

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

EDUARDO BATISTA DE SOUZA ROCHA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE *Combretum* spp. COM ATIVIDADE ANTI-  
*Staphylococcus aureus***

JOÃO PESSOA  
2023

EDUARDO BATISTA DE SOUZA ROCHA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE *Combretum* spp. COM ATIVIDADE ANTI-  
*Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Camila Orbem Menegatti

JOÃO PESSOA  
2023

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

R672p Rocha, Eduardo Batista de Souza.  
    Prospecção fitoquímica de Combretum spp. com  
    atividade anti-Staphylococcus aureus / Eduardo Batista  
    de Souza Rocha. - João Pessoa, 2023.  
    45 f. : il.

    Orientação: Angela Camila Orbem Menegatti.  
    TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

    1. Biomedicina. 2. Farmacorresistência bacteriana.  
    3. Compostos fitoquímicos. 4. Combretaceae. 5.  
    Sinergismo farmacológico. I. Menegatti, Angela Camila  
    Orbem. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 577.3:61(043.2)

EDUARDO BATISTA DE SOUZA ROCHA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE *Combretum* spp. COM ATIVIDADE ANTI-  
*Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Camila Orbem Menegatti

Aprovado em: 26 de maio de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

*Angela Menegatti*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Camila Orbem Menegatti (Orientadora)  
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*Siqueira*

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior  
Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*Wallace Felipe Blohem Pessoa*

Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa  
Departamento de Fisiologia e Patologia – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

À minha mãe Luciana Batista pelo amor incondicional e por estar presente em todos os momentos até hoje.

Ao meu pai Nonato e aos meus irmãos, em especial à minha irmã Luana, por todo o carinho, incentivo, apoio, suporte e por sempre acreditar em mim. Aos meus tios e à minha avó Maria.

À minha amiga de todos os momentos, Mônica Almeida, por dividir comigo as vivências no laboratório e além dele, e por sempre me dar apoio. Às minhas amigas de curso Isis Queiroz, Ingrid Braz, Raquel Nunes e Joyce Lopes pela amizade, conversas, momentos, risadas, pelo incentivo e por terem me acompanhado ao longo da graduação.

Aos meus amigos Felipe, Roger, Edla e Josiane que, mesmo longe, tornaram meus dias menos pesados e mais divertidos.

À professora Dr.<sup>a</sup> Angela Menegatti pelo acolhimento e por toda orientação, apoio, ensinamentos, paciência, sensibilidade, conselhos e por disponibilizar os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho, o professor Dr. Éverton Ferreira e a Dr.<sup>a</sup> Ruth Farias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF); a professora Dr.<sup>a</sup> Mariana Helena da Universidade Federal do Piauí (UFPI); o professor Dr. José Pinto de Siqueira Junior – Departamento de Biologia Molecular (DBM) - Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Aos servidores do DBM Antônio Bosco, Dione e Dona Geralda pela colaboração e cordialidade.

Aos membros titulares e suplentes da banca avaliadora, pela cordialidade e disponibilidade.

Ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) e à UFPB.

Ao CNPq pelo financiamento de bolsas de iniciação científica.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

## RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno oportunista, podendo causar desde infecções cutâneas até infecções disseminadas. O aumento na resistência antimicrobiana (AMR) tem levado ao surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a uma ou múltiplas classes de antibacterianos. Nesse sentido, cresce a busca por novas moléculas com atividade antibacteriana. O gênero *Combretum* compreende plantas de distribuição tropical, cujo uso é relatado na medicina popular devido a propriedades anti-inflamatória, antiparasitária e antimicrobiana. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo avaliar se extratos de três espécies nativas de *Combretum* possuem atividade antibacteriana frente ao *S. aureus*. Foram utilizadas seis linhagens de *S. aureus*, das quais três expressam bombas de efluxo. Foram utilizados extratos etanólicos e aquosos das folhas de *Combretum duarteanum*, *Combretum mellifluum* e *Combretum leprosum*. Inicialmente, caracterizou-se o perfil de resistência das cepas através de antibiograma e detecção de genes de resistência a aminoglicosídeos pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Então, realizou-se uma triagem dos extratos na concentração inicial de 0,5 mg/mL, seguida da determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Bactericida Mínima (MBC). Também foram realizados testes de modulação antibiótico-extrato combinando norfloxacino ou estreptomicina com o extrato etanólico de *C. duarteanum* (CDEN). Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes e analisados por espectrofotometria e pelo revelador resazurina. As cepas apresentaram maior resistência à amicacina, gentamicina e penicilina G. Os extratos e frações de *C. duarteanum* e os extratos de *C. mellifluum* apresentaram atividade antibacteriana na triagem a 0,5 mg/mL. Os valores de MIC desses extratos foram de 0,062 a 0,5 mg/mL; a fração acetato de etila de *C. duarteanum* (CDEN-AcOEt) apresentou atividade bactericida frente ao maior número de cepas. O extrato CDEN apresentou fator de modulação (FM) junto ao norfloxacino (2 a 4) e à estreptomicina (8 a 32), e a fração CDEN-AcOEt possuiu ação sinérgica com a estreptomicina (FICI = 0,039) frente ao *S. aureus* ATCC 912415. Deste modo, conclui-se que as espécies *C. duarteanum* e *C. mellifluum* são fontes promissoras de novas moléculas anti-*S. aureus*.

**Palavras-chave:** farmacoresistência bacteriana; compostos fitoquímicos; Combretaceae; sinergismo farmacológico.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen, which can cause skin to disseminated infections. The increase in antimicrobial resistance (AMR) is linked to the emergence of *S. aureus* strains resistant to one or multiple antibacterial classes. Searching for new compounds with antibacterial activity is growing. *Combretum* genus comprises tropical plants, whose use is reported in folk medicine due to anti-inflammatory, antiparasitic and antimicrobial properties. Therefore, this work aimed to evaluate if extracts of three native *Combretum* species are active against *S. aureus*. Six *S. aureus* strains were used, where three express efflux pumps. Ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *Combretum duarteanum*, *Combretum mellifluum* and *Combretum leprosum* were used. Initially, the resistance profile was characterized by antibiograms and detection of aminoglycoside resistance genes by polymerase chain reaction (PCR) method. An initial screening of the extracts was performed at 0.5 mg/mL, followed by bioassays for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) determination. Antibiotic-extract modulation tests were also performed by combining norfloxacin or streptomycin with *C. duarteanum* ethanolic extract (CDEN). The assays were performed on independent triplicates, analyzed by spectrophotometry and resazurin. Strains showed more resistance to amikacin, gentamicin and penicillin G. *C. duarteanum* and *C. mellifluum* extracts showed antibacterial activity at 0.5 mg/mL in the screening. MIC values ranged from 0.062 to 0.5 mg/mL; ethyl acetate fraction of *C. duarteanum* (CDEN-AcOEt) showed bactericidal activity against most strains. CDEN extract showed modulation factor (MF) when combined with norfloxacin (2 to 4) and streptomycin (8 to 32), and CDEN-AcOEt fraction had a synergistic action with streptomycin (FICI = 0.039) against *S. aureus* ATCC 912415. Thus, it is concluded that *C. duarteanum* and *C. mellifluum* species are promising sources of new anti-*S. aureus* phytochemicals.

**Keywords:** antibacterial drug resistance; phytochemicals; Combretaceae; drug synergism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Planta da espécie <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	17
<b>Figura 2</b> – Determinação do MIC das frações CDEN-AcOEt e CDEN-Aq pelo método colorimétrico da resazurina.....	28
<b>Figura 3</b> – Atividade bactericida da fração CDEN-AcOEt frente às cepas SA 6 e SA 1199B NOR.....	31

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> – Cepas padrão de <i>S. aureus</i> utilizadas nos experimentos.....	19
<b>Quadro 2</b> – Caracterização química e botânica dos extratos de <i>Combretum</i> spp.....	20
<b>Quadro 3</b> – Presença dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) nas linhagens de <i>S. aureus</i> .....	26
<b>Quadro 4</b> – Constituição fitoquímica de <i>C. duarteanum</i> segundo Cruz (2021).....	34
<b>Tabela 1</b> – Fenótipo de resistência para cepas de <i>S. aureus</i> de acordo com os <i>breakpoints</i> do BrCAST e CLSI* para o método de disco-difusão.....	25
<b>Tabela 2</b> – Valores de MIC (mg/mL) dos extratos e frações de <i>Combretum</i> spp. frente a linhagens de <i>S. aureus</i> .....	30
<b>Tabela 3</b> – Valores de MBC (mg/mL) e <i>ratio</i> MBC/MIC dos extratos de <i>C. duarteanum</i> e <i>C. mellifluum</i> .....	30
<b>Tabela 4</b> – Classificação da interação entre a estreptomicina e a fração CDEN-AcOEt pelo método de <i>Checkerboard</i> frente ao <i>S. aureus</i> ATCC 912415.....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.1.1 <i>Patogênese e fatores de virulência</i> .....	12
2.1.2 <i>Resistência aos antimicrobianos</i> .....	12
2.2 Compostos fitoquímicos .....	15
2.3 Plantas do gênero <i>Combretum</i> .....	16
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 Objetivo geral .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 Tipo de estudo e local da pesquisa .....	18
4.2 Linhagens bacterianas .....	18
4.3 Armazenamento e padronização do inóculo .....	19
4.4 Caracterização dos extratos.....	20
4.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	21
4.6 Determinação de genes de resistência a aminoglicosídeos .....	21
4.7 Triagem da atividade dos extratos .....	23
4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) .....	23
4.9 Ensaios de modulação antibiótico-extrato.....	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
5.1 Perfil de resistência das linhagens de <i>S. aureus</i> .....	25
5.2 Triagem da atividade dos extratos .....	27
5.3 MIC e MBC dos extratos .....	29
5.4 Modulação antibiótico-extrato .....	35
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* (família *Staphylococcaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli*, filo *Firmicutes*) compreende bactérias gram-positivas, com morfologia de cocos agrupados em cachos. Semelhante a outros gram-positivos, estafilococos fazem parte da microbiota de seres humanos, como os estafilococos coagulase-negativos (ECN) e o *S. aureus*.

A espécie *Staphylococcus aureus* é a mais importante dentro do gênero. É encontrada na microbiota transitória ou permanente de uma parcela da população, colonizando pele e mucosas, sobretudo a mucosa nasal. Embora possa estar em portadores assintomáticos, o *S. aureus* é um patógeno oportunista, sobretudo em indivíduos imunodeprimidos ou hospitalizados.

Doenças causadas por *S. aureus* podem ser adquiridas no âmbito comunitário ou hospitalar. Estão inclusas as infecções cutâneas, como impetigo, foliculite, furúnculo e carbúnculo, e infecções disseminadas, como pneumonia, osteomielite, endocardite e bacteremia. Além das infecções, a espécie causa quadros de intoxicação. A expressão de fatores de virulência facilita a disseminação e a evasão da resposta imune, aumentando a gravidade dessas doenças.

Outro fator que agrava as infecções por *S. aureus* é o aumento da resistência aos antimicrobianos (AMR). Linhagens suscetíveis tornam-se resistentes pela aquisição de elementos genéticos. É reportado a existência de *S. aureus* resistentes a penicilinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina, reforçando a queda na eficácia das opções terapêuticas disponíveis hoje.

A busca por novos agentes antibacterianos tem se tornado uma prioridade. Visto que historicamente as plantas são utilizadas para fins medicinais, elas são alvo de muitas pesquisas para a descoberta de moléculas bioativas. Estima-se que 25% dos fármacos comercializados atualmente são derivados de compostos fitoquímicos, demonstrando a relevância de estudos voltados à etnofarmacologia.

