



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

BEATRIZ MEYRUZE BARROS DA FONSÊCA

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE *PSIDIUM*
GUINEENSE SW: UMA ALTERNATIVA NO COMBATE A
CEPAS RESISTENTES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Recife
2023

CURSO DE BIOMEDICINA

BEATRIZ MEYRUZE BARROS DA FONSÊCA

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE *PSIDIUM*
GUINEENSE SW: UMA ALTERNATIVA NO COMBATE A
CEPAS RESISTENTES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Wêndeo Kennedy Costa

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Fonsêca, Beatriz Meyruze Barros da.

Extrato hidroalcoólico de folhas de *Psidium guineense* SW: uma alternativa no combate a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. / Beatriz Meyruze Barros da Fonsêca. - Recife, 2023.

48 p. : il., tab.

Orientador(a): Wêndeo Kennedy Costa

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Planta medicinal. 2. Antimicrobiano. 3. Virulência. 4. Hemólise. 5. Estafiloxantina. I. Costa, Wêndeo Kennedy . (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

BEATRIZ MEYRUZE BARROS DA FONSÊCA

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE *PSIDIUM*
GUINEENSE SW: UMA ALTERNATIVA NO COMBATE A CEPAS
RESISTENTES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 14/09/23

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr Wêndeo Kennedy Costa
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

Msc. João Victor de Oliveira Alves
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

Msc. Irivânia Fidelis da Silva Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

Dedico este trabalho à minha família e amigos -que sempre acreditaram mais em mim que eu mesma-, mas o dedico especialmente a vovó Nair e Totoco, que cuidam de mim lá de cima. Não poderia ter terminado sem o apoio de vocês. Obrigada por me oferecer o braço para furar e conhecimento para uma vida todinha, vó. E obrigada, Toy, por 10 anos sendo meu tudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Andreza Meyruze Barros da Fonsêca e Hamilton Celerino da Fonsêca Filho. Obrigada por sempre lutar por mim e por minha educação. Obrigada por me permitir a melhor realidade possível, vi todos os sacrifícios que vocês fizeram para isso. Sou grata por cada dia ao lado de vocês, mesmo que eu fique de cara feia às vezes. Esse é um vale realização e interpretação de exames para todo o sempre. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu irmão e melhor amigo, Neto, agradeço por ser meu lugarzinho seguro no mundo. Obrigada por acreditar em mim e no meu futuro como tia rica, mesmo sabendo que não tenho nem piso salarial. Não seria nada sem você. Te amo bizarramente.

À minha tia Eleonora, obrigada por sempre conversar comigo como igual e me ensinar a perseverar e esperar nesse caos louco que é a vida.

Ao meu primo Célio, obrigada pelo apoio constante e pelas risadas em meio aos choros de TCC (eu) e OAB (ele).

Ao Professor Dr. Wêndeo Kennedy Costa, meu muito obrigada pela introdução tão paciente e confiante ao meio acadêmico, que é cruel. Seu apoio foi essencial na minha jornada como cientista, se é que posso me chamar assim. Obrigada por aguentar os surtos e prazos junto comigo.

Agradeço também aos integrantes do NBioCaat, que, de algum jeito, me ajudaram a aprender, a apresentar e a experimentar. Meu agradecimento especial à Prof^a Dra. Márcia Vanusa da Silva, minha orientadora por três IC 's, uma das quais resultou no trabalho que apresento aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agradeço pela oportunidade de realizar minhas atividades com auxílio financeiro e por acreditar nos cientistas e na ciência como instrumento de mudança do nosso país.

À UFPE, agradeço por me permitir conhecer pessoas incríveis que são parte essencial da minha vida desde 2019. A Pedro e Bella em especial, por dividirem o fardo dos surtos, provas e trabalhos, por comemorarem as pequenas vitórias comigo e por não me deixarem desistir.

E as minhas muitas amigas-irmãs, obrigada por me incentivar em todas as fases e por me mostrar a grandiosidade de vínculos inesperados, mas permanentes.

“With every passing moment, you fear you might have missed your chance to make something of your life. I'm here to tell you, every rejection, every disappointment has led you here to this moment. Don't let anything distract you from it.”

(Everything Everywhere All At Once)

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal do grupo dos cocos Gram-positivos com capacidade de se tornar oportunista, levando ao surgimento de infecções de origem hospitalar e comunitária de gravidade variável, que podem se tornar potencialmente fatais. A presença de resistência às mais variadas classes de antibióticos torna essa bactéria uma das maiores dificuldades atuais no tratamento clínico, sendo responsável por um aumento considerável no custo e tempo despendidos para assistir pacientes, principalmente aqueles hospitalizados, tanto no sistema privado como público de saúde, tornando-se necessária a busca por novas alternativas para seu combate. *Psidium guineense* é uma planta proveniente da caatinga brasileira, com possível potencial antimicrobiano no combate à cepas resistentes de *S. aureus*, e torna-se uma alternativa interessante, visto que o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é amplamente aceito, principalmente no que se refere a locais com difícil acesso à medicina convencional. Portanto, esse estudo objetivou investigar o uso do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. guineense* SW. como um possível agente antimicrobiano capaz de combater isolados de *S. aureus* resistentes e minimizar seus efeitos de virulência. Foram realizadas análises da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para investigar a atividade antibacteriana e ensaios de curva de crescimento, impacto sinérgico e antivirulência (ação hemolítica e da estafiloxantina), para investigar o mecanismo antibacteriano. A CIM do extrato de *P. guineense* foi de 256–512µg/mL, enquanto a CBM foi de 512–1024µg/mL. Os resultados do teste da curva de crescimento indicaram supressão total do crescimento de *S. aureus* durante as primeiras 4 horas e parcial significativa durante o curso das 24 horas. Notou-se também impacto sinérgico com os dois antibióticos testados - Gentamicina (GEN) e Ciprofloxacino (CIP)-, que tiveram sua atividade antimicrobiana melhorada após adição do extrato hidroalcoólico, demonstrando eficácia contra todas (GEN) e quase todas (CIP) as cepas testadas. Além disso, também mostrou uma forte capacidade de diminuir a hemólise (57,77%; 79,78%) e estafiloxantina (35,76%; 69,05%; 82,60%). Dessa forma, o extrato de *Psidium guineense* se mostra como uma opção suplementar encorajadora por seu fácil acesso -visto que é uma planta presente em solo brasileiro- e por sua eficácia, já que foi capaz de tratar isolados resistentes de *Staphylococcus aureus*, apresentando potencial terapêutico vantajoso ao agir com sinergia total ou parcial com os antibióticos testados e reduzindo mecanismos virulentos significativos.

Palavras-chave: Planta medicinal. Antimicrobiano. Virulência. Hemólise. Estafiloxantina.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a commensal cocci Gram-positive bacteria with the ability to become opportunistic, leading to the emergence of nosocomial and community infections of varying severity, which can become potentially fatal. The presence of resistance to the most diverse classes of antibiotics makes this bacteria one of the greatest current difficulties in clinical treatment, being responsible for an increased amount of cost and time spent caring for patients, especially those hospitalized, both in the private and public health systems, making the search for new alternatives for its combat fundamental. *Psidium guineense* is a plant from the Brazilian caatinga, with possible antimicrobial potential in the fight against resistant *S. aureus* strains and it becomes an interesting alternative since the use of medicinal plants for the treatment of diseases is widely accepted, specially at places with difficult access to conventional medicine. Therefore, this study aimed to investigate the use of the hydroalcoholic extract of leaves of *P. guineense* SW. as a possible antimicrobial agent capable of combating resistant *S. aureus* isolates and minimizing their virulence effects. For that purpose, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were analyzed to verify antibacterial activity and growth curve, synergistic impact and antivirulence (hemolytic and staphyloxanthin action) tests were done to better investigate the antibacterial mechanism. The MIC of the *P. guineense* extract was determined as 256–512 µg/mL, while the MBC was 512–1024 µg/mL. The results of the growth curve assay indicated total suppression of *S. aureus* growth during the first 4 hours and statistically meaningful partial suppression during the course of 24 hours. A synergistic impact was also noted with the two antibiotics tested - Gentamicin (GEN) and Ciprofloxacin (CIP) -, which had their antimicrobial activity improved after the addition of the hydroalcoholic extract, showing efficacy against all (GEN) and almost all (CIP) strains tested. In addition, it also showed a strong ability to decrease hemolysis (57,77%; 79,78%) and staphyloxanthin activity (35,76%; 69,05%; 82,60%). Thus, *Psidium guineense* extract proves to be an encouraging supplementary option due to its easy access -since it is a plant present in Brazilian soil- and its effectiveness, since it was able to treat resistant *Staphylococcus aureus* isolates, presenting advantageous therapeutic potential by acting in total or partial synergy with the tested antibiotics and reducing significant virulent mechanisms.

Key words: Medicinal plant. Antimicrobial. Virulence. Hemolysis. Staphyloxanthin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – *Psidium guineense* SW: Arbusto (A), Frutos (B), Flor (C) e Folhas (D). **17**
- Figura 2** – *Staphylococcus aureus* vista por Microscopia Óptica (100x) : Colônias Gram-positivas com seta destacando o arranjo em “cacho-de-uva”. **20**
- Figura 3** – Cromatoplaça referente à análise da presença de flavonoides e derivados cinâmicos, saponinas e açúcares. **31**
- Figura 4** – Cromatograma do extrato (A) e do extrato e padrões (B) em 270 nm. **32**
- Figura 5** – Espectros de varredura correspondente aos picos 1 a 6 evidenciados no extrato em 270 nm. **33**
- Figura 6** – Curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 afetadas pelo extrato de *Psidium guineense*. *S. aureus* ATCC 29213 tratado com extrato de *Psidium guineense* a 1x CIM (256 µg/mL) ou 2x CIM (512 µg/mL). **35**
- Figura 7** – Efeitos do extrato de *P. guineense* na inibição da hemólise (A) e produção de estafiloxantina (B) causada por *S. aureus* ATCC 29213. **36**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Teores obtidos expressos em g% (média ± desvio padrão) **33**
- Tabela 2** – Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *P. guineense* e antibióticos (µg/mL) contra *S. aureus*. **34**
- Tabela 3** – Interação sinérgica entre extrato de *Psidium guineense* e antibióticos contra *S. aureus*. **34**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD-AE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
GEN	Gentamicina
MDR	Multidroga resistente
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
RAM	Resistência Antimicrobiana
STX	Estafiloxantina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 GÊNERO <i>PSIDIUM</i>	16
2.1.1 <i>Psidium guineense</i> SW.	17
2.1.1.1 Extrato Hidroalcoólico	19
2.2 GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	19
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.2.1.1 Metabolismo, Características Bioquímicas e Morfológicas	20
2.2.1.2 Incidência	21
2.2.1.3 Mecanismos de Virulência	22
2.2.1.3.1 <i>Estafiloxantina</i>	23
2.2.1.3.2 <i>Capacidade Hemolítica</i>	23
2.3 ANTIBIOTICOTERAPIA ATUAL	24
2.3.1 Gentamicina	25
2.3.2 Ciprofloxacino	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 MANEJO DO MATERIAL VEGETAL E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	28
4.1.1 Coleta e Produção do Extrato	28
4.1.2 Caracterização por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência	28
4.1.3 Análise Quantitativa de Compostos Majoritários	28
4.2 TESTES DE AVALIAÇÃO PARA COM OS ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	28
4.2.1 Determinação da CIM e CBM	28
4.2.2 Ensaio de sinergismo	29
4.2.3 Curva de crescimento	29
4.2.4 Ação antivirulência: Avaliação anti-hemolítica	30
4.2.5 Ação antivirulência: Avaliação da inibição da estafiloxantina (STX)	30
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	31

5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)	31
5.1.2 Quantificação dos metabólitos presentes por CLAE	31
5.2 ANÁLISES ENVOLVENDO ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	33
5.2.1 CIM e CBM	33
5.2.2 Ensaio de Sinergismo Bacteriano	34
5.2.3 Ensaio da Curva de Crescimento	35
5.2.4 Mecanismo Anti-virulência (Atividade anti-hemolítica e Avaliação da inibição da Estafiloxantina (STX))	35
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é uma zona biogeográfica exclusiva brasileira, presente majoritariamente na região do Nordeste e que contém uma grande, porém pouco estudada, biodiversidade. Condições ecológicas locais da região como as altas temperaturas associadas aos baixos índices pluviiais e a baixa umidade (Fernandes *et al.*, 2020) resultaram no surgimento de uma vegetação peculiar, cujas espécies apresentam adaptações anatômicas, morfológicas e funcionais que garantem sua prevalência mesmo em condições adversas (Da Silva Trentin *et al.*, 2011; Coe e Sousa, 2014). Devido a essas condições, essas plantas desenvolveram características químicas importantes, graças à composição com grande quantidade de metabólitos secundários: substâncias bioativas capazes de gerar efeitos terapêuticos, sendo consideradas úteis no tratamento de diversas enfermidades, seja através do seu uso isolado, como adjuvantes de fármacos ou visando a produção de novas drogas (Do Nascimento Magalhães *et al.*, 2019; De Melo *et al.*, 2022; Basavegowda e Baek, 2022; David *et al.*, 2015). A presença de uma quantidade considerável de metabólitos secundários, a fácil acessibilidade e o baixo custo tornam essas plantas uma alternativa interessante para a medicina convencional e para o desenvolvimento de novas drogas sintéticas, mostrando uso recorrente pelos grupos tradicionais e regionais de diversos locais do mundo, como no Brasil (Agra *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2020).

