



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

IVANILDE CARMO DOS SANTOS

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato aquoso de *Eugenia
dysenterica* contra *Staphylococcus aureus***

Barreiras – BA

2023

IVANILDE CARMO DOS SANTOS

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* contra *Staphylococcus aureus*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do Oeste da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia
Vieira Prudêncio

Barreiras – BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Ivanilde Carmo dos.

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* contra *Staphylococcus aureus*. / Ivanilde Carmo dos Santos – 2023.

24f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Vieira Prudêncio.

Artigo (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2023.

1. Antibactericida. 2. *Eugenia dysenterica*. 3. Antibiofilme. I. Prudêncio, Cláudia Vieira. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 615.19

Biblioteca Central de Barreiras - UFOB



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA



ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

No dia 27 de julho de 2023, às 15:00 hs., na sala PU 18 da Universidade Federal do Oeste da Bahia, realizou-se a apresentação pública do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado: “Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* contra *Staphylococcus aureus*” apresentado pela acadêmica Ivanilde Carmo dos Santos. Integraram a composição dos Membros da Banca Examinadora, Profa. Dra. Cláudia Vieira Prudêncio (orientadora), Dr. Flávio Santos Lopes (examinador 1), Prof. Dr. Arlindo Gomes de Macedo Junior (examinador 2), e Dra Deisy Guimarães Carneiro (examinador(a) 3). Após declarada aberta a sessão, pelo Profa. Dra. Cláudia Vieira Prudêncio (orientadora), na função de Presidente da Banca Examinadora, coube ao acadêmico, na forma regimental, expor o tema do TCC, e na sequência receber comentários e questionamentos pelos membros da Banca Examinadora dando as explicações que se faziam necessárias. Posteriormente, os membros da Banca Examinadora reuniram-se, isoladamente, para a avaliação e parecer final, tendo atribuído as seguintes notas:

Membros da Banca Examinadora	Nota
Profa. Dra. Cláudia Vieira Prudêncio	9,3
Dr. Flávio Santos Lopes	9,2
Prof. Dr. Arlindo Gomes de Macedo Junior	9,5
Dra Deisy Guimarães Carneiro	9,9
Média final:	9,5

Barreiras, 27 de julho de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br CLAUDIA VIEIRA PRUDENCIO
Data: 27/07/2023 19:11:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professor orientador(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br Arlindo Gomes de Macedo Junior
Data: 28/07/2023 10:49:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador(a) 2

Documento assinado digitalmente
gov.br FLAVIO SANTOS LOPES
Data: 27/07/2023 19:16:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador(a) 1

Deisy Guimarães Carneiro

Examinador(a) 3

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sempre esteve comigo nessa caminhada. Sempre me guiando e auxiliando nas minhas tomadas de decisões, e me dando forças para superar todos os obstáculos que surgiam.

Aos meus pais, irmãos, e familiares pelo incentivo e todo suporte, por sempre estarem comigo e nunca me desampararem, sempre me darem forças e nunca me deixarem desistir.

Aos meus amigos, pelo apoio incondicional, que me acompanharam nesta jornada, sempre me orientaram e me deram força para sempre continuar.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Cláudia Vieira Prudêncio pela paciência, parceria e ensinamentos.

A todo meu grupo de pesquisa pelo período de convivência e compartilhamento de conhecimento nesse período.

Aos examinadores, pela disponibilidade de avaliarem o meu trabalho.

Ao corpo docente da UFOB pela minha formação acadêmica e humana.

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* contra *Staphylococcus aureus*

Santos I. Carmo¹, Prudêncio C. Vieira¹

¹ Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras (BA), Brasil.

Título abreviado – Atividade antibiofilme de *E. dysenterica*

Autor correspondente:

Cláudia Vieira Prudêncio, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Rua da Prainha, 1326, Morada Nobre, Barreiras, 47810-047, Bahia, Brasil.