O gênero *Combretum* compreende espécies de arbustos e árvores, algumas nativas do Cerrado e Caatinga brasileiros. É relatado o uso popular destas plantas no tratamento de inflamações, infecções, malária e distúrbios gastrointestinais, no entanto, são escassos estudos acerca da atividade antibacteriana. Nesse sentido, tornam-se necessários estudos que avaliem o potencial de prospecção de plantas do gênero *Combretum* com atividade anti-*S. aureus*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

A família *Staphylococcaceae* pertence ao filo *Firmicutes*, que representa quase 50% das espécies bacterianas conhecidas junto aos filios *Tenericutes* e *Actinobacteria* (MADIGAN *et al.*, 2016). Cinco gêneros compõem a família (*Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Salinicoccus* e *Staphylococcus*), sendo o gênero *Staphylococcus* o principal representante do grupo (GHERARDI; DI BONAVENTURA; SAVINI, 2018).

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* se apresentam com morfologia de cocos gram-positivos, com células agrupadas em cachos ou *clusters*. São imóveis, anaeróbios facultativos, não esporulados e halotolerantes. É relatado que bactérias do gênero são capazes de sobreviver em certas condições adversas ao desenvolvimento microbiano (TOLTZIS, 2018).

O gênero *Staphylococcus* compreende mais de 40 espécies conhecidas, algumas filogeneticamente divididas em sub-espécies (LIU, D., 2015). Assim como outros gram-positivos, estafilococos fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas em seres humanos. Os principais representantes são os estafilococos coagulase negativos (ECN) – *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* – e o *Staphylococcus aureus*, espécie de maior importância dentro do gênero (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Estafilococos coagulase positivos (ECP) ou *S. aureus* são microrganismos presentes na microbiota de superfícies epiteliais em animais e seres humanos. A espécie é encontrada na pele e em mucosas, sobretudo nas fossas nasais. Além disso, faz parte da microbiota transitória de 60% da população, e coloniza permanentemente de 20 a 40% dos indivíduos adultos. Alguns grupos são mais colonizados, incluindo imunodeprimidos, pacientes hospitalizados e profissionais da saúde (BRASIL, 2008).

Semelhante aos ECNs, o *S. aureus* é considerado um patógeno oportunista. Genomicamente, o *S. aureus* possui cerca de 300 mil pares de bases (pb) a mais do que o *S. epidermidis*, carregando elementos genéticos adicionais que codificam fatores de virulência e a evasão da resposta imune do hospedeiro. A espécie é o

agente etiológico de infecções e outras doenças importantes, transmitidas no âmbito comunitário e hospitalar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

### 2.1.1 Patogênese e fatores de virulência

No fim do século XIX, o pesquisador Alexander Ogston analisou amostras de pus de infecções de feridas e quadros sépticos, de onde isolou o *S. aureus* pela primeira vez. A partir de Ogston, o *S. aureus* foi consolidado como agente etiológico de infecções cutâneas ou piogênicas como foliculite, impetigo, furúnculos e carbúnculos. Também é o agente de infecções associadas a feridas crônicas, próteses e cateteres endovenosos (ALGAMMAL *et al.*, 2020).

Infecções e outras enfermidades causadas por *S. aureus* são agravadas devido à expressão de fatores de virulência. Um exemplo são as toxinas extracelulares, que medeiam a citotoxicidade e a indução do processo inflamatório no hospedeiro. São exemplos as toxinas esfoliativas (ETA, ETB) e enterotoxinas, relacionados à Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (SSSS) e a intoxicações alimentares, respectivamente (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Além das toxinas, ECPs expressam diversos outros fatores de virulência. Proteínas de superfície, cápsula e produção de biofilme aumentam a adesão a superfícies e sobrevivência do microrganismo. Enzimas como proteases, nucleases e hialuronidases facilitam sua disseminação pelos tecidos, podendo gerar infecções graves e disseminadas como osteomielites, pneumonias, meningites e bacteremias (ALGAMMAL *et al.*, 2020; BRASIL, 2008).

Linhagens de *S. aureus* são responsáveis por causar essas infecções na comunidade, mas também no contexto hospitalar. Isso se deve à sobrevivência e facilidade de disseminação no ambiente nosocomial, podendo causar doenças importantes em imunodeprimidos e pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Além disso, o surgimento de cepas resistentes é um outro fator que tem agravado as infecções por *S. aureus* (DADASHI *et al.*, 2018).

### 2.1.2 Resistência aos antimicrobianos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência aos antimicrobianos (AMR) ocorre quando bactérias ou outros microrganismos sofrem

mudanças biológicas e não respondem à antibioticoterapia convencional. É estimado que ocorram 700 mil mortes anuais devido à AMR, representando um problema global de saúde pública (UKUHOR, 2021).

A aquisição da resistência é um fenômeno que ocorre naturalmente entre os microrganismos. Linhagens suscetíveis tornam-se resistentes por modificações genéticas. Elementos genéticos móveis (EGMs) como plasmídeos, transposons ou genes codificam a resistência a um ou mais antibacterianos. A aquisição da resistência bacteriana se dá principalmente por conjugação, onde os EGMs são transferidos horizontalmente de uma cepa a outra, propagando fenótipos de resistência (HAABER; PENADÉS; INGMER, 2017).

Embora a resistência seja um fenômeno natural, a AMR é intensificada devido ao uso incorreto e abusivo dos antimicrobianos, gerando bactérias resistentes a uma ou múltiplas drogas (MDRB). Bactérias multirresistentes causam quadros infecciosos mais graves, que não respondem ao tratamento e com maiores taxas de morbimortalidade (MAHONEY *et al.*, 2021).

A pandemia da doença do coronavírus (COVID-19) iniciada em 2020 apresenta relação direta com o aumento da resistência. O uso de antimicrobianos, como a azitromicina e a ivermectina, foi disseminado na terapêutica da COVID-19, mesmo sem eficácia comprovada. Um estudo revelou que 90% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 recebeu tratamento com antimicrobianos, enquanto menos de 10% possuíam infecções secundárias diagnosticadas, revelando o uso indiscriminado destes fármacos e favorecendo à resistência bacteriana (OPAS, 2021).

Dentre os agentes de infecções bacterianas, o *S. aureus* é um dos patógenos com mais riscos relacionados à resistência (WHO, 2021). Um estudo feito pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) avaliou a taxa de mortalidade pelas infecções bacterianas mais comuns nos Estados Unidos em 2017; o *S. aureus* foi responsável por mais de 10 mil mortes, superando as mortes por *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae* e *Acinetobacter* (CDC, 2019).

Em meados do século XX, a classe das penicilinas incluía antibióticos de escolha no tratamento de infecções por *S. aureus*. Na década de 1940, foi notificado o surgimento de linhagens resistentes à penicilina. Cepas com esse fenótipo expressam genes de beta-lactamases, enzimas que clivam o anel beta-lactâmico das penicilinas e impedem sua ação (BRASIL, 2007). Atualmente, cerca de 90% das

linhagens de *S. aureus* isoladas de humanos apresentam resistência à penicilina (RAO *et al.*, 2022).

Novas opções terapêuticas foram introduzidas no mercado, tendo como alvo cepas produtoras de penicilinases. Um exemplo é a meticilina, um beta-lactâmico cujo alvo é a proteína de ligação à penicilina (PBP) envolvida na síntese de peptidoglicanos na parede celular. Na década de 1960, foram relatadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que tendem a apresentar resistência a outros beta-lactâmicos incluindo oxacilina, nafcilina e cefalosporinas (TAYLOR; UNAKAL, 2022).

Cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) se tornam resistentes pela aquisição de elementos do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Um exemplo é o gene *mecA*, que modifica o sítio-alvo da meticilina ao codificar uma PBP mutante, a PBP-2a, expressa em cepas MRSA (LIU, W. *et al.*, 2021). Outros mecanismos de resistência em *S. aureus* incluem a interferência em vias metabólicas, expressão de bombas de efluxo e alteração enzimática do fármaco (MAHONEY *et al.*, 2021).

Infecções por MRSA podem ser adquiridas na comunidade (CA-MRSA) ou no ambiente hospitalar (HA-MRSA). É reportado que *S. aureus* com fenótipo MRSA têm se tornado prevalentes no ambiente nosocomial (BRASIL, 2007; DADASHI *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2022; SHARIATI *et al.*, 2020), e aumentam em 64% as chances de óbito quando comparados a cepas MSSA (WHO, 2021).

Um dos fármacos usados no tratamento de infecções por MRSA é a vancomicina. No entanto, novos fenótipos intermediários (VISA) e resistentes à vancomicina (VRSA) têm sido relatados. O operon *vanA* codifica enzimas que alteram a sequência de aminoácidos do sítio de ligação à vancomicina, conferindo resistência ao fármaco nas cepas que expressam o operon (MCGUINESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). Esse fato é evidenciado em um estudo que avaliou cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes hospitalizados com infecção urinária; 23 (22,3%) dos isolados eram VRSA, representando a relevância clínica dessas linhagens (SELIM *et al.*, 2022).

Antibacterianos como a daptomicina e a linezolida são utilizados no tratamento de infecções por MRSA ou VRSA. Em um trabalho onde foi avaliado o perfil de resistência em cepas de MRSA isoladas de um paciente com bacteremia persistente ao longo do tempo; dos isolados (n = 32), 7 (21,9%) foram resistentes à daptomicina, 6 (18,7%) à linezolida e metade tinha o perfil VISA, comumente apresentando

resistência cruzada com um ou mais dos antimicrobianos citados (CHEN; HUANG; SHIE, 2020).

Cepas resistentes a outras classes de antibacterianos também têm sido relatadas. A expressão de bombas de efluxo tem se tornado um mecanismo de resistência importante, onde há expulsão ativa do fármaco da célula bacteriana. A expressão das bombas NorA, MsrA e TetA (K) conferem resistência a quinolonas, macrolídeos e tetraciclina, respectivamente (JANG, 2016; LEKSHMI *et al.*, 2018).

Aminoglicosídeos são antibacterianos que se ligam à subunidade ribossomal 30S e inibem a síntese proteica (MCDERMOTT *et al.*, 2022). A resistência aos fármacos da classe pode se dar pela expressão de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), que incluem a aminoglicosídeo-fosfotransferase (APH), a adenil-transferase (AAD) e a acetil-transferase (AAC) (HASHEMIZADEH *et al.*, 2022).

No estudo de Khosravi, Jenabi e Montazeri (2017) foi reportado que 64% (n = 161) dos isolados clínicos de MRSA possuíam o gene *aac(1a)-2* (acetil-transferase). Outro estudo encontrou que 98,7% dos isolados clínicos de MRSA (n = 83) apresentaram resistência à gentamicina e à estreptomicina, e 41% (n = 34) expressaram o gene *aac (6')-Ie*, destacando a prevalência da resistência a aminoglicosídeos em cepas MRSA (HASHEMIZADEH *et al.*, 2022).

As opções terapêuticas disponíveis frente ao *S. aureus* vêm se tornando cada vez mais restritas, ao passo que a crise dos antimicrobianos cresce. O *S. aureus* é um microrganismo altamente adaptável e eficaz na transferência de EGMs, que o colocam no grupo de alta prioridade para descoberta de novos fármacos antibacterianos (HAABER; PENADÉS; INGMER, 2017).

