABORAÇÕES INTERNACIONAIS DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO

A equipe de pesquisadores da China tem expertise em química analítica de compostos naturais e sintéticos, e os pesquisadores da Índia tem expertise em testes de atividade biológica de compostos orgânicos. A colaboração dos pesquisadores do Brasil com essas equipes possibilitará desenvolver pesquisas inovadoras na interface da química e da biologia que vão desde o isolamento de substâncias naturais, a síntese de materiais bioativos até a caracterização de novas substâncias orgânicas as quais podem vir a apresentar potencial ação antimicrobiana contra linhagens de *burkholderia* spp.

## COLABORAÇÕES OU PARCERIAS JÁ ESTABELECIDAS PARA EXECUÇÃO DE ATIVIDADES EM REDE

Nos últimos anos alguns membros da equipe de pesquisadores deste projeto têm desenvolvido trabalhos científicos em parceria com pesquisadores da China, Índia, França, Irã e Espanha. Entre eles destacam-se os seguintes pesquisadores:

i) Johnson Marimuthu Alias Antonisamy do Department of Botany, Centre for Plant Biotechnology, St. Xavier's College (Autonomous), Palayamkottai, Tamil Nadu, India.

ii) Jianbo Xiao do Institute of Chinese Medical Sciences, State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, University of Macau, Taipa, Macau;

iii) Laurent Picot da University of La Rochelle, La Rochelle, France;

iv) Javad Sharifi-Rad do Phytochemistry Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran;

v) Maria Celeste Vega Gomez do Centre for the Development of Scientific Investigation - CEDIC, Fundación Moisés Bertoni /Laboratorios Diaz Gill, Asuncion, Paraguay.

As publicações de alguns membros da equipe brasileira do ano 2018 com colaborações internacionais foram as seguintes:

1) **JOHNSON, M. ; MAHARAJA, P. ; MURUGESAN, S. ; JANAKIRAMAN, N.** ; MENEZES, I.R.A. ; DA COSTA, J.G.M. ; BARBOSA, C.R.S. ; Coutinho, H.D.M. . Larvicidal activity of some medicinal plant extracts against filariasis fever mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). COMPARATIVE IMMUNOLOGY MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, v. 61, p. 1-4, 2018.

2) **JOHNSON, M. ; MAHARAJA, P. ; JANAKIRAMAN, N. ; ADAIKALA RAJ, G.** ; MENEZES, I.R.A. ; DA COSTA, J.G.M. ; VERDE, L.C.L. ; COUTINHO, H.D.M. . Pancratium triflorum Roxb. (Amaryllidaceae) and *Molineria trichocarpa* (Wight) N.P. Balakr (Hypoxidaceae): Cytotoxic and antioxidant activities. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 119, p. 290-295, 2018.

3) CALDAS PEREIRA, RAFAEL ; NONATO, CARLA DE FÁTIMA ALVES ; CAMILO, CICERA JANAINE ; MELO COUTINHO, HENRIQUE DOUGLAS ; RODRIGUES, FABÍOLA FERNANDES GALVÃO ; **XIAO, JIANBO** ; DA COSTA, JOSÉ GALBERTO MARTINS . Development and validation of a rapid RP-HPLC-DAD analysis method for the quantification of pilocarpine in *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae). FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 119, p. 106-111, 2018.

4) **SATHIYABAMA, RAJIV GANDHI ; RAJIV GANDHI, GOPALSAMY ; DENADAI, MARINA ; SRIDHARAN, GURUNAGARAJAN ; JOTHI, GNANASEKARAN ; SASIKUMAR, PONNUSAMY** ; SIQUEIRA QUINTANS, JULLYANA DE SOUZA ; NARAIN, NARENDRA ; CUEVAS, LUIS EDUARDO ; COUTINHO, HENRIQUE DOUGLAS MELO ; RAMOS, ANDREZA GUEDES BARBOSA ; QUINTANS-JÚNIOR, LUCINDO JOSÉ ; GURGEL, RICARDO QUEIROZ . Evidence of insulin-dependent signalling mechanisms produced by Citrus sinensis (L.) Osbeck fruit peel in an insulin resistant diabetic animal model. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 116, p. 86-99, 2018.