E-mail: claudia.prudencio@ufob.edu.br

Phone: + 55 77 3614 3112

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*
contra *Staphylococcus aureus***

Resumo

Objetivos: Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de extrato de *Eugenia dysenterica* contra *Staphylococcus aureus*.

Métodos e resultados: A concentração mínima inibitória (CMI) foi avaliada em microplacas com extrato de *E. dysenterica* nas concentrações entre 19 e 10.000 µg/mL. A concentração mínima bactericida (CMB) foi avaliada por plaqueamento. Já os ensaios de viabilidade foram realizados com cupons de poliestireno, em que a contagem de células sésseis viáveis (CCSV) foi feita após sonicação dos cupons. A resistência de biofilme foi avaliada por meio CCSV após exposição a composto clorado. O extrato de *E. dysenterica* demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, com CMI de 156 e 313 µg/mL, e CMB de 313 e 625 µg/mL. A atividade antibiofilme também foi observada, em presença de concentrações inibitórias e subinibitórias. Mesmo quando a CCSV era similar, o extrato reduziu a resistência do biofilme a compostos clorados.

Conclusão: O extrato de *E. dysenterica* reduziu o crescimento e a formação de biofilme de *S. aureus*, além de promover maior sensibilidade do biofilme à compostos clorados.

Significado e impacto do estudo: O potencial antimicrobiano e antibiofilme do extrato de *E. dysenterica* pode auxiliar no controle de *S. aureus*, em diferentes áreas como indústria alimentícia e médica.

Palavras chave: Biofilme, Extratos vegetais, Antimicrobianos naturais.

Introdução

Staphylococcus aureus é uma bactéria encontrada na mucosa e pele de animais, inclusive humanos (Pal *et al.* 2020). Este micro-organismo atua como agente etiológico de diversas patologias, com gravidade variável, tais como espinhas, abscessos cutâneos, pneumonia, infecções do sistema nervoso central, infecções relacionadas a dispositivos médicos, septicemia, endocardite infecciosa, osteomielite, artrite séptica e fascite necrosante (Jenul e Horswill 2019; Schilcher e Horswill 2020; Tigabu e Getaneh 2021). A diversidade de infecções relacionadas ao micro-organismo, assim como sua prevalência e o desenvolvimento de estirpes multirresistentes aos antimicrobianos sugerem que este patógeno pode representar uma ameaça para a saúde pública (Pal *et al.* 2020).

Além disso, esta bactéria apresenta a capacidade de produção de biofilme, o que representa um importante fator de virulência e resistência bacteriana (Schilcher e Horswill 2020). Biofilmes são conceituados como uma forma de organização em que as células planctônicas são adaptadas para a forma sésil, por meio da modulação de genes que induzem a produção de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (Balducci *et al.* 2023). Essa matriz é composta por proteínas, carboidratos, lipídeos e DNA extracelular secretados pelos micro-organismos (Schilcher e Horswill 2020; Balducci *et al.* 2023).

Assim, a matriz de SPE envolve os micro-organismos vivos e mortos, o que favorece a troca de genes de resistência entre as células que compõe o biofilme, e a resistência ao sistema imune do hospedeiro e a ação de agentes antimicrobianos, como antibióticos e sanitizantes (Maia 2020; Schilcher e Horswill 2020). Nesse contexto, a formação de biofilme por *S. aureus* é uma preocupação em ambiente hospitalar e na indústria de alimentos (Pal *et al.* 2017; Miao *et al.* 2019). A contaminação de dispositivos médicos, como cateteres e próteses de pacientes em ambiente hospitalar está diretamente relacionada a cronificação de infecções, e eleva de forma significativa os índices de morbidade e mortalidade dos indivíduos acometidos

(Moormeyer e Bayles 2017; Achmit *et al.* 2021). Na indústria alimentícia, a capacidade de formação de biofilme também representa uma preocupação por favorecer a disseminação da bactéria em diferentes produtos, o que associado a sua capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis, aumenta o risco da ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DVA) (Pal 2020; Mourenza *et al.* 2021).