A família Myrtaceae é uma das famílias vegetais de maior distribuição no mundo, apresentando-se predominantemente em climas tropicais e subtropicais. É amplamente representada em território brasileiro, com mais de 20 gêneros e 1.000 espécies descritas na literatura (Brandão *et al.*, 2008), possuindo o gênero *Psidium* como um dos mais numerosos e de destaque por sua importância medicinal, cujas espécies apresentam diversos efeitos terapêuticos descritos, incluindo atividades anti-inflamatória (Costa *et al.*, 2022), antifúngica (Bezerra *et al.*, 2018), antibacteriana (Patel *et al.*, 2019) e antioxidante (Lahlou *et al.*, 2022). *Psidium guineense* SW., ou araçá-do-campo, como é popularmente conhecida, é uma das plantas desse gênero, tendo suas várias partes aplicadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, tais quais inflamações, infecções e distúrbios gastrointestinais (Franzon *et al.*, 2009; Neira González *et al.*, 2005; Rodrigues e Carvalho, 2001). Estudos de sua atividade biológica demonstraram a presença de propriedades antimicrobianas do extrato de raízes (Fernandes *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2012) e o potencial antioxidante dos frutos (De Araújo *et al.*, 2016), no entanto, não foram ainda descritas atividades quanto ao extrato hidroalcoólico de suas folhas.

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva comumente encontrada na microbiota, estando presente na pele e membranas mucosas de indivíduos saudáveis. Contudo, pode-se tornar oportunista e levar à ocorrência de diversas infecções clínicas com grau de gravidade variável, desde lesões superficiais leves à sepse e infecções sistêmicas graves de potencial fatal, caracterizando-se como um dos microrganismos mais encontrados nos óbitos em pacientes com pneumonias e bacteriemias de origem hospitalar (Foguena *et al.*, 2016; Almeida, 2022). A presença de *S. aureus* oportunista representa um grande risco para a população, principalmente com a atual tendência dessas bactérias em apresentarem resistência aos tratamentos de antibioticoterapia convencionais e pelo aumento na agressividade dos seus fatores de virulência, tornando-as um grande problema de saúde pública (Cheung *et al.*, 2021; Botelho *et al.*, 2022). Em consequência disso, a busca por novos agentes antimicrobianos alternativos capazes de combater isolados de *S. aureus* resistentes e minimizar os efeitos da sua virulência é de interesse global (Bezerra Filho *et al.*, 2020).

Produtos naturais têm sido tradicionalmente usados para tratar muitas doenças, incluindo infecções de origem bacteriana, sendo os produtos derivados de plantas alternativas exploradas pela indústria farmacêutica como agente antimicrobiano isolado ou sinérgico. Os óleos essenciais e variados extratos (metanólico, etanólico, hidroalcoólico) são alguns desses produtos, que, derivados dos compostos orgânicos biossintetizados por plantas, consistem em uma dessas alternativas na luta contra as bactérias multidroga resistentes, como *S. aureus* (Laird e Phillips, 2012). No entanto, seu uso indiscriminado e sem a testagem adequada pode resultar no aparecimento de efeitos indesejados. Por isso, urge a necessidade do processo de testagem, de forma a padronizar o uso das preparações vegetais, assegurando a qualidade e a segurança clínica, permitindo o seu uso em ampla escala e garantindo a presença dos efeitos terapêuticos benéficos desejados (Ostrosky *et al.*, 2008).

Dessa forma, aliando o conhecimento popular acerca das propriedades biológicas de plantas medicinais -como *P. guineense* SW.- com a avaliação laboratorial do seu potencial antimicrobiano, supõe-se que serão encontradas novas substâncias com bioatividade e propriedades interessantes para aplicação biotecnológica, que poderão ser futuramente usufruídas para superar o desafio acirrado contra *S. aureus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *PSIDIUM*

Pertencente à família vegetal Myrtaceae, *Psidium* é um dos gêneros de maior importância econômica em algumas regiões do Brasil e do Mundo (Franzon *et al.*, 2009; Paniagua-Zambrana *et al.*, 2020). Espécies vegetais dessa família são observadas em áreas tropicais e subtropicais, prevalecendo em três grandes centros: América do Sul, Ásia tropical e Austrália (Figueiredo *et al.*, 2018). São comumente prevalentes em áreas onde se encontram sob condições de estresse abiótico constante, como escassez de água, alta incidência solar e temperaturas extremas, sendo recorrentes nas zonas biogeográficas de Cerrado e Caatinga brasileiras (Ribeiro *et al.*, 2022; Paulino de Albuquerque e De Holanda Cavalcanti, 2002).

Esse gênero engloba plantas de pequeno porte, sendo raras árvores, mantendo-se geralmente como arbustos com folhas simples e opostas, com venação típica broquidódroma, cujas nervuras secundárias encontram-se anastomosadas próximo à margem, de capacidade frutífera e com inflorescência em pedúnculos unifloros ou trifloros (Araújo, 2010; Durães *et al.*, 2015). Compreende aproximadamente 120 espécies, das quais se destacam as goiabeiras (ex.: *Psidium guajava*) e araçazeiros (ex.: *Psidium cattleianum* Sabine, *Psidium guineense* Swartz) pelo alto potencial econômico gerado através do uso de suas várias partes.

Franzon *et al.* (2009) destaca em seu estudo o conhecimento popular acerca do potencial econômico e biotecnológico da espécie *P. guajava*, referenciando sua grande aceitabilidade. O alto retorno econômico proveniente do comércio das frutas e de produtos alimentícios derivados, que possuem alto valor nutritivo graças à presença de vitaminas A, B e C, assim como o potencial terapêutico gerado através das substâncias bioativas derivadas de seus frutos, folhas, flores, caule e raízes (López *et al.*, 2021), são algumas das justificativas para a alta produção científica acerca dessa espécie, com atividades antibacteriana (Anas *et al.*, 2008), antitumoral (Jiang *et al.*, 2020), antidiabética (Luo *et al.*, 2019), antimicrobiana (Lahlou *et al.*, 2022), anti-inflamatória (Oktavia *et al.*, 2021), antioxidante (Lahlou *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2019) e até espermato protetiva (Akinola *et al.*, 2007) descritas.

A similaridade biológica entre as espécies de goiabeiras e araçazeiros, aliada à pesquisa popular e científica extensa acerca do potencial das goiabeiras coloca em evidência o possível potencial econômico-terapêutico das mais diferentes espécies de araçazeiros, dentre eles o *Psidium guineense* Swartz.

2.1.1 *Psidium guineense* SW.

Caracterizada como uma espécie vegetal de origem sul-americana e sendo encontrada em todas as regiões do Brasil, *Psidium guineense* Swartz (Figura 1) é um arbusto ou árvore de pequeno porte, variando entre 70 cm até 10 m de altura, que apresenta casca polida, escamosa e resistente; caule com casca lisa; grande quantidade de galhos com folhas coriáceas e cerosas, de 4 até 12 cm de comprimento e 1-2 cm de largura, com coloração marrom-amarelada ou marrom-avermelhada e formato variando entre elíptico, elíptico-oblongo ou obovado ligadas à eles e inflorescências unifloras ou trifloras, que, em sua fase inicial são cobertas por pelos marrom-avermelhados e que tornam-se cinza-amareladas com o passar do tempo (Araújo, 2010; Franzon *et al.*, 2009; Bezerra *et al.*, 2018). É uma árvore frutífera, cujo fruto - o araçá- caracteriza-se por ser globoso ou ovóide, de 1 até 3 cm de comprimento, com casca amarelada ou avermelhada e polpa branca-amarelada, cujas sementes se apresentam em grande quantidade, variando entre 22 até 250 por fruto; sendo marcante por seu sabor azedo característico e pela alta presença de minerais e elementos funcionais como vitamina C e compostos fenólicos (Franzon *et al.*, 2019; Rodrigues-Silva *et al.*, 2021; Figueiredo *et al.*, 2018).

Figura 1: *Psidium guineense* SW: Arbusto (A), Frutos (B), Flor (C) e Folhas (D).



(Fonte: Bezerra *et al.*, 2018 (A); Pl@ntNet (B, C e D))

Popularmente conhecida como Araçá-do-Campo, Araçá-Comum ou Araçá-Azedo, essa espécie vegetal floresce no período de junho a dezembro e frutifica entre

janeiro e maio, podendo, entretanto, gerar frutos por todo o ano. É uma planta com alta capacidade de adaptação, podendo perder quase todas suas folhas para conservação de umidade em estações mais secas e se adaptando a todos os climas, crescendo mesmo em solos arenosos e pobres em nutrientes (Fernandes, 2018). Sua adequação frente às mudanças climáticas constantes de algumas zonas fitogeográficas podem justificar as diferenças genéticas, morfológicas e de composição entre as espécies presentes em solo brasileiro, como justificou Santos *et al.* (2014) em seu estudo.

Por ser uma planta bastante dispersa em solo sul-americano, seu uso por comunidades tradicionais se mostra bastante recorrente, sobretudo no último século, despertando interesse por seu potencial de uso em vários nichos socioeconômicos (Rodrigues-Silva *et al.*, 2021). Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou ser processados para gerar polpas, sorvetes, licores e geléias (Franzon *et al.*, 2009; Bezerra *et al.*, 2018); sua madeira pode ser utilizada para a construção de vigas, cercas, cabos de ferramentas, instrumentos agrícolas, móveis e usadas como lenha ou carvão (Rodrigues-Silva *et al.*, 2021); mas, sobretudo, vem mostrando crescente uso como planta medicinal, sendo descritos usos de todas as suas partes por vários grupos tradicionais brasileiros e sul-americanos.

Foram descritos o uso das folhas -mascadas ou por decocção- como antidiarreicas e antidisentéricas, antissépticas bucais, estimulantes, anti-espasmódicas, anti-inflamatórias de uso externo e cicatrizantes locais para o tratamento de úlceras cutâneas; da casca para o tratamento de doenças gastrintestinais; das flores como tônico capilar antiqueda e antidiarreicas; das sementes como antidiabéticas e das raízes como diuréticas e antidiarreicas (Bezerra *et al.*, 2018; Paniagua-Zambrana *et al.*, 2020; Fernandes, 2011). Também foram citadas outras atividades, porém sem descrição específica da parte utilizada, envolvendo o tratamento de cânceres e distúrbios hepáticos; o uso como antibacteriano; como alternativa no tratamento de náuseas e vômitos; contra transtornos respiratórios, como tosse, asma, gripe, bronquite e laringite; para tratar constipação (atuando como laxante) e cólicas; e no tratamento de úlceras e varizes (Paniagua-Zambrana *et al.*, 2020; Neira González *et al.*, 2005; Anesini e Perez, 1993).