## 2.2 Compostos fitoquímicos

Devido às implicações da AMR, cresce a demanda por novas moléculas com atividade antibacteriana frente a *S. aureus*. Uma tendência importante nas últimas décadas é o estudo de compostos bioativos a partir de fontes vegetais. Desde a Antiguidade, as plantas são utilizadas para diversos fins medicinais, no alívio de sintomas e tratamento de doenças (DENG; YU, 2018).

A busca de fitoquímicos candidatos a novos fármacos se dá pelo estudo de metabólitos secundários. O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário; metabólitos primários são essenciais no crescimento e desenvolvimento da planta,

enquanto metabólitos secundários são envolvidos em funções especiais como defesa a agentes externos, e geralmente apresentam atividade biológica. São exemplos óleos essenciais, taninos, terpenoides e compostos fenólicos (SADEEK; ABDALLAH, 2019).

Estudos de prospecção fitoquímica de espécies vegetais incluem, inicialmente, a análise *in vitro* de extratos e suas atividades biológicas. Inúmeros estudos avaliam a atividade antibacteriana de extratos, possibilitando o isolamento de compostos *a posteriori* (ABEBE *et al.*, 2022; BURMAN *et al.*, 2018; CHABÁN *et al.*, 2019; CHUKWUJEKWU; STADEN, 2016; FANKAM; KUIATE; KUETE, 2015; MORADI; HADI; BAZARGANI, 2020). Embora o uso de compostos isolados seja comum, é reportado que a maioria das substâncias purificadas possuem menor atividade antibacteriana quando comparada ao extrato (DENG; YU, 2018).

Embora se conheça o potencial terapêutico de inúmeras plantas medicinais, o uso destas para doenças infecciosas é subnotificado. Estima-se que de todas as espécies vegetais do planeta, 10% foram utilizados na medicina popular para tratar infecções, dos quais apenas 1% foi reconhecido pela ciência moderna. No entanto, estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos têm ganhado relevância na prospecção de novos compostos antibacterianos (KHAN *et al.*, 2009).

### 2.3 Plantas do gênero *Combretum*

O Brasil possui uma flora essencialmente diversa, que corresponde a 20% da biodiversidade vegetal de todo o mundo. Quase 50 000 espécies são descritas no país, das quais 55% são endêmicas. A busca de novas moléculas bioativas em plantas nativas se torna viável, devido à diversidade botânica distribuída em biomas diversos (BRAGA, 2021).

A Caatinga é um bioma característico da região Nordeste, onde muitas plantas são utilizadas na medicina popular. Algumas das espécies mais descritas incluem *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Anadenanthera colubrina* Vell. (angico), *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) (umburana de cheiro) e *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira) (SANTOS *et al.*, 2018). Ainda que essas plantas sejam conhecidas na medicina tradicional, há uma escassez de estudos etnofarmacológicos para diversas outras plantas nativas (MAGALHÃES *et al.*, 2019).

O gênero *Combretum* compreende árvores e arbustos de distribuição tropical, possuindo espécies nativas no Nordeste e Cerrado brasileiros (Figura 1). É o principal gênero da família Combretaceae, apresentando cerca de 370 espécies descritas (LIMA, G. *et al.*, 2012). O uso medicinal de plantas é relatado na literatura, devido a atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimalárica e anti-infecciosa (BURMAN *et al.*, 2018).

**Figura 1** – Planta da espécie *Combretum duarteanum* Cambess.



*C. duarteanum* Cambess em região de Caatinga de Patos – PB. [José Vinícius de Medeiros]. [2021]. Observado em iNaturalist. Disponível em: <https://www.biodiversity4all.org/observations/81175075>. Acesso em: 09 mai 2023.

Na revisão proposta por Lima *et al.* (2012), a espécie *Combretum duarteanum* Cambess (mofumbo) possui atividades anti-inflamatória, analgésica e antitumoral. Estudos com *Combretum leprosum* Mart. (pente-de-macaco) revelam também o potencial anti-inflamatório, analgésico e moluscicida. Relatos sobre o potencial biológico de *Combretum mellifluum* Eichler (caatinga-branca) são raros. Para essas espécies, são escassos estudos de atividade antibacteriana, embora seja relatado para outras plantas do gênero.

Nesse contexto, um estudo com duas espécies do gênero *Combretum* frente a bactérias patogênicas observou que os extratos de *Combretum edwardsii* e *Combretum krausii* apresentam atividade antibacteriana e efeito sinérgico a antimicrobianos como penicilina, amoxicilina e cloranfenicol, assim, demonstrando o potencial antibacteriano e modulador de extratos de plantas do gênero *Combretum* frente a patógenos, incluindo o *S. aureus* (CHUKWUJEKWU; STADEN, 2016). Tendo

em vista o potencial etnofarmacológico do gênero *Combretum*, torna-se relevante o estudo da atividade antibacteriana dessas espécies frente ao contexto de multirresistência em cepas de *S. aureus*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar se extratos de espécies de *Combretum* possuem atividade antibacteriana e moduladora frente ao *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o fenótipo de resistência das cepas de *S. aureus* utilizadas;
- Comparar o potencial anti-*S. aureus* dos extratos de três espécies de *Combretum*;
- Investigar a interação química entre extrato e antibacterianos convencionais.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Tipo de estudo e local da pesquisa

Trata-se de um estudo experimental e analítico, desenvolvido no Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM) e no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), ambos situados no Departamento de Biologia Molecular (DBM) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) - Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus I.

#### 4.2 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas seis cepas de *S. aureus* (Quadro 1). As linhagens 1199B NOR, RN 4220 e IS-58 são cepas que expressam bombas de efluxo. As cepas 1199B NOR e RN 4220 expressam as bombas NorA e MsrA, responsáveis pelo efluxo de fluoroquinolonas e macrolídeos, respectivamente (SMITH *et al.*, 2007). A cepa IS-58 apresenta fenótipo de resistência a tetraciclina devido à expressão da bomba TetK (GIBBONS; UDO, 2000).

As linhagens SA 4 e SA 5 (códigos internos do laboratório) foram cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiane Santi Gadelha; as cepas resistentes (SA 1199B NOR, SA RN 4220 e SA IS-58), pelo Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior, ambos vinculados ao DBM - CCEN. A SA 6 (código interno do laboratório) foi obtida comercialmente (Culti-Loops®, Thermo Fisher), sendo ativada e armazenada para posterior utilização nos experimentos.

**Quadro 1** – Cepas padrão de *S. aureus* utilizadas nos experimentos.

<b>Linhagem</b>	<b>Código</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	SA 4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9124150	SA 5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25178	SA 6
<i>Staphylococcus aureus</i> 1199B NOR	SA 1199B NOR
<i>Staphylococcus aureus</i> RN 4220	SA RN 4220
<i>Staphylococcus aureus</i> IS-58	SA IS-58

Fonte: Próprio Autor, 2023.

#### 4.3 Armazenamento e padronização do inóculo

As cepas foram armazenadas em microtubos contendo Caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) e glicerol a 20%, sendo mantidas sob refrigeração a -20 °C. Os microrganismos também foram estocados em ágar Mueller-Hinton (MH) inclinado, mantidos a 4 °C e renovados a cada oito semanas para manter a viabilidade bacteriana dos estoques.

Para utilização nos ensaios foi realizado o pré-inóculo das cepas de interesse no dia anterior ao experimento. Com uma alça bacteriológica, uma alíquota de bactérias viáveis em ágar MH é transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de BHI. Os tubos foram identificados e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C, durante 18-24 horas. O pré-inóculo foi padronizado a partir de uma densidade óptica (DO) de 0,1 a 600 nm, equivalente a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

#### 4.4 Caracterização dos extratos

Foram avaliados sete extratos vegetais (Quadro 2), cedidos pelo Prof. Dr. Éverton Leandro de França Ferreira e pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Helena Chaves, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e Universidade Federal do Piauí (UFPI), respectivamente. O material vegetal utilizado foram folhas de três espécies de *Combretum*, coletadas no estado do Piauí, Brasil, em janeiro de 2012 nos municípios de Jatobá do Piauí (localizado na região norte estado) e de Floriano (localizado na região sul do estado). Os extratos correspondem a frações etanólicas ou aquosas das folhas de três espécies de *Combretum*: *C. duarteanum* (mofumbo), *C. mellifluum* (caatinga-branca) e *C. leprosum* (pente-de-macaco). Os símbolos Norte (N) e Sul (S) representam variações geográficas de uma mesma espécie.

**Quadro 2** – Caracterização química e botânica dos extratos de *Combretum* spp.

<b>Extrato</b>	<b>Código</b>
<b><i>C. duarteanum</i> Cambess</b>	
Extrato etanólico (Norte)	CDEN
Extrato etanólico (Sul)	CDES
Extrato aquoso (Norte)	CDAN
Extrato aquoso (Sul)	CDAS
<b><i>C. mellifluum</i> Eichler</b>	
Extrato etanólico	CME
<b><i>C. leprosum</i> Mart.</b>	
Extrato etanólico	CLE
Extrato aquoso	CLA

Fonte: Próprio Autor, 2023.

Além dos extratos citados, foram testadas três frações do extrato etanólico CDEN, sendo: CDEN-Hex (fração hexânica), CDEN-AcOEt (fração acetato de etila) e CDEN-Aq (fração aquosa). Para utilização nos ensaios, os extratos e as frações foram dissolvidos em 80% dimetilsulfóxido (DMSO) e 20% água esterilizada, em estoques de 10 mg/mL, e imediatamente utilizados nos ensaios.

#### 4.5 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)

A fim de caracterizar o perfil de resistência das linhagens de *S. aureus*, ensaios de TSA ou antibiograma foram realizados. Os discos de antibacterianos comerciais testados foram: amicacina (AMI) 30 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, neomicina (NEO) 30 µg, tobramicina (TOB) 10 µg, eritromicina (ERI) 15 µg, tetraciclina (TET) 30 µg, minociclina (MIN) 30 µg, norfloxacino (NOR) 10 µg, ciprofloxacino (CIP) 5 µg, penicilina G (PEN) 10 µg, oxacilina (OXA) 1 µg e cloranfenicol (CLO) 30 µg.

O ensaio seguiu o método de disco-difusão em ágar (Kirby-Bauer), onde o inóculo foi padronizado pela diluição do pré-inóculo em salina (NaCl 0,9%) na proporção de 1:10. Foram transferidos 300 µL desse inóculo para placas de Petri com ágar MH, e espalhados com uma alça de vidro. As placas são deixadas semiabertas em uma cabine de fluxo laminar horizontal por 5 minutos; após a secagem, são adicionados os discos de antibióticos com o auxílio de uma pinça, com uma distância mínima de 30 mm entre os discos. Depois de prontas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas. No dia seguinte, foi feita a medição dos halos com o auxílio de um paquímetro, e o perfil de suscetibilidade analisado pelos critérios do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) e do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (BRCAST, 2021; CLSI, 2023).

#### 4.6 Determinação de genes de resistência a aminoglicosídeos

A fim de melhor caracterizar a resistência aos aminoglicosídeos, foi realizada a determinação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) nas cepas de *S. aureus* por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Utilizou-se oligonucleotídeos específicos para a triagem dos genes *aphA* (aminoglicosídeo-fosfotransferase), *aadD* (aminoglicosídeo-adeniltransferase) e *aacA-aphD* (aminoglicosídeo-acetiltransferase) nas linhagens de *S. aureus* (OLIVEIRA JÚNIOR, 2003).