5) **SHARIFI-RAD, MEHDI ; OZCELIK, BERAAT ; ALT'N, GÖKÇE ; DA'KAYA-DIKMEN, CEREN ; MARTORELL, MIQUEL ; RAMÍREZ-ALARCÓN, KARINA ; ALARCÓN-ZAPATA, PEDRO** ; MORAIS-BRAGA, MARIA FLAVIANA B. ; CARNEIRO, JOARA N.P. ; ALVES BORGES LEAL, ANTONIO LINKOLN ; Coutinho,

Henrique Douglas Melo ; **GYAWALI, RABIN ; TAHERGORABI, REZA ; IBRAHIM, SALAM A. ; SAHRIFI-RAD, RAZIEH ; SHAROPOV, FARUKH ; SALEHI, BAHARE** ; **DEL MAR CONTRERAS, MARÍA ; SEGURA-CARRETERO, ANTONIO ; SEN, SURJIT ; ACHARYA, KRISHNENDU ; SHARIFI-RAD, JAVAD** . *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY, v. 80, p. 242-263, 2018.

6) **SALEHI, BAHARE** ; **VALUSSI, MARCO** ; MORAIS-BRAGA, MARIA ; CARNEIRO, JOARA ; LEAL, ANTONIO ; COUTINHO, HENRIQUE ; **VITALINI, SARA ; KR'GIEL, DOROTA ; ANTOLAK, HUBERT ; SHARIFI-RAD, MEHDI** ; SILVA, NATHÁLIA ; **YOUSAF, ZUBAIDA ; MARTORELL, MIQUEL ; IRITI, MARCELLO ; CARRADORI, SIMONE ; SHARIFI-RAD, JAVAD** . Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. MOLECULES, v. 23, p. 2847-2882, 2018.

7) **SHARIFI-RAD, MEHDI ; MNAYER, DIMA** ; MORAIS-BRAGA, MARIA FLAVIANA BEZERRA ; CARNEIRO, JOARA NÁLYDA PEREIRA ; BEZERRA, CAMILA FONSECA ; Coutinho, Henrique Douglas Melo ; **SALEHI, BAHARE** ; **MARTORELL, MIQUEL ; DEL MAR CONTRERAS, MARÍA ; SOLTANI-NEJAD, AZAM ; URIBE, YOSHIE ADRIANA HATA ; YOUSAF, ZUBAIDA ; IRITI, MARCELLO** ; **SHARIFI-RAD, JAVAD** . Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. PHYTOTHERAPY RESEARCH, v. 32, p. 1653-1663, 2018.

8) **SHARIFI-RAD, MEHDI ; ROBERTS, THOMAS H. ; MATTHEWS, KARL R**. ; BEZERRA, CAMILA F. ; MORAIS-BRAGA, MARIA FLAVIANA B. ; Coutinho, Henrique D.M. ; **SHAROPOV, FARUKH ; SALEHI, BAHARE ; YOUSAF, ZUBAIDA ; SHARIFI-RAD, MAJID ; DEL MAR CONTRERAS, MARÍA ; VARONI, ELENA MARIA ; VERMA, DEEPA R. ; IRITI, MARCELLO ; SHARIFI-RAD, JAVAD** . Ethnobotany of the genus Taraxacum -Phytochemicals and antimicrobial activity. PHYTOTHERAPY RESEARCH, v. 32, p. 2131-2145, 2018.

9) DE LAVOR, ÉRICA MARTINS ; FERNANDES, ANTÔNIO WILTON CAVALCANTE ; DE ANDRADE TELES, ROXANA BRAGA ; LEAL, ANA EDILÉIA BARBOSA PEREIRA ; DE OLIVEIRA JÚNIOR, RAIMUNDO GONÇALVES ; GAMA E SILVA, MARIANA ; DE OLIVEIRA, ANA PAULA ; SILVA, JULIANE CABRAL ; DE MOURA FONTES ARAÚJO, MARIA TAIS ; COUTINHO, HENRIQUE DOUGLAS MELO ; DE MENEZES, IRWIN ROSE ALENCAR ; **PICOT, LAURENT** ; DA SILVA ALMEIDA, JACKSON ROBERTO GUEDES . Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2018, p. 1-23, 2018.