Nota-se então uma variedade na aplicabilidade das partes desse araçazeiro, indicando um alto biopotencial que pode ser justificado pela alta presença de metabólitos secundários, já que essas substâncias são responsáveis pela promoção da atividade terapêutica (Hussein e El-Anssary, 2019).

2.1.1.1 Extrato Hidroalcoólico

Neira González *et al* (2005) foi uma das pioneiras ao descrever a presença de aldeídos, flavonoides, fenóis, triterpenos, cetonas, taninos e açúcares na casca e polpa dos frutos de *P. guineense*, correlacionando sua presença com a capacidade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* vista no extrato metanólico e suas frações. Rivero-Maldonado *et al.* (2013) detalhou a presença de variados flavonoides observados nas folhas de diversas espécies de *Psidium*. Similarmente, Francisco e Medonça (2015) observaram a presença e bioatividade de taninos e flavonoides identificados em folhas novas e velhas de araçá contra isolados de *Enterococcus Faecalis*. Apesar de alguns relatos, o perfil fitoquímico das folhas não está completamente elucidado, visto que a cada dia são descobertos novos compostos que apresentam bioatividade.

O extrato hidroalcoólico, como o próprio nome diz, trata-se de uma formulação feita através da combinação do material vegetal, água e algum tipo de álcool. É uma preparação cuja metodologia se baseia na extração de metabólitos secundários através do uso de técnicas de manejo do material vegetal, como secagem e maceração, e de sua interação com solventes (Abubakar e Haque, 2020). O uso da água associada ao álcool contribui para a obtenção de moléculas com características químicas diferentes (Naboulsi *et al.*, 2018; Abubakar e Haque, 2020).

Pode-se observar uma semelhança na linha de pensamento que embasa a metodologia no preparo dos extratos produzidos laboratorialmente e daqueles produzidos na medicina tradicional como chás e “garrafadas”, sendo que esses possuem como principal embasamento teórico o conhecimento popular ou local (Brito e Pontes, 2021; Da Veiga Correia *et al.*, 2022). Os chás são preparações produzidas através da decocção do material vegetal (geralmente folhas) em água fervente enquanto as garrafadas envolvem a mistura de uma bebida, alcoólica ou não alcoólica, com uma (ou mais) espécie(s) de planta(s) medicinal(ais). Apesar das possíveis diferenças na preparação e nos solventes utilizados para extração das fitomoléculas bioativas, Barbosa, Lucena e Cruz (2019) expressam não haver perda significativa de metabólitos secundários através do uso de diferentes solventes durante a produção dos extratos feitos pela população tradicional, afirmando que, mesmo com as diferenças entre os extratos aquosos (chás) e alcoólicos (garrafadas), quando comparados, a presença dos metabólitos secundários encontrados se mantém similar, mantendo a bioatividade das preparações.

2.2 GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Staphylococcus é um gênero de bactérias Gram-positivas de formato cocóide que fazem parte da família Micrococcaceae, sendo representado por 33 espécies que se encontram disseminadas no ambiente ou que atuam como comensais na pele, mucosas e outras partes do corpo de humanos e animais (Koneman, 2018; Fernandes, 2011). Suas espécies envolvem bactérias pequenas, de 0,6-1,6 μm ; sem motilidade; não formadoras de esporos e catalase positivas, que podem se moldar em diferentes arranjos, sendo encontradas na forma isolada, em pares, tétrades e cadeias curtas (Taylor e Unakal, 2023).

Algumas espécies desse gênero podem ser caracterizadas como oportunistas, demonstrando potencial patogênico quando em condições apropriadas, sendo, com exceção das Enterobacteriaceae, os microrganismos mais isolados em amostras clínicas (Koneman, 2018). Dentre as bactérias importantes e com potencial patogênico do gênero podem-se citar: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, e, principalmente, *S. aureus*.

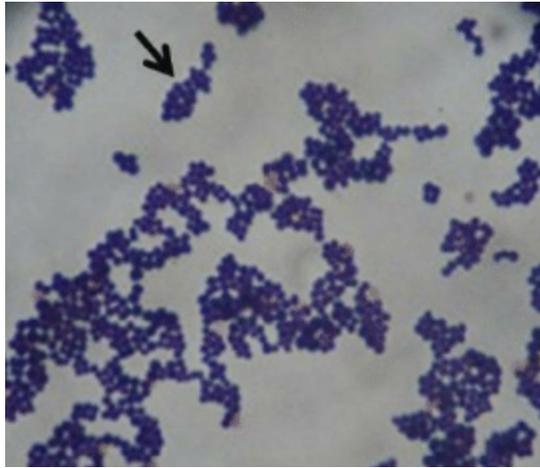
2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus foi descoberta pela primeira vez no século XIX, pelo cirurgião Dr. Alexander Ogston, que foi capaz de isolá-la a partir de amostras de pus coletadas em abscessos humanos, recriando-as posteriormente em camundongos saudáveis (Medeiros, 2023). É uma bactéria cuja literatura atual é extensa, retratando sua presença no ambiente; como comensal na microbiota humana; e, principalmente, tratando do seu potencial patogênico oportunista, apresentando destaque como agente etiológico de infecções e doenças em humanos, justificadas por sua alta virulência, caráter invasivo e rápida evolução de resistência contra antimicrobianos (Domingues *et al.*, 2021).

2.2.1.1 Metabolismo, Características Bioquímicas e Morfológicas

S. aureus (Figura 2) é uma bactéria Gram-positiva, de formato cocóide que chega a aproximadamente 0,8 μm de diâmetro, cujo arranjo majoritário se dá em *clusters* de “cacho-de-uva” (Mueena *et al.*, 2015). É pigmentada, hemolítica, não formadora de esporos e não apresenta flagelos, sendo assim, imóvel. Cresce em meios considerados comuns, como caldo ou ágar simples, em pH=7 e na temperatura ótima de 37°C. Após 18-24h de incubação, quando semeada, forma colônias lisas, brilhantes e arredondadas, com coloração variante, já que sua pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado (Santos *et al.*, 2007).

Figura 2: *Staphylococcus aureus* vista por Microscopia Óptica (100x) : Colônias Gram-positivas com seta destacando o arranjo em “cacho-de-uva”.



Fonte: Mueena *et al.* (2015)

Sua identificação leva em conta seu crescimento característico em meio ágar manitol salgado (MSA, em inglês), formando colônias de coloração amarelo-dourada que dão origem ao seu nome (*aureus* significa dourado em latim) e a presença de enzimas como a catalase e a coagulase, sendo positiva para as duas (Taylor e Unakal, 2023). O teste da coagulase é uma das características mais confiáveis durante o processo de identificação de espécies de *S. aureus* patogênica atualmente (Koneman, 2018).

2.2.1.2 Incidência

Existe benignamente na microbiota, estando majoritariamente presente no nariz, pele, boca, garganta, axila, virilha e intestino de humanos e animais, mas pode ser encontrada em outros sítios (Howden *et al.*, 2023), crescendo de maneira aeróbica ou anaeróbica (facultativa) em temperaturas entre 18 a 40°C (Taylor e Unakal, 2023). Contudo, pode apresentar potencial patogênico, contornando o sistema imunológico e causando infecções que podem ser facilmente disseminadas, conformando um dos maiores problemas de saúde da atualidade no Brasil, onde os índices de cepas de *S.aureus* resistentes nos hospitais variam de 40 até 80% (De Sousa *et al.*, 2016), e no mundo, onde cepas resistentes estão presentes em quase todos os continentes (Raoofti *et al.*, 2023), gerando uma maior necessidade de tempo requerido para seu tratamento, ocasionando alto custo por isso.

Como bactéria patogênica, *S.aureus* é causadora de processos infecciosos de gravidade variável, causando doenças que afligem tanto a comunidade como o ambiente hospitalar, sendo esse último onde apresenta altos níveis de morbimortalidade, estando fortemente associada às infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Botêlho *et al.*, 2022). A gravidade dos processos infecciosos estafilocócicos causados por essa bactéria pode

ser classificada em 3 categorias: os casos leves, que são relativamente benignos e envolvem pacientes com infecções de pele e de tecidos moles, como as celulites, foliculites ou furúnculos; os médios, que envolvem em sua maioria as intoxicações alimentares; e os de maior gravidade, processos geralmente sistêmicos e potencialmente fatais, que envolvem as bacteriemias, osteomielites, pneumonias, endocardites e sepses (Howden *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2007). Maiores riscos para infecção por cepas resistentes podem ser observados em indivíduos imunodeprimidos, expostos a antibioticoterapia prévia e/ou inadequada, pacientes em uso de cateteres e próteses, pessoas e profissionais de saúde em contato com pessoas já infectadas, idosos, pacientes pós-cirúrgicos, aqueles que foram submetidos a internamento hospitalar prolongado e portadores de doenças crônicas (Cavalcanti *et al.*, 2006).

Sua incidência pode, então, ser considerada multifatorial, uma vez que se refere às condições ambientais e individuais que lhe são oferecidas para manutenção da sua viabilidade, associadas aos diversos mecanismos de resistência e virulência intrínsecos de isolados dessa espécie (Medeiros, 2018).

2.2.1.3 Mecanismos de Virulência

O potencial de patogenicidade dos isolados de *S. aureus* são consequência direta dos seus fatores de virulência, cujas funções englobam a adesão celular, a captação de nutrientes e a evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Santos *et al.*, 2007). Essa espécie possui uma diversidade de mecanismos de virulência que se relacionam não só com sua patogenicidade, mas também na sua disseminação e capacidade de resistência.

Segundo Yehia *et al.* (2021), esses mecanismos podem ser divididos em dois grandes grupos: o primeiro consistindo de fatores associados à invasão e inflamação, envolvendo aqueles atuantes na colonização e na produção de moléculas extracelulares que ajudam a adesão e imunomodulação; e o segundo consistindo na produção de toxinas e na capacidade de formação de biofilme. A produção desses diversos fatores requer uma série de sistemas regulatórios que sofrem ação de fatores externos como nutrição e condições ambientais (Zhang *et al.*, 2018; Yehia *et al.*, 2021).

Terapias atuais que visam combater ou diminuir a produção de fatores de virulência vêm recebendo bastante atenção, pois essa estratégia pode ser capaz de gerar bactérias com menor capacidade de desenvolver resistência, desequilibrando seu metabolismo e capacidade de adaptação (Zhang *et al.*, 2018). Contudo, é importante ressaltar que esses fatores não estão presentes em todas as cepas de *S. aureus* (Koneman, 2018).

2.2.1.3.1 Estafiloxantina

A estafiloxantina (STX) é um dos fatores de virulência mais proeminentes, sendo produzida em mais de 90% dos isolados de *Staphylococcus aureus*. É um pigmento carotenóide que dá a coloração amarelo-dourada característica da espécie e que apresenta grande potencial antioxidante (Liu *et al.*, 2005). Não tem mecanismo de ação completamente elucidado, mas sabe-se que esse fator possui propriedades que aumentam a resistência bacteriana contra a atividade de neutrófilos e de radicais livres moduladores de estresse oxidativo, sendo capaz de promover imunomodulação e evadir a resposta imune inata (Elmessaeri *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2005). Além disso, sua presença está também associada à promoção da integridade da membrana celular bacteriana (Yehia *et al.*, 2021).

Acredita-se que controlar a via biossintética de produção desse pigmento seja um procedimento vantajoso, uma vez que poderia limitar a patogenicidade e consequente presença de *S. aureus* em infecções, tornando-a mais suscetível à resposta imune do hospedeiro (Elmessaeri *et al.*, 2022).