Para extração do DNA bacteriano, utilizou-se o método de Singh, Kumari e Iyengar (2018) com adaptações. Uma alíquota da colônia da cepa de interesse foi incubada em 5 mL de caldo BHI a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, o pré-inóculo foi centrifugado a 14 000 g em dois ciclos de 2 minutos cada, o precipitado celular foi armazenado a -20 °C. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de

Chelex® 100 a 5%, incubado em banho-maria a 90 °C por 20 minutos e centrifugado a 13 000 g por 2 minutos, para obtenção do sobrenadante. Posteriormente, realizou-se a precipitação de proteínas adicionando-se acetato de amônio para uma concentração final de 2,5 M. O microtubo contendo o sobrenadante foi incubado em gelo por 5 minutos, seguido por 5 segundos de vórtex e centrifugação a 13 000 g por 10 minutos, para obtenção de um novo sobrenadante. Depois, para a precipitação do DNA adicionou-se acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 200 µL de etanol absoluto gelado, seguido de vórtex por 5 segundos e incubação *overnight* a – 20 °C. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 15 000 g por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e obteve-se o DNA precipitado. Posteriormente, realizou-se duas lavagens com etanol gelado a 75% e uma lavagem final com isopropanol absoluto gelado. Entre cada lavagem, os microtubos foram centrifugados a 12 000 g por 10 minutos a 4 °C. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados na cabine de fluxo laminar horizontal por 30 minutos para evaporação do solvente. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 30 µL de Tris-EDTA (TE), vórtex por 5 segundos e uma breve centrifugação, seguidos por incubação a 55 °C por 10 minutos. O rendimento da extração foi quantificado (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite) em ng/µL, e as amostras armazenadas a – 20 °C.

Para detecção dos genes foi realizado o ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Os oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes foram: *aphA* – amplicon com 269 pares de bases (pb) (W-For 5'-GCC GAT GTG GAT TGC GAA AA-3' e W-Rev 5'-GCT TGA TCC CCA GTA AGT CA-3'); *aadD* – amplicon com 174 pb (W-For 5'-GCA AGG ACC GAC AAC ATT TC-3' e W-Rev 5'-TGG CAC AGA TGG TCA TAA AG); *aacA-aphD* - amplicon com 222 pb (W-For 5'-CCA AGA GCA ATA AGG GCA TA-3' e W-Rev 5'-CAC TAT CAT AAC CAC TAC CG-3'). As reações contendo 25 µL continham 4 µL DNA bacteriano (200 ng); 1 µL de cada primer (0,4 µM); 2 µL dNTPs (0,2 mM); 1 µL MgCl<sub>2</sub> (2 mM); 2,5 µL tampão; 0,25 µL Taq DNA polimerase (1,25 U); 13,25 µL água Milli-Q® autoclavada. As reações seguiram para os ciclos de amplificação (Marshall Cientific™ MJ Research PTC-200 Thermal Cycler), iniciando com um passo de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 57 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese

em gel de agarose a 1,5%, corados com UniSafe Dye® e observados em transiluminador.

#### 4.7 Triagem da atividade dos extratos

Inicialmente, realizou-se uma triagem para determinar a presença de atividade antibacteriana dos extratos. O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços, em reações de 100 µL. O pré-inóculo foi diluído em caldo BHI na proporção de 1:100 (MTUNZI *et al.*, 2017). As seguintes condições foram avaliadas: controle positivo do crescimento, contendo o inóculo na presença do solvente dos extratos (DMSO a 4%); controle negativo, apenas o meio BHI sem inóculo e na presença do DMSO a 4%; controle positivo de inibição, utilizando tetraciclina a 125 µg/mL como agente antibacteriano padrão; teste dos extratos, onde cada extrato foi avaliado individualmente na concentração de 500 µg/mL. A microplaca foi incubada a 37 °C durante 24 horas e analisada no dia seguinte. A densidade óptica (DO) foi analisada por espectrofotometria a 600 nm (Thermo Scientific Multiskan GO®), de modo a determinar a presença ou ausência de crescimento pela variação da DO após a incubação. Em seguida, foi aplicado o método da resazurina, adicionando-se 20 µL de resazurina a 0,01% em cada poço e realizando a análise após uma hora de incubação a 37 °C.

#### 4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Os extratos que apresentaram atividade anti-*S. aureus* na triagem microbiológica seguiram para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*) e Concentração Bactericida Mínima (MBC – *Minimum Bactericidal Concentration*), seguindo o método de macrodiluição e microdiluição em caldo (CLSI, 2015) com adaptações. Os ensaios de MIC foram feitos em réplica e triplicata, onde no primeiro poço contendo o inóculo foi adicionado o extrato a 500 µg/mL em 200 µL de reação, de onde foi feita a diluição seriada por poços contendo 100 µL do inóculo, até a concentração de 31,25 µg/mL. Foram adicionados os controles positivo, negativo e da tetraciclina, semelhante à triagem. A microplaca foi incubada a 37 °C durante 24 horas, e no dia seguinte analisada por

espectrofotometria a 600 nm e pela resazurina. Foi considerado MIC a concentração em que não houve crescimento bacteriano pelos métodos citados.

Para os testes de MBC, realizou-se subculturas das concentrações do extrato que apresentarem inibição do crescimento. Transferiu-se uma alíquota de 100 µL para uma placa de Petri contendo ágar MH, semeada pela técnica de espalhamento; as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, seguida pela contagem de colônias no dia posterior. Foi considerada MBC a menor concentração com atividade bactericida, ou seja, que não apresentou crescimento de colônias na subcultura.

#### 4.9 Ensaios de modulação antibiótico-extrato

Os ensaios de modulação buscam avaliar se os antimicrobianos são potencializados na presença de outros compostos, como os extratos vegetais. Para a modulação, determinou-se o MIC dos antibióticos individualmente (norfloxacino e estreptomicina) e o MIC dos antibióticos na presença do extrato CDEN em concentração sub-inibitória ( $\frac{1}{4}$  do MIC). Os valores de MIC foram determinados por espectrofotometria a 600 nm e pela resazurina.

Para uma análise mais aprofundada da interação entre a estreptomicina (A) e a fração CDEN-AcOEt (B) foi realizado o método de *Checkerboard*. A Concentração Inibitória Fracionada (FIC - *Fractional Inhibitory Concentration*) das substâncias foi calculada dividindo-se o MIC das substâncias combinadas pelo MIC da substância isolada. A soma da FIC (A) + FIC (B) correspondeu ao Índice de FIC (FICI – *FIC Index*), descrita pela equação a seguir:

$$\sum FICI = FIC (A) + FIC (B)$$

A interação entre as duas substâncias foi classificada pelo valor da FICI: sinergismo para  $FICI \leq 0,5$ ; adição para FICI entre 0,5 e 1; indiferente para FICI entre 1 e 4 e antagonismo para valores de  $FICI > 4$  (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perfil de resistência das linhagens de *S. aureus*

O método de disco-difusão foi utilizado com o objetivo de traçar o perfil de resistência das linhagens de *S. aureus* utilizadas (Tabela 1). Dentre os aminoglicosídeos testados (amicacina, gentamicina, neomicina e tobramicina), todas as estirpes apresentaram resistência à amicacina e gentamicina; as cepas SA 6 e SA 1199B NOR foram sensíveis à neomicina e à tobramicina, enquanto as demais foram resistentes a esses antibacterianos.

**Tabela 1** – Fenótipo de resistência para cepas de *S. aureus* de acordo com os *breakpoints* do BrCAST e CLSI\* para o método de disco-difusão.

Antibacterianos	Cepas					
	SA 4	SA 5	SA 6	SA 1199B NOR**	SA RN 4220**	SA IS- 58**
AMI	R	R	R	R	R	R
GEN	R	R	R	R	R	R
NEO*	R	R	S	S	R	R
TOB	R	R	S	S	R	R
ERI	S	R	R	S	R	R
TET	S	S	S	S	R	R
MIN	S	S	S	S	S	R
NOR	S	S	S	R	R	R
CIP	I	I	I	R	R	R
PEN	R	R	R	R	R	S
OXA*	R	R	S	S	S	S
CLO	R	R	S	S	R	R

S: suscetível; I: intermediário; R: resistente; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; TOB: tobramicina; ERI: eritromicina; TET: tetraciclina; MIN: minociclina; NOR: norfloxacino; CIP: ciprofloxacino; PEN: penicilina G; OXA: oxacilina; CLO: cloranfenicol; \*: *breakpoints* do CLSI; \*\*: cepas que expressam bombas de efluxo (BEs). Os valores destacados em negrito indicam fenótipo resistente ao antibacteriano. Os dados representam a média de dois ou mais experimentos independentes. Fonte: Próprio Autor, 2023.

A expressão dos genes de AMEs está descrita no Quadro 3. As cepas SA 4, SA 5, SA RN 4220 e SA IS-58 expressaram o gene *aacA-aphD* e foram resistentes a

todos os aminoglicosídeos testados. Al-Sheeres, Al-Khateeb e Hashim (2019) descrevem que cepas resistentes à gentamicina que expressam o gene *aacA-aphD* são clinicamente resistentes a todos os aminoglicosídeos, convergindo com os achados do presente estudo.

**Quadro 3** – Presença dos genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) nas linhagens de *S. aureus*.

Cepas	Genes		
	<i>aphA</i>	<i>aadD</i>	<i>aacA-aphD</i>
SA 4	-	-	+
SA 5	-	-	+
SA 6	-	-	-
SA 1199B NOR	+	-	-
SA RN 4220	+	-	+
SA IS-58	+	-	+

+: presença do gene determinada pelo ensaio de PCR. -: ausência do gene. Os dados representam os resultados de dois experimentos independentes. Fonte: Próprio Autor, 2023.

Devido à baixa sensibilidade, aminoglicosídeos geralmente não são utilizados de forma isolada no tratamento de infecções por *S. aureus*. Embora a terapia combinada entre aminoglicosídeos e beta-lactâmicos seja utilizada (HASHEMIZADEH *et al.*, 2022), o desenvolvimento de mecanismos de resistência para ambas as classes restringe o êxito do tratamento. Nesse sentido, a terapia combinada com outras moléculas, como compostos fitoquímicos, pode aumentar o arsenal terapêutico dos aminoglicosídeos nos contextos de resistência (SUN *et al.*, 2020).

As estirpes SA RN 4220 e SA IS-58 apresentaram resistência à eritromicina (macrolídeo) e à tetraciclina; a cepa SA IS-58 também foi resistente à minociclina (classe da tetraciclina). Todas as cepas que expressam BEs foram resistentes ao norfloxacino e ao ciprofloxacino, ambos da classe das fluoroquinolonas. O surgimento de fenótipos resistentes a macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas configura uma preocupação, visto que antibacterianos com um amplo espectro de ação têm sua eficácia terapêutica comprometida (MILLANAO *et al.*, 2021).

A expressão de BEs é um importante mecanismo de resistência associado à sobrevivência bacteriana, responsável pela extrusão de agentes tóxicos como antibióticos, biocidas e metais pesados. São descritas diversas famílias dessas

proteínas, como a MFS (*Major Facilitator Superfamily*) e a ABC (*ATP-Binding Cassette*), tendo como exemplos as bombas NorA e MsrA, respectivamente (JANG, 2016).

Na revisão sistemática proposta por Hassanzadeh e colaboradores (2020) foi avaliada a epidemiologia da expressão de BEs em isolados *S. aureus*; 77,7% (n = 28) dos estudos selecionados foram realizados na Ásia e América, onde o gene *norA* foi o mais reportado, representando a relevância das BEs no aumento da AMR.