10) MACHADO, ANTONIO J.T. ; SANTOS, ANTONIA T.L. ; MARTINS, GIOCONDA M.A.B. ; CRUZ, RAFAEL P. ; COSTA, MARIA DO S. ; CAMPINA, FÁBIA F. ; FREITAS, MARIA A. ; BEZERRA, CAMILA F. ; LEAL, ANTONIO L.A.B. ; CARNEIRO, JOARA N.P. ; CORONEL, CATHIA ; ROLÓN, MIRIAM ; **GÓMEZ, CELESTE V**. ; COUTINHO, HENRIQUE D.M. ; MORAIS-BRAGA, MARIA F.B. . Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L. (guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-veado) extracts. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 119, p. 275-280, 2018.

11) PEREIRA, PEDRO S. ; MAIA, ANA J. ; DUARTE, ANTÔNIA E. ; OLIVEIRA-TINTINO, CÍCERA DATIANE M. ; TINTINO, SAULO R. ; BARROS, LUIZ M. ; **VEGA-GOMEZ, MARIA C.** ; ROLÓN, MIRIAM ; CORONEL, CATHIA ; COUTINHO, HENRIQUE D.M. ; DA SILVA, TERESINHA G. . Cytotoxic and anti-kinetoplastid potential of the essential oil of *Alpinia speciosa* K. Schum. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 119, p. 387-391, 2018.

12) REGUEIRA-NETO, MARCOS DA SILVEIRA ; TINTINO, SAULO RELISON ; ROLÓN, MIRIAM ; CORONAL, CATHIA ; **VEGA, MARIA C.** ; DE QUEIROZ BALBINO, VALDIR ; DE MELO COUTINHO, HENRIQUE DOUGLAS . Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 119, p. 215-221, 2018.

## RECURSOS FINANCEIROS DE OUTRAS FONTES APROVADOS PARA APLICAÇÃO NO PROJETO

Vale destacar dois projetos de pesquisadores da URCA aprovados na Chamada Pública MCTIC/Finep/CT-Infra 03/2018, que destinam recursos à Manutenção Preventiva de Equipamentos (MPURCA/R$ 599.169,18) e Manutenção de Infraestrutura do Biotério da Instituição (INFRABIOT/R$ 139.028,97) no montante de R$ 738.198,15 que assegurarão aporte de recursos financeiros para infraestrutura de pesquisa que será usada no desenvolvimento deste projeto. Eles são:

i) Chamada Pública MCTIC/Finep/CT-Infra 03/2018 - INFRABIOT - Melhoria da infraestrutura do Biotério-URCA a luz da nova legislação CONCEA.

Valor R$ 139.028,97

Integrantes: Francisco Assis Bezerra da Cunha - Integrante / Roseli Barbosa - Integrante / Irwin Rose de Alencar Menezes - Coordenador / Marta Regina Kerntopf - Integrante. Financiador(es): Financiadora de Estudos e Projetos - Auxílio financeiro.

ii) Chamada Pública MCTIC/Finep/CT-Infra 03/2018 - MPURCA – Manutenção preventiva multiusuária/URCA - Programa de Manutenção Preventiva de Equipamentos da Universidade no valor de até 599.169,18, coordenado pelo docente José Galberto Martins da Costa, com objetivo de garantir a operacionalização e o funcionamento dos equipamentos em áreas estratégicas.