2.2.1.3.2 Capacidade Hemolítica

A capacidade hemolítica que os isolados de *S. aureus* possuem está intrinsecamente ligada à secreção de uma das inúmeras exotoxinas que ela produz: as hemolisinas. Hemolisinas são um grupo de polipeptídeos capazes de danificar a membrana de células do hospedeiro, atuando como um importante fator de virulência e gerando o fenótipo β -hemolítico característico dessa espécie, além de se relacionar à formação de biofilme (Zhang *et al.*, 2016 ; Vandesnech *et al.*, 2012). Quase todas as cepas secretam os quatro tipos de hemolisinas identificadas -alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ)- (Dinges *et al.*, 2000), sendo que o efeito isolado ou combinado desses tipos de hemolisina resultam na destruição da membrana celular dos eritrócitos que levam a formação do anel completamente transparente visualizado em placas de ágar sangue (Zhang *et al.*, 2016).

A α -hemolisina é produzida por uma alta porcentagem de isolados e possui como característica definitiva a habilidade de lisar eritrócitos animais e humanos, apresentando também relatos sobre sua capacidade dermonecrótica e neurotóxica, porém com menos destaque (Dinges *et al.*, 2000). Foi a primeira hemolisina a ser descoberta e é um dos fatores importantes para a colonização de *S. aureus* na mucosa, especialmente nas infecções de trato respiratório (Zhang *et al.*, 2016). Seu mecanismo de ação envolve a adesão à membrana celular dos eritrócitos, causando a formação de poros que afetam o transporte molecular de íons como cálcio e potássio e a integridade celular, podendo induzir morte por

apoptose e hemólise (Koneman, 2018; Verdon *et al.*, 2009; Vandesnech *et al.*, 2012).

A β -hemolisina foi a segunda hemolisina descoberta, apresentando ação variável quanto à susceptibilidade de sua ação (Koneman, 2018). Seu mecanismo de ação difere das outras hemolisinas, não gerando hemólise pela formação de poros, mas sim por apresentar atividade de esfingomielinase C, uma enzima que ataca a esfingomielina, substância presente na maioria das membranas plasmáticas de animais, causando modificação na fluidez membranar e desestabilizando a bicamada lipídica (Vandesnech *et al.*, 2012; Verdon *et al.*, 2009). Supõe-se que ela atue aumentando a sensibilidade celular de eritrócitos, não atuando necessariamente de forma direta no processo de lise, mas aumentando a susceptibilidade à ação de outros fatores de virulência (Vandenesch *et al.*, 2012).

A γ -hemolisina possui descoberta mais recente, não havendo muitos relatos detalhados quanto ao seu mecanismo de ação ou presença. Dinges *et al.* (2000) indica formação desse fator por todas as cepas de *S. aureus*. Há relatos sobre sua atividade contra leucócitos através de degranulação do citoplasma e de lise de hemácias por geração de intumescimento celular com a formação de poros (Koneman, 2018; Verdon *et al.*, 2009).

Por último, a δ -hemolisina é a hemolisina de maior alcance dentre as secretadas por *S. aureus*, atuando de maneira isolada ou sinérgica com as demais hemolisinas na lise não só de eritrócitos, mas também de outros tipos celulares e até de organelas em mamíferos (Verdon *et al.*, 2009). Seu mecanismo de ação pode envolver (I) a ligação à superfície celular e formação de poros; (II) a ligação à superfície celular e alteração da curvatura membranar, causando desestabilização ou (III) atuação como surfactante quando em alta concentração, agindo como detergente e solubilizando a membrana (Vandenesch *et al.*, 2012; Verdon *et al.*, 2009; Dinges *et al.*, 2000); todos esses mecanismos gerando como produto final a hemólise.

O conjunto das ações e a presença dessas diferentes hemolisinas geram, então, um potencial virulento aumentado nos diferentes isolados de *S. aureus*, prejudicando a resposta do hospedeiro frente às infecções estafilocócicas ao causar hemólise e imunomodulação -por afetar a integridade celular dos leucócitos-, sendo um importante objeto de estudo quanto ao combate de cepas resistentes (Zhang *et al.*, 2016).

2.3 ANTIBIOTICOTERAPIA ATUAL

A maioria dos microrganismos patogênicos têm a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência, sendo essa capacidade adquirida ou intrínseca. Segundo Shelke *et al.* (2023), os três maiores fatores que causam resistência antimicrobiana

(RAM) são: o uso excessivo e inapropriado de antibióticos; a não-aderência aos mecanismos de controle de infecções e a emergência de patógenos MDR. O aumento na RAM diminui as possibilidades no tratamento com antibióticos e garante a prevalência de microrganismos resistentes, já que mesmo com a oferta de novos agentes antimicrobianos, a demanda por agentes eficazes se mantém crescente, uma vez que é observada resistência documentada para todos os antibióticos disponíveis atualmente (Reygaert, 2018). Percebe-se, então, uma alta velocidade de adaptação para alguns microrganismos, com o surgimento de fatores de resistência pouco depois da liberação de novas drogas para uso.

Staphylococcus aureus é um desses microrganismos com alta plasticidade, sendo capaz de se tornar resistente a todas as classes de antibióticos disponíveis (Vestergaard *et al.*, 2019). A preocupação com sua capacidade de resistência surgiu e se disseminou em meados dos anos 60, com o isolamento das primeiras cepas resistentes à meticilina, caracterizando as cepas MRSA, sigla em inglês (Medeiros, 2023). Isolados de *S. aureus* MDR desenvolvem uma série de recursos que os auxiliam a inibir os efeitos dos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções estafilocócicas, destacando-se a secreção de beta-lactamases (Guo *et al.*, 2020); a produção de biofilme (Shelke *et al.*, 2023); a alteração nas proteínas de ligação à penicilina (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022) e a expressão aumentada de fatores de virulência (Zhang *et al.*, 2018). Objetivando a descoberta de novas opções para o tratamento de isolados com resistência, a combinação entre antibióticos entre si e de antibióticos com outras substâncias antimicrobianas vem sendo cada vez maior, uma vez que a monoterapia como opção de tratamento vem se mostrando cada vez mais ineficaz (Fernandes, 2018; Vestergaard *et al.*, 2019).

2.3.1 Gentamicina

Gentamicina (GEN) é um antibiótico de amplo espectro pertencente à classe dos aminoglicosídeos passível de utilização contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de síntese proteica ao ligar-se à subunidade ribossomal 30s, promovendo reconhecimento códon-anticódon inadequado que prejudica o processo de tradução, gerando proteínas mal-formadas que se incorporam à membrana celular bacteriana e aumentam sua permeabilidade, prejudicando o processo de influxo/efluxo de moléculas (Vestergaard *et al.*, 2019).

É geralmente utilizada como monoterápico, sendo aplicada de forma tópica para o tratamento de infecções e ferimentos de pele (Papadopoulou *et al.*, 2023) e pode ser utilizada em combinação para o tratamento de pacientes com endocardite e outras infecções

mais graves (Vestergaard *et al.*, 2019). Isolados de *S. aureus* resistentes à GEN são geralmente resistentes a todos os aminoglicosídeos, graças à presença de genes que promovem síntese de transferases que modificam a molécula aminoglicosídea e a tornam inativa (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

2.3.2 Ciprofloxacino

O ciprofloxacino (CIP) é um antibiótico bactericida pertencente à classe das fluoroquinolonas, sendo comumente prescrito na antibioticoterapia como monoterápico para o tratamento de infecções oculares como ceratite e conjuntivite e também de infecções do trato urinário graves, estando disponível para uso em preparações orais ou por via intravenosa (Afzal *et al.*, 2022; Fakron *et al.*, 2022). Também é aplicado no tratamento de uma série de infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, inclusive as causadas por MRSA (Medeiros, 2023). Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da replicação e transcrição do DNA bacteriano, apresentando dois alvos moleculares: as enzimas topoisomerase IV e DNA girase (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022). Graças ao seu amplo espectro de atuação e custo-benefício, ele é um dos antibióticos com maior aplicabilidade nos ambientes de assistência à saúde na atualidade.

A resistência de *S. aureus* para com antibióticos dessa classe envolve mutações nas regiões de ligação das enzimas previamente citadas, promovendo síntese de proteínas com menor susceptibilidade -ou até insensibilidade- às fluoroquinolonas, como CIP (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022). Essa resistência chega a uma prevalência de até 60%, sendo cada vez maior a necessidade do seu uso conjugado com outras substâncias antimicrobianas (Vestergaard *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico de ação antimicrobiana e antivirulência do extrato hidroalcoólico de folhas de *Psidium guineense* SW. contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material vegetal (folhas de *Psidium guineense*) e obter o extrato hidroalcoólico a partir dele;
- Caracterizar o extrato por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e quantificar os marcadores por espectrofotometria UV-Vis e CLAE;
- Determinar a CIM e CBM;
- Realizar ensaio de Sinergismo Antimicrobiano;
- Realizar ensaio de Curva de Crescimento;
- Avaliar o Mecanismo Antivirulência.
 - Atividade anti-hemolítica
 - Inibição da Estafiloxantina (STX)

4 METODOLOGIA

4.1 MANEJO DO MATERIAL VEGETAL E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

4.1.1 Coleta e Produção do Extrato

As folhas de *Psidium guineense* foram coletadas em Recife, Pernambuco. A identificação botânica foi realizada por Tianisa Prates Boeira, Número do voucher: 56155 e um espécime foi depositado no PEUFR – Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Posteriormente, fez-se a secagem do material vegetal em estufa de ar circulante (48h, 45°C; Lucadema®) seguida por trituração em moinho de facas (Tecnal®). O extrato líquido das folhas de *P. guineense* foi obtido por turbólise numa proporção de 10% (p/v) em água:etanol (1:1) com três ciclos de 30 segundos e intervalos de 4 minutos. O material obtido foi rotaevaporado e liofilizado, de onde resultou o extrato hidroalcoólico em pó. Uma alíquota foi pesada para ser caracterizada, empregando métodos gerais em Farmacognosia de acordo com a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019).

4.1.2 Caracterização por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência

O extrato foi submetido à cromatografia em camada delgada de alta eficiência o com auxílio de sistema de aplicação semiautomático (Camag®), controlado por programa computacional. Após eluição em câmaras apropriadas, as placas foram observadas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) antes e depois da derivatização com os reagentes apropriados. Após digitalização, a identificação foi realizada através de comparação da coloração e R_fs das bandas observadas nos perfis da amostra com o resultado observado para padrões.

4.1.3 Análise Quantitativa de Compostos Majoritários

A determinação quantitativa dos polifenóis no extrato foi realizada através de espectrofotometria no UV-Vis e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Com a impossibilidade de analisar todos os polifenóis, outro detector -DAD- foi utilizado para complementação dos resultados.

4.2 TESTES DE AVALIAÇÃO PARA COM OS ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4.2.1 Determinação da CIM e CBM

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em placa de

cultura de 96 poços. Os microrganismos testados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e isolados clínicos de *S. aureus* resistente a antibióticos (UFPEDA-659, UFPEDA-671, UFPEDA-691, UFPEDA-705, UFPEDA-731 e UFPEDA-802) obtidos da coleção de microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco. A suscetibilidade dos isolados foi previamente avaliada por técnica de disco difusão.

As concentrações celulares finais foram ajustadas para 1×10^7 UFC/mL usando a escala de McFarland. Meio de crescimento Mueller-Hinton foi adicionado a cada poço junto com microrganismos previamente preparados e diferentes concentrações (2-1024 $\mu\text{g/mL}$) do extrato. Ciprofloxacina (CIP) e Gentamicina (GEN) foram utilizados como antibióticos de referência (0,125 - 1024 $\mu\text{g/mL}$). Os poços contendo microrganismos em ausência do extrato ou antibiótico corresponderam a 100% de controle de crescimento. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. Solução de resazurina (0,01%) foi utilizada como indicador de crescimento bacteriano. A concentração mais baixa na qual a solução não apresentou alteração de cor (de roxo para rosa) foi considerada como o CIM.