Outro estudo caracterizou a expressão de genes de bombas de efluxo em cepas de HA-MRSA isoladas de hemoculturas. Dos isolados, 84,4% foram resistentes ao ciprofloxacino; todos os isolados apresentaram os genes *norA* e *norB*, e 95% o gene *norC*. Tal achado elucidava a prevalência da bomba NorA como mecanismo de resistência em isolados nosocomiais (BOSTANMANESHRADEH *et al.*, 2020).

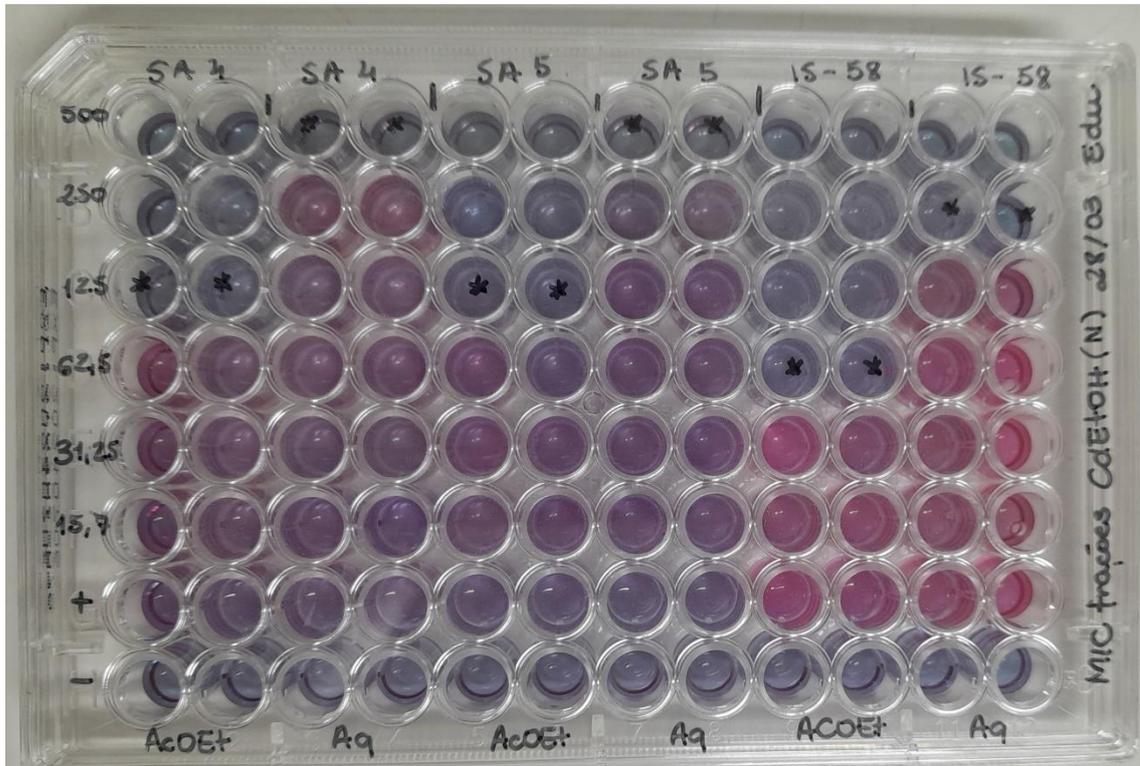
## 5.2 Triagem da atividade dos extratos

A atividade dos extratos foliares de *Combretum* spp. (Quadro 2) foi avaliada pelo revelador resazurina e por espectrofotometria. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um indicador de viabilidade celular, uma vez que é reduzida a resorufina na presença de células viáveis (Figura 2). A coloração azul é própria da resazurina, transformando-se em rosa fluorescente quando reduzida a resorufina, indicando a viabilidade do cultivo (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Assim como o iodonitrotetrazólio (INT), a resazurina é um indicador colorimétrico amplamente utilizado na triagem e determinação do MIC de compostos fitoquímicos. Além da reprodutibilidade, é relatado que o método da resazurina pode fornecer dados de concentração letal mínima dos compostos, caso as culturas sejam incubadas por um tempo superior a 24 horas (ELOFF, 2019).

Os extratos etanólico e aquoso de *C. leprosum* (CLE e CLA) não apresentaram atividade antibacteriana a 0,5 mg/mL frente às cepas de *S. aureus*. Os extratos de *C. duarteanum* (CDEN, CDES, CDAN e CDAS) e *C. mellifluum* (CME) apresentaram atividade anti-*S. aureus* na concentração testada. A fração CDEN-Hex não apresentou atividade, enquanto as frações CDEN-AcOEt e CDEN-Aq inibiram o crescimento *in vitro* do *S. aureus*, indicando que a molécula (ou as moléculas) com potencial antimicrobiano no CDEN apresenta características mais polares.

**Figura 2** – Determinação do MIC das frações CDEN-AcOEt e CDEN-Aq pelo método colorimétrico da resazurina.



Anotações na microplaca: 500 a 15,7: concentrações testadas (µg/mL); +: controle positivo do inóculo bacteriano na presença do solvente (DMSO a 4%); -: controle negativo do crescimento; SA 4: *S. aureus* ATCC 27664; SA 5: *S. aureus* ATCC 9124150; SA IS-58: *S. aureus* IS-58 (bomba de efluxo para tetraciclinas); AcOEt: fração acetato de etila do extrato CDEN; Aq: fração aquosa do extrato CDEN; \*: MIC determinado pelo indicador de viabilidade celular. Fonte: Próprio Autor, 2023.

Neste sentido, um estudo de filogenia molecular avaliou famílias de plantas e seus potenciais de aplicação como fonte de novos agentes antibacterianos. Corroborando os dados da triagem, onde duas das espécies apresentam potencial antibacteriano em baixas concentrações de extrato, foi revelado que 42% dos gêneros da família Combretaceae são potenciais fornecedores de fitoquímicos com atividade antibacteriana, superando as famílias Cupressaceae (14%), Lauraceae (11%), Zingiberaceae (10%), Meliaceae (10%), Myrtaceae (6%), Lamiaceae (5%) e Fabaceae (1%) (PRASAD; ZOLNIK; MOLINA, 2019).

O uso de plantas do gênero *Combretum* na medicina tradicional é relatado na literatura. Tais plantas são amplamente utilizadas em regiões tropicais e possuem uma variedade de aplicações fitoterápicas, tais como em acidentes com animais peçonhentos, infecções de feridas e úlceras, doenças parasitárias, fúngicas e bacterianas. O conhecimento etnofarmacológico de plantas do gênero é somado aos

estudos de suscetibilidade microbiana *in vitro*, como o presente estudo, que reforça o potencial do gênero na descoberta de novos antibióticos (SILÉN *et al.*, 2023).

### 5.3 MIC e MBC dos extratos

Os extratos de *C. leprosum* (CLE e CLA) e a fração CDEN-Hex apresentaram MIC superior a 0,5 mg/mL, a maior concentração testada, como descrito na triagem. Para os extratos de *C. duarteanum* e *C. mellifluum* e para as demais frações de CDEN foram obtidos valores de MIC de 0,062 a 0,5 mg/mL (Tabela 2) em todas as cepas de *S. aureus* testadas, incluindo as linhagens portadoras de BEs. Foi encontrado que para o fracionamento do CDEN, a fração aquosa obteve menor potência quando comparado ao extrato etanólico bruto e à fração acetato de etila, indicando que o fracionamento precisa ser otimizado para concentrar as moléculas de interesse.

Para o ensaio de MBC foram utilizados extratos na concentração de 1 ou 2 mg/mL, quando as concentrações do MIC (500 a 15,7 µg/mL) não apresentaram ação bactericida. Observamos que o controle positivo de algumas linhagens não crescia nos ensaios à concentração de 1 mg/mL (DMSO a 8%), indicando que a concentração do solvente estava afetando o crescimento. Estudos relatam a toxicidade do DMSO em altas concentrações em bioensaios (FLORAO *et al.*, 2007). A fração CDEN-AcOEt foi testada em 80% DMSO por apresentar MBC inferior a 1 mg/mL. Para adaptar o ensaio, realizamos novas diluições dos extratos CDAN, CDAS e CME em 50% DMSO, viabilizando o crescimento das cepas sensíveis e a avaliação do potencial bactericida dos compostos (Tabela 3).

A fração CDEN-AcOEt apresentou MBC igual ou inferior a 0,5 mg/mL para as linhagens SA 6, SA 1199B NOR, SA RN 4220 e SA IS-58. Os extratos aquosos de *C. duarteanum* (CDAN e CDAS) apresentaram MBC igual a 2 mg/mL para SA 6 e SA RN 4220, e igual a 1 para SA IS-58. O extrato CME apresentou MBC apenas para a SA IS-58 (Tabela 3).

**Tabela 2** – Valores de MIC (mg/mL) dos extratos e frações de *Combretum* spp. frente a linhagens de *S. aureus*.

Cepas	Extratos									
	CDEN	CDEN-Hex	CDEN-AcOEt	CDEN-Aq	CDES	CDAN	CDAS	CME	CLE	CLA
SA 4	<b>0,125</b>	>0,5	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	>0,5	>0,5
SA 5	<b>0,125</b>	>0,5	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	>0,5	>0,5
SA 6	<b>0,125</b>	>0,5	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	>0,5	>0,5
SA 1199B NOR	<b>0,125</b>	>0,5	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	<b>0,062</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	>0,5	>0,5
SA RN 4220	<b>0,125</b>	>0,5	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	>0,5	>0,5
SA IS-58	<b>0,062</b>	>0,5	<b>0,062</b>	<b>0,25</b>	<b>0,062</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	>0,5	>0,5

Dados obtidos a partir de triplicatas independentes. Fonte: Próprio Autor, 2023.

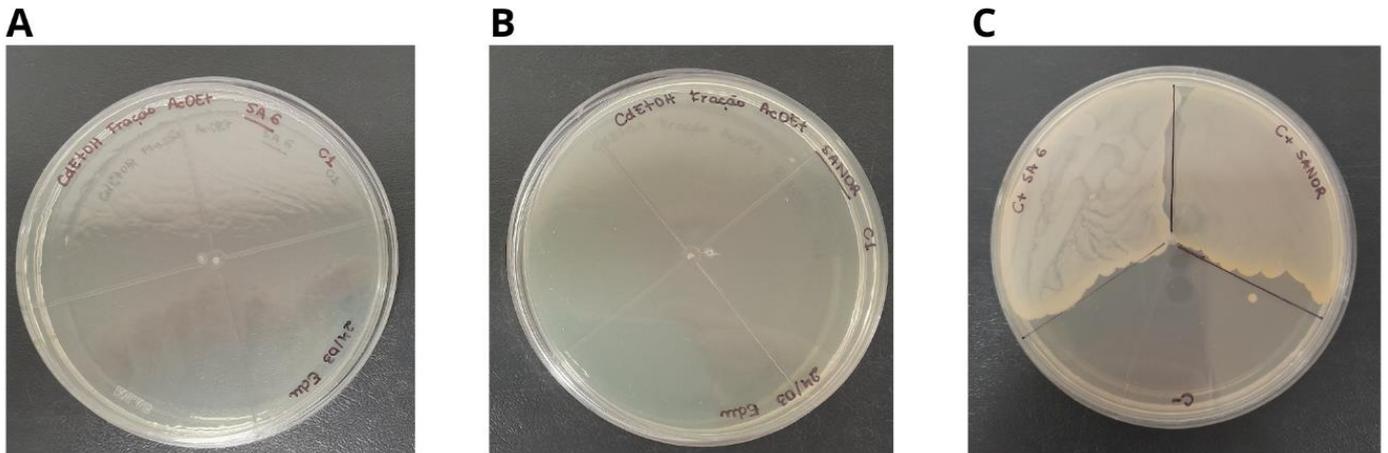
**Tabela 3** – Valores de MBC (mg/mL) e *ratio* MBC/MIC dos extratos de *C. duarteanum* e *C. mellifluum*.