Vale mencionar que dos 13 professores-pesquisadores da equipe brasileira deste projeto, 09 possuem bolsas Bolsista de Produtividade em Pesquisa, sendo:

i) 02 pesquisador do CNPq - Nível 1A;

ii) 01 pesquisadores do CNPq - Nível 1D;

iii) 04 pesquisadores do CNPq - Nível 2;

iv) 02 Bolsistas de Produtividade em Pesquisa de Estímulo à Interiorização e à Inovação Tecnológica – BPI pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

## ORÇAMENTO DETALHADO

**Tabela 1** – PASSAGENS E DIÁRIAS INTERNACIONAIS ENTRE PARTICIPANTES DA EQUIPE BRASILEIRA EM MISSÃO NA CHINA E DA ÍNDIA DO PROGRAMA BRICS-STI.

| Item | Descrição - Custeio | Valor (R$) | Quantidade | Total (R$) |
|---|---|---|---|---|
| Passagens (ida e volta) | Juazeiro do Norte-Pequim-Juazeiro do Norte | 10.000,00 | 04 | 40.000,00 |
| Passagens (ida e volta) | Juazeiro do Norte-Nova Deli-Juazeiro do Norte | 10.000,00 | 04 | 40.000,00 |
| Passagens (ida e volta) | Destinado ao Coordenador para participar de reunião da avaliação intermediária e final do projeto | 10.000,00 | .02 | 20.000,00 |
| Diárias* | Para Pesquisador Brasileiro desenvolver atividades na China | 1.066,00 | 40 | 42.640,00 |
| Diárias* | Para Pesquisador Brasileiro desenvolver atividades na Índia | 1.066,00 | 40 | 42.640,00 |
| **Total** | | | | **185.280,00** |

***Valor de diária do CNPq para China e Índia -U$ 260,00, Cotação em 21/05/2019 => USD 1,00 = BRL 4.10 (** http://memoria.cnpq.br/diarias-para-auxilios).

**Tabela 2** – CONTRATAÇÃO DE SEGURO-SAÚDE PARA CADA PARTICIPANTE DA EQUIPE BRASILEIRA E/OU ESTRANGEIROS COM VISTO PERMANENTE NO BRASIL, EM MISSÃO AOS DEMAIS PAÍSES DOS BRICS.

| **Item** | **Descrição - Custeio** | **Valor (R$)** | **Quantidade** | **Total (R$)** |
|---|---|---|---|---|
| Seguro viagem** | Seguro viagem para pesquisadores do programa BRICS-STI | 70,00 | 80 | 5600,00 |
| Total | | | | **5600,00** |

****Contação no Mondial Travel (** https://cotacao.mondialtravel.com.br/Preco).

**Tabela 3** – DESPESAS DE CUSTEIO PARA DESENVOLVIMENTO DAS PESQUISAS DO PROJETO

| **Item** | **Descrição - Custeio** | **Valor (R$)**<br>**Quantidade**<br>**Total (R$)** |
|---|---|---|
| Material de Consumo | Reagentes Químicos | 9.120,00 |
| Total | | **9.120,00** |

| **RESUMO DO ORÇAMENTO** | **Valor em R$** |
|---|---|
| **VALOR TOTAL (TABELAS 1, 2 e 3)** | **200.000,00** |

# REFERÊNCIAS


BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. A personal view. **Journal of Antibiotics**. v.58, p.1- 26, 2005.

BERNHARDS, R. C. et al. Characterization of *in vitro* phenotypes of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* strains potentially associated with persistent infection in mice. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 2, p. 277-301, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. Classificação de risco dos agentes biológicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. – 3. ed. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017.

CHENG, G. et al. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 470.,2016.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informacional Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2013.

COENYE, T.; VANDAMME P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environ Microbiol** v. 5, 719–729, 2003.

COMPANT., S.; NOWAK, J.; COENYE, T., CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Diversityand occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. **FEMS Microbiol Rev** 32 607–626, 2008.

DANCE, D.A.B. Melioidosis and Glanders as Possible Biological Weapons, **Bioterrorism and Infectious Agents** Edited by Fong and Alibek, Springer Science+Business Media, Inc., New York, 2005.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; et al. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 670-675, 2008.

COUTINHO, H. D. M et al. Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 13, n. 3, p. 345-354, 2015.

DONADIO, S. et al. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. **The Journal of antibiotics**, v.63, N.8, p.423-430, 2010

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25, 2014.

FELLOWS, L. WHAT ARE THE FORESTS WORTH**. Lancet**, v. 339, n. 8805, p. 1330-1333, 1992.

GALLUCCI, M.N.; OLIVA, M.; CASERO, C.; et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal,** v. 24, p. 348-354, 2009.

GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P. et al. (1995) Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N2-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Evol Microbiol* 2: 274–289, 1995.

GONÇALVES, D. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de Tabernaemontana catharinensis A. DC. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 197-202, 2011

GUIMARÃES DO; MOMESSO LS; PUPO MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, 33(3): 667-679, 2010.

GUR S; TURGUT-BALIK D; GUR N. Antimicrobial activities and some fatty acids of turmeric, ginger root and linseed used in the treatment of infectious diseases. **World Journal of Agricultural Sciences.** 2(4):439-42, 2006.

KUMAR AS. et al. Synergistic activity of methanolic extract of Thespesia populnea (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh J Pharmacol**. 4(1): 13-16, 2009.

LOBO, P. L. D. et al.The efficacy of three formulations of Lippiasidoides Cham. essential oil in the reduction of salivary Streptococcus mutans in children withcaries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 1043-1047, 2014.

MAHENTHIRALINGAM, E.; VANDAMME, P.; CAMPBELL, M.E; HENRY, D.A.; GRAVELLE, A.M.; WONG, L.T.K.; DAVIDSON, A.G.F.; WILCOX, P.G.; NAKIELNA, B.; SPEERT, D.P. Infection with Burkholderia cepacia Complex Genomovars in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genomovar III Can Replace Burkholderia multivorans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, 1469-1475, 2001.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. **Roca: Rio de Janeiro**, 2016.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 108-113, 2007

OLIVEIRA, M.T.A.; TEIXEIRA, A.M.R.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; SENA, D.M., JR.; SANTOS, H.S.; DE MESQUITA, B.M.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; BRAZ FILHO, R. Identification and Modulatory Activity Assessment of 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone Isolated from *Croton anisodontus* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 665-668, 2014.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, p 301-307, abr./jun. 2008

PARSEK, MATTHEW R.; FUQUA, CLAY. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of bacteriology, v.** 186, n. 14, p. 4427- 4440, 2004.

PUPO, M. T. E GALLO B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova** v. 30, nº. 6, p. 1446-1455, nov./dez. 2007.

SEMLER, D.D.; GOUDIE, A.D.; FINLAY, W.H.; DENNIS, J.J. Aerosol Phage Therapy Efficacy in Burkholderia cepacia Complex Respiratory Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, V. 58, p. 4005–4013, 2014.

SHAIK, G.; SUJATHA, N.; MEHAR, S. K. Medicinal plants as source of antibacterial agents to counter Klebsiella pneumonia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [S.l.], v. 4, nº 1, p. 135-147, 2014.

TEIXEIRA, A.M.R.; SANTOS, H.S.; BANDEIRA, P.N.; JULIÃO, M.S.S.; FREIRE, P.T.C.; LIMA, V.N.; CRUZ, B.G.; DA SILVA, P.T.; COUTINHO, H.D.M.; SENA, D.M. Structural, spectroscopic and microbiological characterization of the chalcone 2E-1-(2′-hydroxy-3′,4′,6′-trimethoxyphenyl)-3-(phenyl)-prop-2-en-1-one derived from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1179, n., p. 739-748, 2019.

TELES, José Andreey A. et al. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos**. Pesquisa Veterinária Brasileira,** [s.l.], v. 32, n. 9, p.838-842, set. 2012.

Whitlock, G.C.; Estes, D.M.; Torres, A. G. Glanders: off to the races with Burkholderia mallei, **FEMS Microbiol Lett** v. 277, p. 115–122, 2007.

World Health Organisation (WHO). WHO **Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care Is Safer Care**. Geneva: WHO; 270p, 2009.

ZIEMSKA, J.; RAJNISZ, A.; SOLECKA, J. New perspectives on antibacterial drug research. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 10, p. 943-957, 2013.

ZHOU J, CHEN Y, TABIBI S, ALBA L, GARBER E, SAIMAN L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of Burkholderia cepacia complex isolated from patients with cystic fibrosis. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 51, 1085–1088, 2007.

ZHUANG, C.L.; ZHANG, W.; SHENG, C.Q.; ZHANG, W.N.; XING, C.G.; MIAO, Z.Y. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017.