Para avaliação da CBM, uma alíquota (10 μL) da suspensão do poço foi transferida para placas de Ágar Mueller-Hinton e incubada por 24h a 37°C . A CBM determinou-se como a menor concentração de extrato capaz de prevenir o crescimento bacteriano.

4.2.2 Ensaio de sinergismo

A combinação do extrato com Ciprofloxacino ou Gentamicina foi estudada utilizando o ensaio de microdiluição. Diluições do extrato (40 μL) foram adicionadas separadamente aos micropoços contendo diluições de antibióticos (40 μL), então, 110 μL de Caldo Mueller Hinton e 10 μL de suspensão de células (1×10^7 CFU / mL) foram adicionados. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. O índice de concentração inibitória da fração (ΣFIC), ficou estabelecido como segue: $\Sigma\text{FIC} = (\text{CIM do extrato em combinação}/\text{CIM do extrato sozinho}) + (\text{CIM de antibiótico em combinação}/\text{CIM de antibiótico sozinho})$. As combinações foram classificadas como sinergismo total ($\text{FIC} \leq 0,5$), sinergismo parcial ($0,5 < \text{FIC} \leq 0,75$), nenhum efeito ($0,75 < \text{FIC} \leq 2$) ou antagonismo ($\text{FIC} > 2$).

4.2.3 Curva de crescimento

S. aureus ATCC 29213 (1×10^7 UFC/mL) foi tratado com o extrato a $1 \times \text{CIM}$ e $2 \times \text{CIM}$, com controle contendo apenas DMSO (1%). As bactérias foram então cultivadas a 37°C com agitação 180 (r minutos $^{-1}$) por 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24h, respectivamente. Em

intervalos de tempo selecionados, a DO600 dos sobrenadantes foi analisada usando espectrofotômetro. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

4.2.4 Ação Antivirulência: Avaliação Anti-Hemolítica

S. aureus ATCC 29213 foi utilizada para investigar os efeitos do extrato na inibição da hemólise no sangue humano. O teste de hemólise foi realizado conforme descrito por Almaaytah *et al.* (2014). Sucintamente, as culturas de fase *log* foram reinoculadas [1: 100 (v / v)] em infusão de cérebro e coração (BHI) com concentrações subinibitórias do extrato. Após 16h, 500µL dessas culturas foram adicionados a 1mL de solução de eritrócitos humanos (3%) e incubados a 37 ± 1 °C por 1 h com agitação (250 rpm). O sobrenadante foi coletado por centrifugação (3200 rpm por 10 min) e a densidade óptica foi medida a 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.5 Ação Antivirulência: Avaliação da Inibição da Estafiloxantina (STX)

Culturas de *S. aureus* ATCC 29213 foram inoculadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas por 24h a 37°C. Posteriormente, o inóculo foi diluído (1:100) em BHI e as amostras (1mL) desta suspensão foram incubadas com concentrações subinibitórias do extrato e passaram por incubação por 24h a 37°C. As células bacterianas foram então colhidas por centrifugação (10.000 rpm por 10 min), lavadas duas vezes com solução salina e novamente centrifugadas. Para a extração dos pigmentos carotenóides, o *pellet* foi ressuspensão em 0,2 mL de metanol antes do aquecimento a 55 ° C por 3min. O pigmento extraído foi separado dos restos celulares por centrifugação (10.000 rpm por 10 min). O procedimento de extração de pigmento foi realizado três vezes para maximizar a extração de STX . As densidades ópticas das extrações coletadas foram medidas por espectrofotometria em 465 nm.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos, além dos gráficos e tabelas geradas, foram analisados através do programa GraphPad Prism®, versão 8.0. Os resultados foram expressos como médias \pm S.D. As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni ou Dunnett's quando houve necessidade de comparação entre as diferenças significativas entre os grupos. Os valores foram considerados significativamente diferentes em $p < 0,05$.

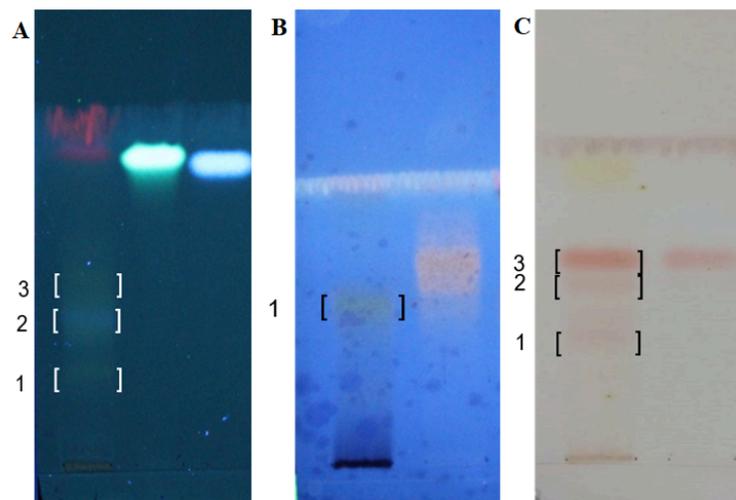
5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

5.1.1 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)

A partir da análise por CCD-AE, o extrato demonstrou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas e açúcares. Não foi possível identificar a presença de fenóis, terpenos, alcalóides, derivados antracênicos e taninos condensados. Na Figura 3A é possível observar a presença de 3 bandas na análise da amostra do extrato liofilizado de *P. guineense*, com colorações amarela-esverdeada e azuladas semelhantes aos padrões de Quercetina e Ácido cafeico, correspondendo à presença de flavonoides e derivados cinâmicos, respectivamente. A Figura 3B mostra a presença de 1 banda de coloração marrom semelhante ao padrão Escina, de mesma coloração, indicando a presença de saponinas na amostra. Na figura 3C observam-se 3 bandas rósea-avermelhadas, indicativas de presença de açúcares. Ademais, a banda correspondente ao padrão de D-frutose utilizado na análise apresentou a mesma coloração e Rf que a banda 3 da amostra.

Figura 3: Cromatoplaça referente à análise da presença de flavonoides e derivados cinâmicos, saponinas e açúcares.



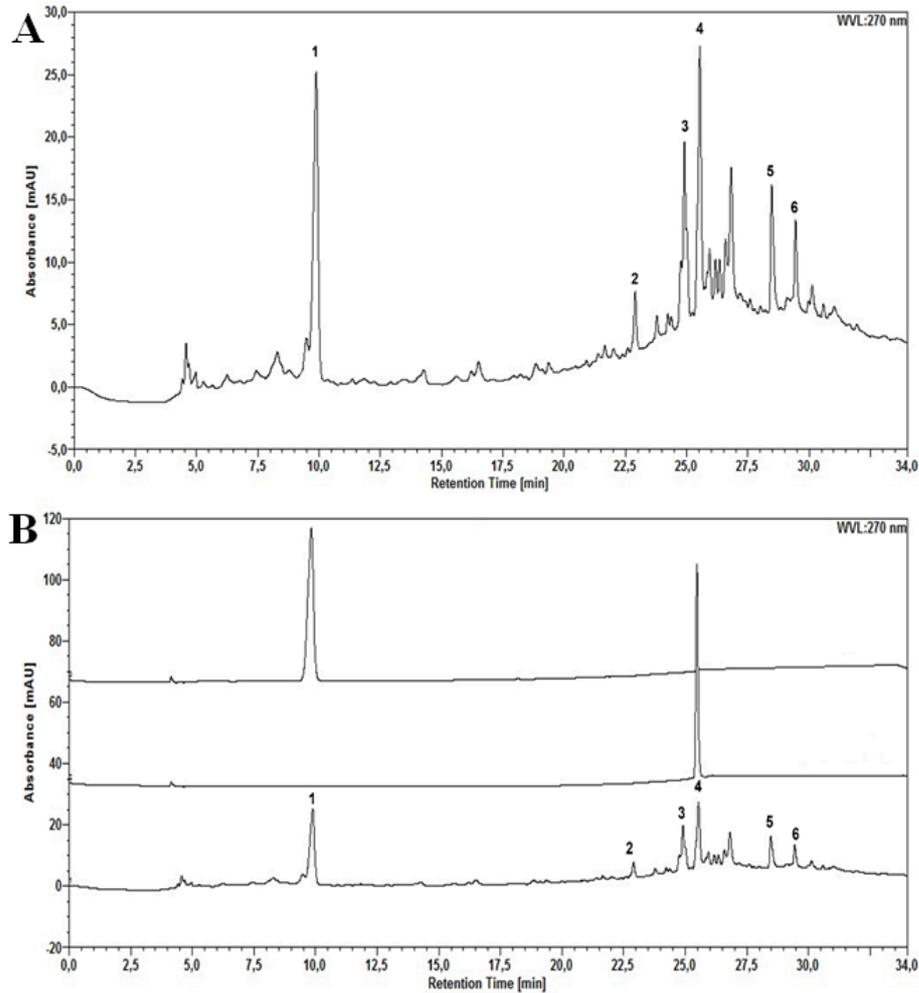
Fonte: Autora (2023)

5.1.2 Quantificação dos metabólitos presentes por CLAE

Através da análise do perfil cromatográfico, observa-se a presença de diversos compostos (realizada em 270 nm) (Figura 4A). O pico nº 1, observado no tempo de retenção 9.88 min, corresponde à presença de Ácido Gálico (com máximos em 214.9/271.5 nm) e o pico nº 4 corresponde à presença de Rutina (com máximos de absorção em

260.9/357.3 nm), evidenciados após injeção dos padrões (Figura 4B).

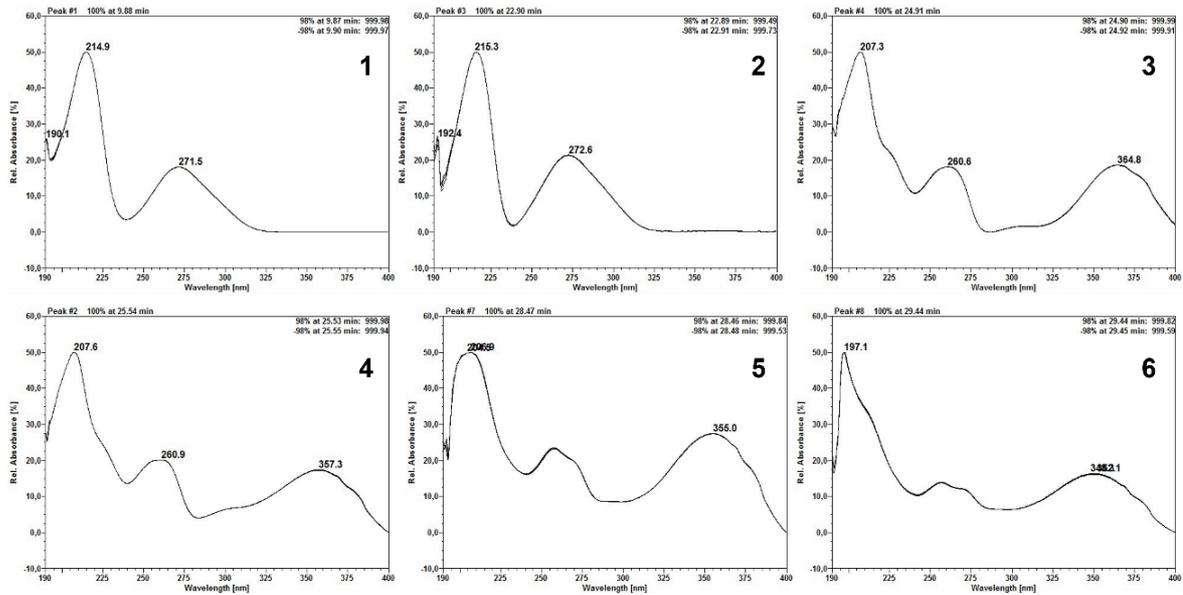
Figura 4: Cromatograma do extrato (A) e do extrato e padrões (B) em 270 nm.