Cepas	Extratos									
	CDEN-AcOEt		CDEN-Aq		CDAN*		CDAS*		CME*	
	MBC	<i>Ratio</i>	MBC	<i>Ratio</i>	MBC	<i>Ratio</i>	MBC	<i>Ratio</i>	MBC	<i>Ratio</i>
SA 6	<b>0,5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	2	8	-	-
SA NOR	<b>0,5</b>	<b>4</b>	>1	>4	-	-	-	-	-	-
SA RN	<b>0,5</b>	<b>4</b>	>1	>4	<b>2</b>	<b>4</b>	2	8	-	-
SA IS-58	<b>0,25</b>	<b>4</b>	>1	>4	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>4</b>

-: MBC não encontrada nas concentrações testadas; \*: extratos dissolvidos em 50% DMSO. Os valores de MBC em negrito representam atividade bactericida (*ratio* ≤ 4) do extrato ou fração frente à cepa testada. Os dados representam os resultados de triplicatas independentes. Fonte: Próprio Autor, 2023.

Para as cepas SA 4 e SA 5, o valor de MBC foi maior do que as concentrações avaliadas. Segundo Uc-Cachón *et al.* (2021), a atividade de um extrato é classificada como bactericida ou bacteriostática a partir do ratio MBC/MIC. A fração CDEN-AcOEt foi bactericida (ratio  $\leq 4$ ) frente às cepas SA 6 e SA 1199B NOR (Figura 3), SA RN 4220 e SA IS-58; o extrato CDAN foi bactericida contra a SA 6, SA RN 4220 e SA IS-58, enquanto os extratos CDAS e CME apresentaram a mesma atividade apenas contra a SA IS-58. Interessante observar que a cepa SA IS-58 apresentou maior suscetibilidade à ação bactericida dos extratos avaliados (Tabela 3). Os demais extratos possuíram atividade bacteriostática (ratio  $> 4$ ) frente às linhagens testadas, reforçando a atividade antibacteriana do gênero *Combretum* (SILÉN *et al.*, 2023).

**Figura 3** – Atividade bactericida da fração CDEN-AcOEt frente às cepas SA 6 e SA 1199B NOR.



Subcultura da cepa SA 6 na presença da fração AcOEt a 0,5 mg/mL; B: subcultura da cepa SA 1199B NOR na presença da fração CDEN-AcOEt a 0,5 mg/mL; C: controles positivo para SA 6, positivo para SA 1199B NOR e controle negativo (sem inóculo bacteriano). A ausência de colônias em A e B indicam que a fração apresentou atividade bactericida. Fonte: Próprio Autor, 2023.

Um estudo avaliou extratos metanólicos das folhas de 26 espécies de *Combretum* (espécies do presente trabalho não incluídas nesse estudo), com valores de MIC indo de 0,09 a 3 mg/mL para *S. aureus*; os valores de MIC mais baixos corresponderam aos extratos de *Combretum imberbe* (0,09 mg/mL) e *Combretum elaeagnoides* (0,15 mg/mL). A filogenia molecular defende a similaridade fitoquímica entre espécies de um mesmo gênero, reiterando que a atividade antibacteriana é encontrada em diversas espécies do gênero *Combretum* (ANOKWURU *et al.*, 2021).

Mtunzi e colaboradores (2017) encontraram que os extratos aquoso, acetônico e diclorometanólico das folhas de *Combretum erythrophyllum* (Burch.) apresentaram atividade anti-*S. aureus*, com MIC iguais a 0,16, 0,32 e 0,32 mg/mL, respectivamente.

Analogamente ao presente estudo, foi reportado que as frações com melhor atividade foram a aquosa e acetato de etila, explicada pela presença de uma maior concentração de moléculas solúveis nestes solventes como compostos fenólicos, responsáveis pela ação antibacteriana.

Nos trabalhos de prospecção fitoquímica, valores de MIC são importantes para compreender o potencial de extratos vegetais. Baixos valores de MIC são indicadores da presença de compostos antibacterianos promissores. A classificação utilizada por Laskoski e colaboradores (2022) considerou atividade muito fraca para valores acima de 100 mg/mL, fraca entre 50 e 100 mg/mL, moderada entre 12,5 e 50 mg/mL e alta para MIC de extratos abaixo de 12,5 mg/mL.

De modo similar, Nguedia e Shey (2014) descrevem extratos vegetais com MIC abaixo de 10 mg/mL como promissores. Um estudo recente aponta a aceitabilidade de valores de MIC abaixo de 8 mg/mL, e maior relevância etnofarmacológica para os valores inferiores a 1 mg/mL (OKWU *et al.*, 2019) Os valores de MIC encontrados no presente trabalho apontam espécies nativas de *Combretum* como fontes potenciais de novas moléculas antiestafilocócicas.

A triagem inicial da atividade antibacteriana de extratos vegetais é de suma importância na caracterização e isolamento de compostos *a posteriori*. A sobreposição fitofarmacológica é descrita na literatura, onde os mesmos metabólitos secundários podem ser isolados dentro de um mesmo gênero ou de uma família. Até o momento foram isoladas 261 moléculas de espécies do gênero *Combretum*, sendo a maioria da classe dos terpenoides e dos compostos fenólicos (SILÉN *et al.*, 2023).

Alsheik *et al.* (2020) observaram que monoterpenos, terpenos e sesquiterpenos alteraram a permeabilidade de membrana plasmática e inibiram o crescimento bacteriano *in vitro*. Assim como os terpenoides, os compostos fenólicos constituem uma ampla classe de moléculas encontradas em espécies de *Combretum*, incluindo ácidos fenólicos, estilbenos, fenantrenos e flavonoides. A presença de flavonoides está relacionada com a inibição da expressão de genes de *quorum-sensing*, um dos principais mecanismos de ação antibacteriana dentro da família Combretaceae (PRASAD; ZOLNIK; MOLINA, 2019).

Katerere, Serage e Eloff (2018) avaliaram o potencial de extratos vegetais e de flavonoides isolados a partir das folhas de *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*. Os extratos acetato de etila aquoso apresentaram MIC de 0,2 e 0,13

mg/mL, respectivamente, para o *S. aureus*; os flavonoides flavokavaina-A, alpinetina e pinocebrina apresentaram MICs de 0,04, 0,04 e 0,08 mg/mL, respectivamente.

Um estudo de quimiodiversidade caracterizou o teor de flavonoides totais de extratos de *C. duarteanum* (Cdua) Cambess de Cerrados Setentrionais (S) e Meridionais (M). Os extratos etanólicos de Cdua-S e Cdua-M apresentaram teores de flavonoides (em miligramas de equivalente de rutina por grama de extrato) iguais a  $164,84 \pm 4,21$  e  $254,14 \pm 4,14$ , respectivamente (FARIAS *et al.*, 2020). O alto teor dessas moléculas em extratos da espécie sugere a ação destas em células bacterianas. É relatado que esses compostos formam complexos com a parede celular e proteínas solúveis e extracelulares, inibindo fatores de virulência bacterianos e elucidando a atividade anti-*S. aureus* (OKWU *et al.*, 2019).

O estudo fitoquímico de *C. duarteanum* coletados no município de Serra Branca - PB identificou 12 moléculas, dentre elas o ácido corosóico (triterpeno), os ácido asiático-ácido arjunólico (triterpenos) e a hiperina, bem como as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila, o extrato metanólico, foram avaliadas em duas cepas ATCC de *S. aureus*, porém, não foi detectada atividade antibacteriana nas condições do estudo (CABRAL, 2013).

Recentemente, Cruz (2021) relatou a constituição fitoquímica de *C. duarteanum* (amostras do norte do estado de Minas Gerais) da fração metanólica e hexânica do extrato bruto etanólico. Cinco sesquiterpenoides foram identificados na fração hexânica (além de outras 15 moléculas sem relato bioativo) e três flavonoides na fração metanólica (Quadro 4). Ainda, a fração butanólica apresentou maior concentrações de flavonoides, entre 10 e 15 mg de EQ/g, e a fração butanólica e metanólica os maiores teores de fenóis, entre 60 e 70 mg EAG/g. A fração hexânica apresentou o menor teor de flavonóides e fenóis, e conseqüentemente, o menor efeito antioxidante. Por outro lado, essa fração e o extrato etanólico bruto apresentaram os maiores efeitos citotóxicos em células tumorais. Neste trabalho, a fração hexânica de *C. duarteanum* não apresentou atividade significativa anti-*S. aureus* (MIC > 0,5 mg/mL).

**Quadro 4** - Constituição fitoquímica de *C. duarteanum* segundo Cruz (2021).

Composto	Atividade anti- <i>S. aureus</i>	Referência
Sesquiterpenoides		
Nerolidol	55% de inibição a 10 mg/mL	LIMA, I. <i>et al.</i> , 2023
Espatulenol	Halo médio = 12,7 ± 0,0 mm (OE de <i>Eucalyptus lehmanii</i> )*	ELAISSI <i>et al.</i> , 2012
Viridiflorol	Halo médio = 55 ± 0,22 mm (OE de <i>Cistus ladanifer</i> L.)*	EL KARKOURI <i>et al.</i> , 2021
Ledol	Inibição moderada (halo médio entre 15 e 21 mm; OE <i>Angelica archangelica</i> L.)*	KORPINEN <i>et al.</i> , 2021
Óxido de cariofileno	MIC = 256 µg/mL (OE de <i>Croton conduplicatus</i> )*;  Sinérgico com oxacilina (FICI = 0,312) e ampicilina (FICI = 0,187)	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2023
Flavonoides		
Miricetina	Halo médio = 15,75 ± 0,42 mm (extrato etanólico de <i>Combretum collinum</i> L.)*	MARQUARDT <i>et al.</i> , 2020
Taxifolinas	ND	LI <i>et al.</i> , 2022

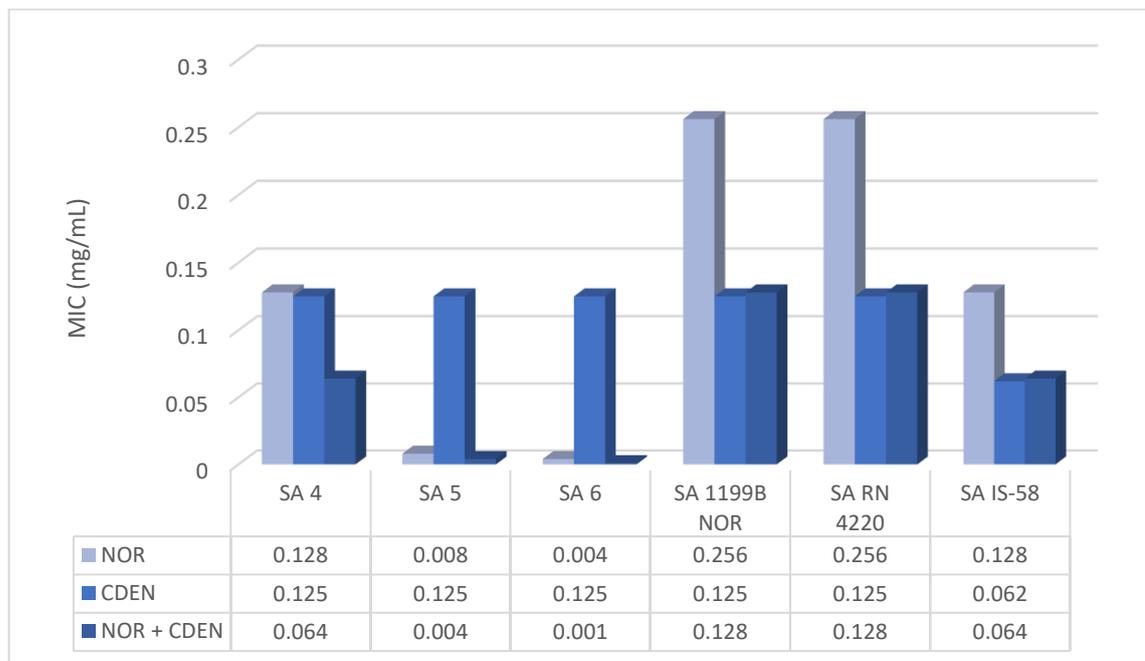
\*: Atividade anti-*S. aureus* do extrato ou óleo essencial (OE), do qual foram identificadas as moléculas associadas. ND: não descrito. Fonte: Próprio Autor, 2023.