Fonte: Autora (2023)

Como não foi possível identificar todas as substâncias presentes, utilizou-se o detector DAD para classificação dos outros 4 compostos com picos observados na figura 4B. Com isso, foi possível verificar que os espectros de varredura UV (Figura 5) de outros 3 compostos observados correspondem a presença de flavonoides na amostra (Mabry *et al.*, 1970), cujos máximos de absorção foram: 260.6/364.8 nm (pico 3); 255/355 nm (pico 5); 258/345 nm (pico 6).

O composto evidenciado no pico 2, com máximos de absorção em 215.3/272.6 nm corresponde a presença de um tanino hidrolisável na amostra, evidenciado pela semelhança com o espectro de varredura do pico 1.

Figura 5: Espectros de varredura correspondente aos picos 1 a 6 evidenciados no extrato em 270 nm.

Fonte: Autora(2023)

Os teores foram calculados com base nas equações da reta obtida para o padrão de Ácido Gálico -para taninos hidrolisáveis- e Rutina -para flavonoides-, estando descritos na tabela 1.

Tabela 1: Teores obtidos expressos em g% (média ± desvio padrão)

SUBSTÂNCIAS	EXTRATO
ÁCIDO GÁLICO	1,61 ± 0,0010
PICO 2*	0,21 ± 0,0010
PICO 3#	0,50 ± 0,0004
RUTINA	0,94 ± 0,0008
PICO 5#	0,47 ± 0,0006
PICO 6#	0,31 ± 0,0043

* Calculados como Ácido Gálico; # Calculados como Rutina.

5.2 ANÁLISES ENVOLVENDO ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

5.2.1 CIM e CBM

A atividade antimicrobiana do extrato de *P. guineense* e antibióticos selecionados contra *S. aureus*, incluindo isolados com perfil MDR, foi determinada por CIM e CBM. Foi constatada atividade do extrato em relação a todos os isolados testados, com CIM e

CBM variando de 256–512 $\mu\text{g/mL}$ e 512–1024 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os isolados UFPEDA 671, 691, 731 e 802 apresentaram resistência a todos os antibióticos testados no presente estudo (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *P. guineense* e antibióticos ($\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>	Extrato		CIP		GEN	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
ATCC 29213	256*	512*	0.5	4	0.5	4
UFPEDA 659	256*	512*	1	4	1	4
UFPEDA 671	256*	512*	32	64	8	16
UFPEDA 691	256*	512*	8	16	8	32
UFPEDA 705	256*	512*	8	16	1	8
UFPEDA 731	512*	1024*	32	64	16	32
UFPEDA 802	512*	1024*	64	128	16	64

CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina. CIM: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); CBM: concentração bactericida mínima ($\mu\text{g/mL}$). Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.2 Ensaio de Sinergismo Bacteriano

Esse ensaio visou determinar se os antibióticos testados e o extrato tiveram -ou não- impacto sinérgico, cujos resultados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Interação sinérgica entre extrato de *Psidium guineense* e antibióticos contra *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>	FIC		ΣFIC	Efeito	FIC		ΣFIC	Efeito
	Extrato	CIP			Extrato	GEN		
ATCC 29213	0,12	0,25	0,37	Total*	0,12	0,25	0,37	Total*
UFPEDA 659	0,12	0,25	0,37	Total*	0,12	0,12	0,25	Total*
UFPEDA 671	0,12	0,06	0,18	Total*	0,06	0,06	0,12	Total*
UFPEDA 691	0,12	0,12	0,25	Total*	0,12	0,06	0,18	Total*
UFPEDA 705	0,12	0,12	0,25	Total*	0,06	0,25	0,31	Total*
UFPEDA 731	0,12	0,06	0,18	Total*	0,03	0,25	0,28	Total*
UFPEDA 802	0,12	0,5	0,62	Parcial*	0,06	0,25	0,31	Total*

CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina. FIC de extrato de *Psidium guineense* = CIM de extrato de *Psidium guineense* em combinação com antibiótico/CIM de extrato de *Psidium guineense* sozinho; FIC de Antibiótico = CIM de antibiótico em combinação com EsEO/CIM de antibiótico sozinho; ΣFIC = FIC de extrato de *Psidium guineense* + FIC de antibiótico. Os experimentos foram realizados em triplicata.

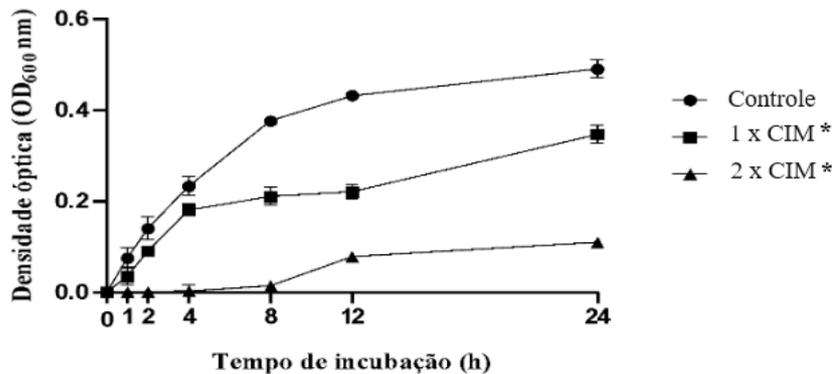
O uso de extrato de *P. guineense* em conjunto com GEN demonstrou sinergia completa em sua eficácia contra todas as cepas de *S. aureus*. Já a combinação do

extrato com CIP mostrou eficácia contra todas as bactérias, com exceção do isolado UFPEDA 802.

5.2.3 Ensaio da Curva de Crescimento

Um teste de susceptibilidade foi realizado para determinar qual isolado seria utilizado para realização desse ensaio, tendo sido escolhida a cepa *S. aureus* ATCC 29213. Observando o gráfico da Figura 6, conclui-se que em uma concentração de 2 vezes a CIM (512 µg/mL), o extrato foi capaz de inibir o desenvolvimento do isolado ATCC 29213 nas primeiras 8 horas, como também foi capaz de retardar significativamente seu desenvolvimento em uma concentração de 1 vez a CIM (256 g/mL) nas primeiras 12 horas ($p < 0,05$).

Figura 6: Curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 afetadas pelo extrato de *Psidium guineense*. *S. aureus* ATCC 29213 tratado com extrato de *Psidium guineense* a 1x CIM (256 µg/mL) ou 2x CIM (512 µg/mL).



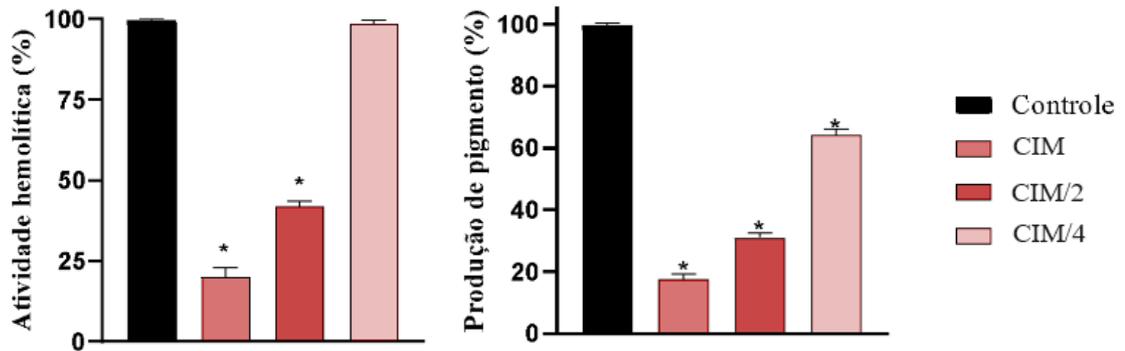
Fonte: Autora (2023)

5.2.4 Mecanismo Anti-virulência (Atividade anti-hemolítica e Avaliação da inibição da Estafiloantina (STX))

Nesses testes, investiga-se o efeito que o extrato de *Psidium guineense* tem na atividade hemolítica, bem como na geração de STX por *S. aureus* ATCC 29213. Nos valores de CIM e CIM/2, o extrato mostrou uma capacidade significativa de inibir a hemólise produzida por *S. aureus* ($p < 0,05$), com percentual de inibição de 79,78% e 57,77%, respectivamente (Figura 7A). Em uma concentração igual à CIM/4, houve apenas 1,10% de inibição.

No tratamento de *S. aureus* nas concentrações CIM, CIM/2 e CIM/4, houve uma diminuição nos níveis de STX de 82,60%, 69,05% e 35,76%, respectivamente, conforme medido pelo Teste STX (Figura 7B).

Figura 7: Efeitos do extrato de *P. guineense* na inibição da hemólise (A) e produção de estafiloxantina (B) causada por *S. aureus* ATCC 29213.



Fonte: Autora (2023)

6 DISCUSSÃO

Diferentes espécies vegetais que pertencem ao gênero *Psidium* mostram uma composição rica em metabólitos secundários como flavonoides, taninos e compostos fenólicos (Macedo *et al.*, 2021; Zandoná *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2014). Um estudo comparativo realizado por Adam *et al.* (2011) verificou a diferença qualitativa e quantitativa entre compostos presentes nos óleos essenciais de duas espécies de *Psidium*, sendo uma goiabeira (*P. guajava*) e o outro, um araçazeiro (*P. cattleianum*). Nele, descreveu a presença de uma variedade de compostos, sendo, em sua maioria, terpenos e taninos, que, apesar de terem sido observados nas duas espécies, variavam em quantidade.

Similarmente, Sruthi *et al.* (2019) avaliaram a composição química de extratos metanólicos derivados de *P. guajava* e *P. guineense*, observando em ambos a presença de taninos, saponinas, cumarinos, terpenos, fenóis, flavonóides e quinonas. Entretanto, enquanto o primeiro observou presença e quantidade maior de compostos bioativos no óleo essencial de *P. guajava*, o estudo de Sruthi e colaboradores mostrou uma análise quantitativa total de fenóis, terpenos, flavonoides e taninos maior no extrato de *P. guineense*. A análise qualitativa do extrato hidroalcoólico de *P. guineense* produzido pelo presente estudo mostrou uma composição similar ao extrato metanólico produzido por Sruthi e colaboradores (2019), sendo quantitativamente destacada a presença majoritária de flavonóides (Tabela 1).

Flavonoides são talvez os metabólitos secundários mais presentes em plantas (Donadio *et al.*, 2021), apresentando diversas propriedades descritas na literatura, possuindo ação antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica e, principalmente, antibacteriana (Da Veiga Correia *et al.*, 2022). Possuem função defensiva e regulatória descritas nas espécies vegetais, atuando contra microrganismos patogênicos como bactérias e fungos (Akroum *et al.*, 2010), sendo diferentes moléculas de flavonóides possuidoras de potencial promissor contra cepas de *Staphylococcus aureus* em infecções de feridas (Sychrová *et al.*, 2022).

Esse potencial se relaciona com a presença de mecanismos de ação variados que podem ser causadores de atividade antibacteriana, atuando assim na diminuição da patogenicidade de bactérias ao (I) reduzir estresse oxidativo; (II) modular resposta celular; (III) regular expressão gênica ou (IV) interagir com a membrana celular bacteriana (Veiko *et al.*, 2023; Shen *et al.*, 2022). Por atuarem no mecanismo de defesa da espécie vegetal que o produz, supõe-se que eles sejam passíveis de aplicação na prevenção e tratamento de diversas patologias humanas, incluindo as infecciosas causadas por isolados de *S. aureus* resistentes. Veiko *et al.* (2023) afirma ainda que os flavonoides não atuam somente sobre a célula

bacteriana, mas também atuam diminuindo sua patogenicidade ao inibir fatores de virulência - como a secreção de toxinas e a diminuição da hemólise-; ao reduzir a formação de biofilme e ao agir sinergicamente com antibióticos, aumentando sua atividade.