#### 5.4 Modulação antibiótico-extrato

Ensaio de modulação visam avaliar o potencial modulador de compostos vegetais quando combinados a antibióticos, tendo em vista a descrição de efeitos sinérgicos em terapias antibacterianas combinadas (ALSHEIK *et al.*, 2020). A presença do extrato CDEN em concentração sub-inibitória ( $\frac{1}{4}$  do MIC) reduziu o MIC do norfloxacino de duas a quatro vezes (Gráfico 1). Para a estreptomicina, a redução foi de 8 a 32 vezes frente às cepas de *S. aureus* testadas (Gráfico 2). O ensaio de *checkerboard* demonstrou que a combinação EST + CDEN-AcOEt caracteriza-se como sinérgica (FICI = 0,0398) frente ao *S. aureus* ATCC 912415 (SA 5) (Tabela 4).

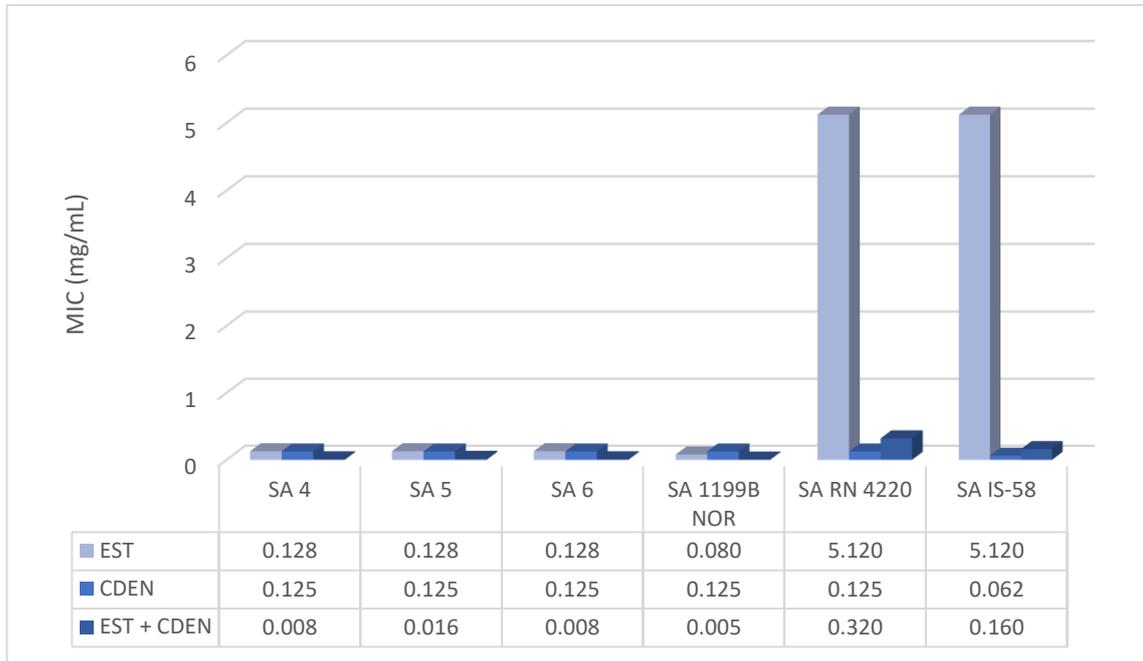
O fator de modulação (FM) é um parâmetro definido pela razão entre o MIC do antibacteriano isolado e o MIC em combinação com compostos fitoquímicos. Quanto maior o FM, maior o potencial modulador daquele composto quando combinado ao antimicrobiano (CHUKWUJEKWU; STADEN, 2016). O extrato etanólico de *C. duarteanum* apresentou FM de 8 a 32 quando combinado com a estreptomicina, sugerindo que esta combinação apresenta um efeito sinérgico contra o *S. aureus*.

**Gráfico 1** – Valores de MIC (mg/mL) e atividade moduladora do extrato CDEN combinado com ao norfloxacino.



NOR: norfloxacino; CDEN: extrato etanólico de *C. duarteanum* Cambess (Norte); NOR + CDEN: norfloxacino em combinação com o extrato na concentração de  $\frac{1}{4}$  do MIC. Fonte: Próprio Autor, 2023.

**Gráfico 2** – Valores de MIC (mg/mL) e atividade moduladora do extrato CDEN combinado com a estreptomicina.



EST: estreptomicina; CDEN: extrato etanólico de *C. duarteana* Cambess (Norte); EST + CDEN: estreptomicina em combinação com o extrato na concentração de  $\frac{1}{4}$  do MIC. Fonte: Próprio Autor, 2023.

**Tabela 4** – Classificação da interação entre a estreptomicina e a fração CDEN-AcOEt pelo método de Checkerboard frente ao *S. aureus* ATCC 912415.

Composto	MIC (mg/mL)	FIC	FICI	Classificação
EST	0,128			
EST combinado	<b>0,001</b> (MIC/128)	0,0078		
CDEN-AcOEt	0,125		0,0398	<b>Sinergismo</b>
CDEN-AcOEt combinado	<b>0,004</b> (MIC/32)	0,0320		

EST: estreptomicina; CDEN-AcOEt: fração acetato de etila do extrato etanólico de *C. duarteana* Cambess (Norte); FIC: *Fractional Inhibitory Concentration*; FICI: *Fractional Inhibitory Concentration Index*. Fonte: Próprio Autor, 2023.

O FICI é outro parâmetro que classifica a interação entre duas substâncias em antagonismo, indiferente, adição e sinergismo ( $FICI < 0,5$ ) (BALOIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). O sinergismo de compostos naturais combinado a estreptomicina foi descrito para componentes de óleos essenciais. O cinamaldeído (fenilpropanóide) apresentou efeito sinérgico com a estreptomicina contra *Listeria monocytogenes* ( $FICI = 0,312$ ) e *Salmonella enterica* Typhimurium ( $FICI = 0,375$ ), ilustrando que compostos fitoquímicos potencializam a ação desse antibacteriano (LIU, Q. *et al.*, 2015), similar ao encontrado no trabalho.

Ainda, Araújo e colaboradores (2014) reportaram que o extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) apresentou efeito sinérgico com a estreptomicina ( $FICI < 0,5$ ) contra as espécies *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, demonstrando que o extrato vegetal potencializou a ação da estreptomicina frente a tais espécies de gram-positivos.

Outro estudo avaliou o potencial antibacteriano e modulador de compostos isolados de *Morus alba* (Myrtaceae). O MIC da estreptomicina foi reduzido de 32 para 8  $\mu\text{g/mL}$  ( $FM = 4$ ) na presença do morusinol frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923; a combinação dos compostos foi sinérgica ( $FICI = 0,38$ ). Foi observado que a cepa passou de resistente para suscetível ( $MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$ ) segundo o *breakpoint* do CLSI para a estreptomicina (ZUO *et al.*, 2018). Tal achado converge com os resultados do presente estudo, onde as linhagens SA 4, SA 6 e SA 1199B NOR passaram a apresentar suscetibilidade à estreptomicina quando combinada com o extrato CDEN.

Diferente dos estudos de atividade antimicrobiana, o potencial modulador do gênero *Combretum* é pouco descrito na literatura, especialmente para a estreptomicina e norfloxacino. No entanto, os extratos de *Combretum kraussii* potencializaram a ação da penicilina para o *S. aureus*, sendo os melhores resultados com as frações aquosa ( $FICI = 0,04$ ) e acetato de etila ( $FICI = 0,05$ ) (CHUKWUJEKWU; STADEN, 2016). Extratos das folhas de *Combretum molle* apresentaram efeito modulador com estreptomicina, amicacina e cloranfenicol frente a gram-negativos multirresistentes (FANKAM; KUIATE; KUETE, 2015).

O aumento da resistência implica no aumento dos valores de MIC, por vezes inviabilizando o uso terapêutico de alguns antibacterianos. É descrito na literatura a toxicidade dos aminoglicosídeos em altas doses, com potencial ototoxicidade e nefrotoxicidade (MCDERMOTT *et al.*, 2021). Estudos reforçam que compostos fitoquímicos podem ser sinérgicos e potencializar a ação de fármacos antibacterianos,

requerendo uma menor concentração para inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Mais estudos comparativos de toxicidade são necessários para embasar o uso terapêutico de tais combinações farmacológicas (SUN *et al.*, 2020).

## 6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que espécies de *Combretum* possuem um relevante potencial farmacológico contra o patógeno *Staphylococcus aureus*. O perfil de suscetibilidade e a presença de determinados genes demonstrou a presença de mecanismos de resistência nas cepas, que restringem o uso de uma ou mais classes de antibacterianos. Os extratos de *Combretum* apresentaram diferenças na atividade anti-*S. aureus*, relacionados à espécie e suas variações geográficas, método de extração e cepas testadas. Apesar das diferenças, foi possível concluir que extratos das espécies *C. duarteanum* e *C. mellifluum* apresentaram atividade antibacteriana promissora (MICs < 1 mg/mL), incluindo frente aos *S. aureus* que expressam bombas de efluxo. Além disso, o extrato etanólico de *C. duarteanum* apresentou significativa ação sinérgica com a estreptomicina, despontando o potencial uso de fitoquímicos do gênero em terapias combinadas. São necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* que reforcem o potencial etnofarmacológico de espécies nativas de *Combretum*, apontando tais organismos como fonte promissora de novos compostos anti-*S. aureus*.

## REFERÊNCIAS

- ABEBE, Atakilt *et al.* Assessment on antioxidant activity of the aqueous leaf extracts of *Combretum microphyllum* and the effect of Co (II)-leaf extract complex on antibacterial activity of leaf extracts of the plant material. **Scientific African**, p. e01432, 2022.
- ALGAMMAL, Abdelazeem M. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3255-3265, 2020.
- ALSHEIKH, Hana Mohammed Al *et al.* Plant-based phytochemicals as possible alternative to antibiotics in combating bacterial drug resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 480, 2020.

AL-SHEREES, Hashim Ali Abdualmeer. Molecular Diagnosis of Aminoglycoside Transferase Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains. **Indian Journal of Natural Sciences**, v. 10, n. 58, p. 166-171, 2019.

ANOKWURU, Chinedu P. *et al.* Investigating antimicrobial compounds in South African Combretaceae species using a biochemometric approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113681, 2021.

ARAÚJO, Sthéfane G. *et al.* Volatile compounds of Lamiaceae exhibit a synergistic antibacterial activity with streptomycin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1341-1347, 2014.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BOSTANMANESHRADE, Arezoo *et al.* The Expression of Efflux Pump Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains Isolated from Blood Cultures in Iran. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, 2020.

BRAGA, Fernão Castro. Brazilian traditional medicine: historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 8, p. 44-50, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Gram positivos: *Staphylococcus* spp.** Brasília, 2008. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/objetivos.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm). Acesso em: 14 novembro 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resistência microbiana: mecanismos e impactos clínicos.** Brasília: ANVISA, 2007. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/gramp\\_staphylo.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm). Acesso em: 21 novembro 2022.

BURMAN, Sunanda *et al.* Antibacterial efficacy of leaf extracts of *Combretum album* Pers. against some pathogenic bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

BRCAS. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.** Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2021. Disponível em: <https://brcast.org.br/brazilian-committee-on-antimicrobial-susceptibility-testing-brcast/>. Acesso em: 10 abril 2023.

CABRAL, Analucia Guedes Silveira. **Constituintes químicos e atividade farmacológica de *Combretum duarteanum* Cambess. (Combretaceae).** 2013. 117 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa - PB, 2013.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. United States Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2019.

CHABÁN, Macarena Funes *et al.* Antibacterial effects of extracts obtained from plants of Argentina: Bioguided isolation of compounds from the anti-infectious medicinal plant *Lepechinia meyenii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 111930, 2019.

CHEN, Chih-Jung; HUANG, Yhu-Chering; SHIE, Shian-Sen. Evolution of multi-resistance to vancomycin, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing persistent bacteremia. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1414, 2020.

CHUKWUJEKWU, Jude C.; VAN STADEN, Johannes. In vitro antibacterial activity of *Combretum edwardsii*, *Combretum krausii*, and *Maytenus nemorosa* and their synergistic effects in combination with antibiotics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 208, p. 1-9, 2016.

CLSI. **CLSI M100-ED33:2023 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023. Disponível em: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED33:2023&sbssok=CLSI%20M100%20ED33:2023%20TABLE%20C&format=HTML#CLSI%20M100%20ED33:2023%20TABLE%20C>. Acesso em: 10 abril 2023.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Disponível em: [https://clsi.org/media/1632/m07a10\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf). Acesso em: 03 junho 2023.

CRUZ, Heron Walmor Santos. **Efeitos anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral do extrato bruto e frações de *Combretum duarceanum* Cambess.** Tese (Doutorado em Bioquímica Metabólica e Fisiológica) – Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto – MG, p. 48, 2021.

DADASHI, Masoud *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, n. 12, p. 96-103, 2018.

DENG, Hua; YU, Hongtao. New Antibiotics: where are they?. **Biomedical Journey of Scientific & Technical Research**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2018.

ELAISSI, Ameer *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen *Eucalyptus* species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman arboreta (North East Tunisia). **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3044-3057, 2012.

EL KARKOURI, Jamila *et al.* Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Cistus ladanifer* L. **Plants**, v. 10, n. 10, p. 2068, 2021.

ELOFF, Jacobus Nicolaas. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

FANKAM, Aimé G.; KUIATE, Jules R.; KUETE, Victor. Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartinianus* against Gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

FARIAS, Ruth Raquel Soares *et al.* Quimiodiversidade comparativa e potencial biológico de *Combretum duarteanum* Cambess. em duas regiões do Cerrado Piauiense. In: FARIAS, Ruth Raquel Soares (org.). **Quimiodiversidade de Plantas dos Cerrados Piauienses**. Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

FLORAO, Angela *et al.* Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a Proliferação de Linfócitos Humanos in vitro. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 215, 2007.

GHERARDI, Giovanni; DI BONAVENTURA, Giovanni; SAVINI, Vincenzo. Staphylococcal taxonomy. **Pet-to-Man Travelling Staphylococci**. Academic Press, p. 1-10, 2018.

GIBBONS, Simon; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet (K) determinant. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 14, n. 2, p. 139-140, 2000.

HAABER, Jakob; PENADÉS, José R.; INGMER, Hanne. Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 893-905, 2017.

HASHEMIZADEH, Zahra *et al.* Evaluation of aminoglycoside modifying enzymes, SCCmec, coagulase gene and PCR-RFLP coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in Shiraz, southwest of Iran. **Heliyon**, v. 8, n. 8, p. e10230, 2022.

HASSANZADEH, Sepideh *et al.* Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103850, 2020.

JANG, Soojin. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2016.

KATERERE, David R.; SERAGE, Andrew; ELOFF, Jacobus Nicolaas. Isolation and characterisation of antibacterial compounds from *Combretum apiculatum* subspecies *apiculatum* (Combretaceae) leaves. 2018.

KHAN, Rosina *et al.* Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 586-597, 2009.

KHOSRAVI, Azar Dokht; JENABI, Atefeh; MONTAZERI, Effat Abbasi. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 12, p. 587-593, 2017.

KORPINEN, Risto I. *et al.* Essential oils and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of Arctic Angelica (*Angelica archangelica* L.), marsh Labrador tea (*Rhododendron tomentosum*) and common tansy (*Tanacetum vulgare*) — chemical compositions and antimicrobial activities. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7121, 2021.

LASKOSKI, L. V. *et al.* Phytochemical prospection and evaluation of antimicrobial, antioxidant and antibiofilm activities of extracts and essential oil from leaves of *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

LEKSHMI, Manjusha *et al.* Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2018.

LIMA, Gedson Rodrigues *et al.* Bioactivities of the genus *Combretum* (Combretaceae): a review. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9142-9206, 2012.

LIMA, Idglan Sá de *et al.* Antibacterial and Healing Effect of Chicha Gum Hydrogel (*Sterculia striata*) with Nerolidol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2210, 2023.

LI, Yu *et al.* Anticancer and antibacterial flavonoids from the callus of *Ampelopsis grossedentata*; a new weapon to mitigate the proliferation of cancer cells and bacteria. **RSC Advances**, v. 12, n. 37, p. 24130-24138, 2022.

LIU, Dongyou. Enterotoxin-producing *S. aureus*. **Molecular Medical Microbiology**. Academic Press, p. 979-995, 2015.

LIU, Q. *et al.* Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 421-430, 2015.

LIU, Wan-Ting *et al.* Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, n. 104915, 2021.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

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.

MAHONEY, Andrew R. *et al.* The silent pandemic: emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. **Isience**, v. 24, n. 4, p. 102304, 2021.

MARQUARDT, Peter *et al.* Phytochemical characterization and in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity of *Combretum collinum* Fresen leaves extracts from Benin. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 288, 2020.

MCDERMOTT, John Henry *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for the use of aminoglycosides based on MT-RNR1 genotype. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 2, p. 366-372, 2022.

MCGUINNESS, Will A.; MALACHOWA, Natalia; DELEO, Frank R. Focus: infectious diseases: vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 269-281, 2017.

MILLANAO, Ana R. *et al.* Biological effects of quinolones: a family of broad-spectrum antimicrobial agents. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7153, 2021.

MORADI, F.; HADI, N.; BAZARGANI, A. Evaluation of quorum-sensing inhibitory effects of extracts of three traditional medicine plants with known antibacterial properties. **New Microbes and New Infections**, v. 38, p. 100769, 2020.

MTUNZI, Fanyana M. *et al.* Solvent–solvent fractionations of *Combretum erythrophyllum* (Burch.) leave extract: Studies of their antibacterial, antifungal, antioxidant and cytotoxicity potentials. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 7, p. 670-679, 2017.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

NGUEDIA, Assob Jules Clement; SHEY, Nsagha Dickson. African medicinal plant derived products as therapeutic arsenals against multidrug resistant microorganisms. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 6, n. 5, p. 59-69, 2014.

OKWU, Maureen U. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. **AIMS microbiology**, v. 5, n. 2, p. 117, 2019.

OLIVEIRA, Genil Dantas de *et al.* Synergistic and Antibiofilm Effects of the Essential Oil from *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 1, p. 55, 2023.

OLIVEIRA JÚNIOR, João Dias de. **Caracterização fenotípica e genotípica da resistência a aminoglicosídeos em *Staphylococcus aureus* hospitalares isolados no Estado da Paraíba**. 2003. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2003.

OPAS. **Américas notificam aumento de infecções resistentes a medicamentos devido ao uso indevido de antimicrobianos durante pandemia**. OPAS, 2021.

Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/17-11-2021-americas-notificam-aumento-infeccoes-resistentes-medicamentos-devido-ao-uso>. Acesso em: 21 novembro 2022.

PRASAD, Malini A.; ZOLNIK, Christine P.; MOLINA, Jeanmaire. Leveraging phytochemicals: the plant phylogeny predicts sources of novel antibacterial compounds. **Future Science OA**, v. 5, n. 7, p. FSO407, 2019.

RAO, Sangeeta *et al.* Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* collected from livestock, poultry and humans. **One Health**, v. 15, n. 100407, 2022.

SADEEK, Alaa MM; ABDALLAH, Emad M. Phytochemical Compounds as Antibacterial Agents: a mini review. **Global Journey of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 7(4): 555720, 2019.

SANTOS, Maria O. *et al.* Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 2767-2779, 2018.

SELIM, Samy *et al.* Incidence of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains among Patients with Urinary Tract Infections. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 408, 2022.

SHARIATI, Aref *et al.* Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.

SILÉN, Heidi *et al.* Ethnopharmacology, Antimicrobial Potency, and Phytochemistry of African *Combretum* and *Pteleopsis* Species (Combretaceae): A Review. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 264, 2023.

SINGH, Utkarsha A.; KUMARI, Mukta; IYENGAR, Soumya. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. **Biological Procedures Online**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2018.

SMITH, Eileen CJ *et al.* The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4480-4483, 2007.

SUN, Fengqi *et al.* 5-Methylindole potentiates aminoglycoside against gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus* persists under hypoionic conditions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 84, 2020.

TAYLOR, Tracey A.; UNAKAL, Chandrashekhar G. ***Staphylococcus aureus***. StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>. Acesso em: 14 novembro 2022.

TOLTZIS, Philip. *Staphylococcus epidermidis* and Other Coagulase-Negative *Staphylococci*. **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. p. 706-712.e4. Elsevier, 2018.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

UC-CACHÓN, Andrés Humberto et al. Antibacterial and antibiofilm activities of Mayan medicinal plants against Methicillin-susceptible and-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, p. 114369, 2021.

UKUHOR, Hyacinth O. The interrelationships between antimicrobial resistance, COVID-19, past, and future pandemics. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 53-60, 2021.

WHO. **Antimicrobial resistance**. WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=What%20is%20antimicrobial%20resistance%3F,spread%2C%20severe%20illness%20and%20death>. Acesso em: 14 novembro 2022.

ZUO, Guo-Ying *et al.* Synergism of prenylflavonoids from *Morus alba* root bark against clinical MRSA isolates. **Phytomedicine**, v. 39, p. 93-99, 2018.