Os compostos cinâmicos também são metabólitos com amplo espectro de bioatividade. Apesar de serem conhecidos por sua atividade antioxidante, são grandes detentores de atividade antimicrobiana, demonstrando propriedades contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (Sova, 2012).

Foi descrita atividade sinérgica positiva entre alguns compostos flavonoides e os antibióticos Eritromicina, Oxacilina, Gentamicina e Ciprofloxacino por Veiko *et al.* (2023). Essa relação pode ser bem observada quando analisamos os resultados da tabela 2 e 3 em conjunto. Quatro (UFPEDA 671, 691, 731 e 802), dos sete isolados testados, mostraram resistência aos antibióticos testados, necessitando de concentrações mais elevadas para inibição e morte bacteriana. No entanto, após testagem em conjunto com o extrato, observou-se que a atividade antimicrobiana das drogas examinadas foi melhorada pela adição de extrato de folhas de *P. guineense*. A terapia por combinação aplica o uso de agentes antimicrobianos de maneira sinérgica, que, atuam em conjunto por mecanismos diferentes, mas complementares, gerando efeitos mais seletivos que garantem uma taxa de sucesso terapêutico maior do que a observada com o uso de monoterapia (Basavegowda e Baek, 2022). Sendo assim, a aplicabilidade da união entre fitomoléculas ou de preparações a base de plantas medicinais com drogas sintéticas conforma uma das alternativas da atualidade no combate a patógenos MDR.

Donadio *et al.* (2021) discorreu em seu trabalho a atividade de alguns flavonóides na diminuição da expressão de Estafiloxantina, fator de virulência importante em cepas de *S. aureus*. Recentemente, Stojkovic *et al.* (2022) testou a aplicabilidade de um extrato metanólico sobre a supressão de STX em isolados de *S. aureus*, obtendo resultados que indicam que a diminuição na produção desse fator está relacionada à presença de fitomoléculas bioativas. A restrição na biossíntese de STX foi atestada, ainda em 2005, como possível indicadora de queda na virulência e conseqüente patogenicidade de espécies estafilocócicas resistentes por Liu e colaboradores.

As saponinas são descritas por alguns estudos como as fitomoléculas mais importantes para aplicação medicinal, graças à grande capacidade terapêutica associada ao seu uso, principalmente no que se refere à sua atividade antioxidante e antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (Gitanjali *et al.*, 2023). Compostos dessa classe apresentam efeito bactericida e bacteriostático, já que seu mecanismo de ação envolve união com a porção

lipídica das membranas bacterianas, alterando sua permeabilidade e gerando lise e inibição do seu crescimento, ao impedir influxo de nutrientes necessários ao seu metabolismo (Calla Villegas, 2022). A presença de saponinas, então, pode ser um dos motivos do efeito bacteriostático visto pela aplicação do extrato de *P. guineense* expresso no ensaio de Curva de Crescimento (Figura 6).

É importante ressaltar que, mesmo com a presença de atividade antibacteriana, os metabólitos derivados de espécies vegetais possuem uma eficiência muito menor que os antibióticos sintéticos, cuja CIM é calculada em valores baixíssimos. Contudo, como o desenvolvimento de resistência vem se tornando um obstáculo frequente, o uso dessas drogas está sendo feito em doses cada vez maiores, e a CIM vem aumentando consideravelmente (Gorlenko *et al.*, 2020). Assim, valores promissores de CIM e CBM, como os mostrados nesse estudo (Tabela 2), indicam a possibilidade do uso desse extrato contra infecções bacterianas no futuro.

Nota-se, portanto, que o extrato hidroalcoólico de folhas de *P. guineense* promove seus efeitos através de uma sinergia conjunta dos metabólitos entre si e dos metabólitos com os antibióticos testados, CIP e GEN, de forma total ou parcial, com cada um agindo em diferentes sítios celulares bacterianos, contribuindo para atividade terapêutica visualizada através do uso desse extrato. Essas interações são interessantes não só pela atuação bem-sucedida no tratamento de isolados resistentes, mas porque garantem que o desenvolvimento de resistência a essas combinações -caso ela venha a acontecer- ocorra de maneira mais lenta, ao contrário do que acontece com o uso dessas drogas de maneira isolada (Gorlenko *et al.*, 2020), garantindo uma maior chance no controle de cepas MDR.

7 CONCLUSÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma prática que merece apoio contínuo, especialmente em áreas remotas, cujo acesso aos serviços de saúde convencionais é limitado. Essa pesquisa demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *Psidium guineense* pode ser uma alternativa eficaz no combate à *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas resistentes a antibióticos importantes, como CIP e GEN, possuindo capacidade de amplificar suas ações, exibindo sinergismo completo ou parcial. Além disso, o extrato demonstrou a capacidade de reduzir a síntese de estafiloxantina e a capacidade hemolítica da bactéria, tornando-a mais vulnerável e menos resistente.

Portanto, com base nessas descobertas, é possível afirmar o potencial terapêutico das folhas de Araçá como uma opção de tratamento alternativa, acessível e de baixo custo, que pode complementar a abordagem tradicional no combate a infecções por *S. aureus* resistentes a antibióticos. Isso destaca a importância de continuar explorando e desenvolvendo terapias baseadas em plantas medicinais para enfrentar desafios de saúde global, especialmente em comunidades com acesso limitado aos cuidados médicos convencionais.

REFERÊNCIAS

- ABRAO, Fernando Yano et al. **Anatomical study of the leaves and evaluation of the chemical composition of the volatile oils from *Psidium guineense* Swartz leaves and fruits.** Research, Society and Development, v. 10, n. 6, p. e49110615929-e49110615929, 2021.
- ABUBAKAR, Abdullahi R.; HAQUE, Mainul. **Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes.** Journal of pharmacy & bioallied sciences, v. 12, n. 1, p. 1, 2020.
- ADAM, F. et al. Aromatic plants of French Polynesia. V. **Chemical composition of essential oils of leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine.** Journal of Essential Oil Research, v. 23, n. 1, p. 98-101, 2011.
- AFZAL, Madeeha et al. **The Relationship between Ciprofloxacin Resistance and Genotypic Changes in *S. aureus* Ocular Isolates.** Pathogens, v. 11, n. 11, p. 1354, 2022.
- AGRA, Maria de Fátima; FREITAS, Patrícia França de; BARBOSA-FILHO, José Maria. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AKINOLA, O. B. et al. **Spermatoprotective activity of the leaf extract of *Psidium guajava* Linn.** Niger Postgrad Med J, v. 14, n. 4, p. 273-276, 2007.
- AKROUM, Souâd et al. **Antibacterial, antioxidant and acute toxicity tests on flavonoids extracted from some medicinal plants.** International Journal of Green Pharmacy (IJGP), v. 4, n. 3, 2010.
- ALMAAYTAH, Ammar et al. **Antimicrobial and antibiofilm activity of mauriporin, a multifunctional scorpion venom peptide.** International journal of peptide research and therapeutics, v. 20, p. 397-408, 2014.
- ALMEIDA, Juliana Araújo Rangel de. **Avaliação do perfil de susceptibilidade aos microbianos de *Staphylococcus aureus* provenientes de cultura de secreções, identificados no Hospital Universitário Antonio Pedro durante um período de três anos.** Monografia (Especialização em Análises Clínicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, 2022.
- ANAS, K. et al. **In vitro antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn. leaf extract on clinical isolates of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*.** Indian Journal of Experimental Biology, v. 46, p. 41-46, 2008.
- ANESINI, Claudia; PEREZ, Cristina. **Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity.** Journal of ethnopharmacology, v. 39, n. 2, p. 119-128, 1993.
- ANGULO-LÓPEZ, Jorge E. et al. **Guava (*Psidium guajava* L.) fruit and valorization of industrialization by-products.** Processes, v. 9, n. 6, p. 1075, 2021.

- ARAÚJO, Érika Roberta Silva de. **Avaliação da biocompatibilidade e determinação da atividade antimicrobiana de Psidium guineense Swartz.** 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- BARBOSA, Danila Araújo; LUCENA, Reinaldo FP; CRUZ, Denise Dias. **Traditional knowledge as basis for phytochemical prospecting of Sideroxylon obtusifolium (Roem. & Schult.) TD Penn. aiming at conservation in the Brazilian semi-arid zone.** *Ethnobotany Research and Applications*, v. 18, p. 1-10, 2019.
- BASAVEGOWDA, Nagaraj; BAEK, Kwang-Hyun. **Combination strategies of different antimicrobials: An efficient and alternative tool for Pathogen inactivation.** *Biomedicines*, v. 10, n. 9, p. 2219, 2022.
- BEZERRA FILHO, Clovis Macêdo et al. **Antimicrobial and Antivirulence Action of Eugenia brejoensis Essential Oil in vitro and in vivo Invertebrate Models.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 424, 2020.
- BEZERRA, Camila Fonseca et al. **Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (Psidium guajava L.).** *Food and chemical toxicology*, v. 119, p. 122-132, 2018.
- BEZERRA, João Emmanoel Fernandes et al. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial - plantas para o futuro: Região Nordeste.** Brasília, DF: MMA, p. 270-278, 2018.
- BÔTELHO, Evillyn Xavier et al. **Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos de Staphylococcus aureus em hospitais do Brasil: uma revisão integrativa da literatura.** *Research, Society and Development*, v. 11, n. 6, p. e2711628744-e2711628744, 2022.
- BRANDÃO, Maria GL et al. **Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira.** 6 ed., Brasília: ANVISA, 2019.
- BRASIL. **Resolução RE nº26 de 13/5/2014.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.
- BRASIL. **Resolução RE nº899 de 29/5/2003.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003.
- BRITO, Ana Flávia; PONTES, Altem. **Metabólitos secundários de plantas medicinais usadas em garrafadas populares comercializadas em feiras livres de Belém, Pará, Brasil.** *ENCICLOPEDIA BIOSFERA*, v. 18, n. 36, 2021.
- CALLA VILLEGAS, Mercedes Elizabeth. **Efecto in-vitro de las saponinas de Sapindus saponaria L.(choloque) sobre el crecimiento de Candida spp., Staphylococcus aureus y Escherichia coli.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso.
- CAVALCANTI, Silvana Maria de Moraes et al. **Estudo comparativo da prevalência de Staphylococcus aureus importado para as unidades de terapia intensiva de hospital**

universitário, Pernambuco, Brasil. Revista brasileira de epidemiologia, v. 9, p. 436-446, 2006.

CHANDRA, Harish et al. **Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review.** Plants, v. 6, n. 2, p. 16, 2017.

CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. **Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus.** Virulence, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

COE, Heloisa Helena Gomes; SOUSA, L. O. F. **The Brazilian" Caatinga": ecology and vegetal biodiversity of a semiarid region.** Dry forests: Ecology, species diversity and sustainable management, v. 1, p. 81-103, 2014.

COSTA, Wendeo Kennedy et al. **Essential oil from Eugenia stipitata McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice.** Industrial Crops and Products, v. 144, p. 112059, 2020.

DA SILVA TRENTIN, Danielle et al. **Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against Staphylococcus epidermidis planktonic and biofilm lifestyles.** Journal of Ethnopharmacology, v. 137, n. 1, p. 327-335, 2011.

DA VEIGA CORREIA, Vinícius Tadeu et al. **An integrative review on the main Flavonoids found in some species of the Myrtaceae family: Phytochemical characterization, health benefits and development of products.** Plants, v. 11, n. 20, p. 2796, 2022.

DAVID, Bruno; WOLFENDER, Jean-Luc; DIAS, Daniel A. **The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends.** Phytochemistry Reviews, v. 14, p. 299-315, 2015.

DE ARAUJO, Laura Costa Alves et al. **Profile of Antioxidant Activity of Fruits of the Savana Brazilian.** Free Radical Biology and Medicine, v. 100, p. S95, 2016.

DE MELO, Andressa Leite Ferraz et al. **From the environment to the hospital: How plants can help to fight bacteria biofilm.** Microbiological Research, v. 261, p. 127074, 2022.

DE SOUSA, Daniele Martins et al. **INFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA: REVISÃO INTEGRATIVA.** Journal of Nursing UFPE/Revista de Enfermagem UFPE, v. 10, n. 4, 2016.

DINGES, Martin M.; ORWIN, Paul M.; SCHLIEVERT, Patrick M. **Exotoxins of Staphylococcus aureus.** Clinical microbiology reviews, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DO NASCIMENTO MAGALHÃES, Karla et al. **Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos.** Journal of ethnopharmacology, v. 237, p. 314-353, 2019.

DOMINGUES, Lohrairie Talia et al. **Mecanismos De Resistência Aos Antibióticos Betalactâmicos Pelos Staphylococcus Aureus.** Revista Multidisciplinar em Saúde, v. 2, n. 3, p. 44-44, 2021.

DOS SANTOS, Márcia Adriana Carvalho et al. **Diversidade genética entre acessos de araçá de diferentes municípios do Semiárido baiano**. Revista Caatinga, v. 27, n. 2, p. 48-57, 2014.

DURÃES, Emanuelle RB; DE PAULA, Joelma AM; NAVES, Plínio LF. **Gênero Psidium: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico**. Revista Processos Químicos, v. 9, n. 17, p. 33-40, 2015.

ELMESSERI, Rana A. et al. **Staphyloxanthin as a potential novel target for deciphering promising anti-Staphylococcus aureus agents**. Antibiotics, v. 11, n. 3, p. 298, 2022.

FAKRON, Abdmanam. **Risk factors for ciprofloxacin and gentamycin resistance among gram positive and gram negative bacteria isolated from community-acquired urinary tract infections in Benghazi City**. Scientific Journal for Faculty of Science-Sirte University, v. 2, n. 1, p. 76-87, 2022.

FERNANDES, Moabe F.; CARDOSO, Domingos; DE QUEIROZ, Luciano P. **An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism**. Journal of Arid environments, v. 174, p. 104079, 2020.

FERNANDES, Tiago Gomes et al. **In vitro synergistic effect of Psidium guineense (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains**. The Scientific World Journal, v. 2012, 2012.

FERNANDES, Tiago Gomes. **Efeito sinérgico do estado aquoso das folhas de Psidium guineense Swartz em associação com agentes antimicrobianos frente a cepas de Staphylococcus aureus multidroga resistentes**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FIGUEIREDO, Pablo Luis B. et al. **Chemical variability in the essential oil of leaves of Araçá (Psidium guineense Sw.), with occurrence in the Amazon**. Chemistry Central Journal, v. 12, p. 1-11, 2018.

FOGUENA, Alain Kenfak; COMETTA, Alain; SENN, Laurence. **Prevention of health care associated infections and bacterial resistance: guidance for good practice**. Revue Medicale Suisse, v. 12, n. 540, p. 2026-2032, 2016.

FRANCISCO, Kátia Aparecida; MENDONÇA, Alexandre Tourino. **Avaliação da atividade antibacteriana do araçá (P. guineense) sobre o desenvolvimento de Enterococcus Faecalis**. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 13, n. 1, p. 746-751, 2015.

FRANZON, R. C., CAMPOS, L. Z. O., PROENÇA, C. E. B., SOUSA-SILVA, J. C. **Araçás do gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Embrapa Cerrados, Brasília 1-48, 2009.

GITANJALI, Jayaraman et al. **Antimicrobial, antioxidant, anticancer, and antithrombotic, competency of saponins from the root of Decalepis hamiltonii**. Environmental Research, v. 231, p. 116096, 2023.

GORLENKO, Cyrill L. et al. **Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics?**. Antibiotics, v. 9, n. 4, p. 170, 2020.

- GUO, Yunlei et al. **Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus***. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, p. 107, 2020.
- HOWDEN, Benjamin P. et al. ***Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation**. *Nature Reviews Microbiology*, p. 1-16, 2023.
- HUSSEIN, Rehab A.; EL-ANSSARY, Amira A. **Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants**. *Herbal medicine*, v. 1, n. 3, 2019.
- JIANG, Lirong et al. **Antitumor effect of guava leaves on lung cancer: A network pharmacology study**. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 11, p. 7773-7797, 2020.
- KONEMAN, E.W. **Diagnóstico microbiológico**. 7.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2018.
- LAHLOU, J. et al. **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Moroccan species of *Psidium guajava* extracts**. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, v. 73, n. 1, 2022.
- LAIRD, Katie; PHILLIPS, C. **Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?**. *Letters in Applied Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 169-174, 2012.
- LIU, George Y. et al. ***Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity**. *The Journal of experimental medicine*, v. 202, n. 2, p. 209-215, 2005.
- LUO, You et al. **Antioxidant and anti-diabetic activities of polysaccharides from guava leaves**. *Molecules*, v. 24, n. 7, p. 1343, 2019.
- MABRY, Tom J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols**. *The Systematic Identification of Flavonoids*, p. 41-164, 1970.
- MARTINS, C. C.; ALVES, L. F. A.; MAMPRIM, A. P. **Effect of plant extracts and a disinfectant on biological parameters and pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.(Ascomycota: Cordycipitaceae)**. *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, p. 420-427, 2016.
- MEDEIROS, Nicholas Luiz de Oliveira Cavalcanti. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart. Ex Hayne) em associação com antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso.
- MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata et al. **Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus***. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022.
- MUEENA, Jahan et al. **Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk in Bangladesh**. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, v. 2, n. 1, p. 49-55, 2015.

NABOULSI, Imane et al. **Plants extracts and secondary metabolites, their extraction methods and use in agriculture for controlling crop stresses and improving productivity: A review.** Acad. J. Med. Plants, v. 6, n. 8, p. 223-240, 2018.

NEIRA GONZÁLEZ, Adriana María; RAMÍREZ GONZÁLEZ, Martha Beatriz; SÁNCHEZ PINTO, Nidia Lizbeth. **Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de Psidium guineense Sw (choba) frente a Streptococcus mutans, agente causal de caries dentales.** Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 10, n. 3-4, p. 0-0, 2005.

OKTAVIA, Sri et al. **Potential anti-inflammatory effects of Psidium guajava L.: A review.** Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, v. 9, n. 2, p. 47-52, 2021.

OSTROSKY, Elissa A. et al. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista brasileira de Farmacognosia, v. 18, p. 301-307, 2008.

PANIAGUA-ZAMBRANA, Narel Y.; BUSSMANN, Rainer W.; ROMERO, Carolina. **Psidium guajava L., Psidium guineense Sw. Ethnobotany of Mountain Regions–Ethnobotany of the Andes.** Springer International Publishing, Cham. doi, v. 10, p. 978-3, 2020.

PAPADOPOULOU, Virginie et al. **Overcoming biological barriers to improve treatment of a Staphylococcus aureus wound infection.** Cell Chemical Biology, v. 30, n. 5, p. 513-526. e5, 2023.

PATEL, Pooja et al. **Anti-infective efficacy of Psidium guajava L. leaves against certain pathogenic bacteria.** F1000Research, v. 8, 2019.

PAULINO DE ALBUQUERQUE, Ulysses; DE HOLANDA CAVALCANTI ANDRADE, Laise. **Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil).** Interciencia, v. 27, n. 7, p. 336-346, 2002.

PL@NTNET. **Psidium guineense SW: Araçá-do-Campo.** Disponível em: <identify.plantnet.org/pt-br/k-world-flora/species/Psidium% 20guineense% 20Sw./data>. Acesso em: 28 ago. 2023

RAOOFI, Samira et al. **Global prevalence of nosocomial infection: A systematic review and meta-analysis.** PloS one, v. 18, n. 1, p. e0274248, 2023.

REYGAERT, Wanda C. **An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria.** AIMS microbiology, v. 4, n. 3, p. 482, 2018.

RIBEIRO, Charles Lima; PAULA, Joelma Abadia Marciano de; PEIXOTO, Josana de Castro. **Pharmacological properties of species of the genres: Myrcia, Eugenia and Psidium–Myrtaceae-, typical of the Cerrado: A scope review.** Research, Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 8, p. e44711830356, 2022.

RIVERO-MALDONADO, G. et al. **Flavonoides presentes en especies de Psidium (Myrtaceae) de Venezuela.** Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ), v. 30, n. 2, p. 217-241, 2013.

RODRIGUES-SILVA, Paolo Lucas et al. **Tendências quanto ao conhecimento e às aplicações biotecnológicas do *Psidium guineense* evidenciadas pelo monitoramento tecnológico.** *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, v. 38, n. 1, p. 26704, 2021.

RODRIGUES, V. E. G., CARVALHO, D. A., 2001. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados.** Ed. UFLA 1–180.

SANTOS, André Luis dos et al. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, p. 413-423, 2007.

SHELKE, Yogendra P. et al. **An Overview of Preventive Strategies and the Role of Various Organizations in Combating Antimicrobial Resistance.** *Cureus*, v. 15, n. 9, 2023.

SHEN, Nan et al. **Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity.** *Food chemistry*, v. 383, p. 132531, 2022.

SINGH, Garima et al. **Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the management of cancer and diabetes.** *Journal of Traditional Chinese Medicine*, v. 40, n. 6, p. 1007, 2020.

SOVA, Matej. **Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives.** *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.

SRUTHI, C. P. et al. **Phytochemical screening of leaf extracts of *Psidium guajava* and *Psidium guineense* (Myrtaceae).** *International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR)*, v. 6, n. 1, p. 37-42, 2019.

STOJKOVIĆ, Dejan et al. **Chemical profiling, antimicrobial, anti-enzymatic, and cytotoxic properties of *Phlomis fruticosa* L.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 195, p. 113884, 2021.

SYCHROVÁ, Alice et al. **Prenylated flavonoids in topical infections and wound healing.** *Molecules*, v. 27, n. 14, p. 4491, 2022.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. ***Staphylococcus aureus* infection.** [Updated 2022 Jul 18]. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

VANDENESCH, François; LINA, Gérard; HENRY, Thomas. ***Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, p. 12, 2012.

VEIKO, Artem G. et al. **Antimicrobial activity of quercetin, naringenin and catechin: Flavonoids inhibit *Staphylococcus aureus*-induced hemolysis and modify membranes of bacteria and erythrocytes.** *Molecules*, v. 28, n. 3, p. 1252, 2023.

VERDON, Julien et al. **δ -hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide.** *Peptides*, v. 30, n. 4, p. 817-823, 2009.

VESTERGAARD, Martin; FREES, Dorte; INGMER, Hanne. **Antibiotic resistance and the MRSA problem.** *Microbiology spectrum*, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018, 2019.

- VIEIRA, Thiago Isidro et al. **Atividade antibacteriana e antiaderente in vitro dos extratos das folhas de Psidium guineense Sw. e Syzygium cumini (L.) Skeels sobre microrganismos orais.** RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online), v. 60, n. 3, p. 359-365, 2012.
- YEHIA, Fatma Al-Zahraa A.; YOUSEF, Nehal; ASKOURA, Momen. **Exploring Staphylococcus aureus Virulence Factors; Special Emphasis on Staphyloxanthin.** Microbiology and Biotechnology Letters, v. 49, n. 4, p. 467-477, 2021.
- ZANDONÁ, Giovana Paula et al. **Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (Psidium cattleianum) leaf: Putative antioxidant and antimicrobial properties.** Food Research International, v. 137, p. 109573, 2020.
- ZHANG, Haifang et al. **Identification and characterization of Staphylococcus aureus strains with an incomplete hemolytic phenotype.** Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 6, p. 146, 2016.
- ZHANG, Jing et al. **Genetic and virulent difference between pigmented and non-pigmented Staphylococcus aureus.** Frontiers in microbiology, v. 9, p. 598, 2018.