Por outro lado, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana por *S. aureus* também merece destaque (Jenul e Horswill 2019). Diversas cepas do micro-organismo, resistentes antimicrobianos já foram identificadas, como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) e *S. aureus* resistente a oxacilina (ORSA) (Breves *et al.* 2015; WU *et al.* 2019; Nobre *et al.* 2021). Por isso, *S. aureus* é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um micro-organismos de alta prioridade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO 2017).

Neste cenário, a busca por antimicrobianos de origem natural tem sido estimulada, devido ao seu menor custo, vasta composição química, reconhecida capacidade de absorção e metabolização pelo organismo, além de baixa incidência de efeitos adversos (Calixto 2003; Battacharya e Haldar 2013; Martinez, Catalán e Mol, 2020). Neste sentido, a biodiversidade brasileira se revela como uma rica fonte de espécies de plantas para estudo de novos compostos, especialmente em biomas ainda menos conhecidos, como o Cerrado (Valli *et al.* 2019).

Apesar de ser o segundo maior da América do Sul e um celeiro de produtos naturais, o potencial das espécies vegetais do Cerrado ainda é pouco conhecido (Valli *et al.* 2019; Belém *et al.* 2021). Alguns estudos indicam o potencial antimicrobiano de espécies como *Mauritia flexuosa*, contra *Escherichia coli* e *S. aureus*, e *Croton betaceus* contra *Enterococcus faecalis* (Nobre *et al.* 2018; Rocha *et al.* 2021). Todavia outras potenciais atividades biológicas, como a inibição de biofilmes ainda são pouco conhecidas.

Neste cenário, *Eugenia dysenterica* é uma espécie frutífera da família Myrtaceae. É nativa do cerrado e conhecida popularmente como “cagaita”, com potencial para atividade econômica, em função da possibilidade de uso na alimentação (Rocha *et al.* 2020). Além disso sua casca, folhas e frutos apresentam propriedades medicinais (Silva, Chaves e Naves 2001). É uma planta de características rústicas e resistência a condições desfavoráveis como solo com pouco nutrientes e baixo regime de chuva, além de apresentar tolerância ao fogo (Souza, Naves e Oliveira 2013).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho, foi avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme de *Eugenia dysenterica* contra *S. aureus*.

Materiais e métodos

Micro-organismos e condições de crescimento

As cepas de referência de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213, com capacidade de produção de biofilme reconhecida na literatura (Nair *et al.*, 2016; Hiltunen *et al.*, 2019), foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Kasvi, Itália) a 35 ± 2 °C por 24 h. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, lavadas e ressuspensas em solução salina 0,85%. Estoques das culturas eram mantidas no mesmo meio acrescido de glicerol e armazenadas a -20 °C.

Preparo do extrato

O extrato aquoso foi preparado com folhas *E. dysenterica* conforme a metodologia adaptada de Cercato *et al.* (2016). Assim, o material vegetal pulverizado a partir das folhas foi misturado com água destilada na proporção 10:1 (m/v), sendo mantido em infusão por 15 minutos. Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado em algodão e evaporado em chapa aquecedora sob temperatura de 100 °C até um baixo volume. O material remanescente foi

congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizado. O extrato liofilizado foi armazenado em frascos de vidros e mantido em dessecador sob refrigeração ($7 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento da solubilização.

Para solubilização o extrato era ressuspenso em água destilada estéril, para a concentração a ser utilizada, por peso /volume.

Análise da atividade antimicrobiana do extrato contra S. aureus

O efeito antimicrobiano do extrato foi avaliado em microplacas de poliestireno com 96 poços (Kasvi, Itália) em caldo Triptona de Soja (TSB – Kasvi, Itália). Cada cultura foi adicionada de inóculo em 10%, com população de $5 \log_{10}$ UFC/mL. O extrato foi adicionado em concentrações entre 19 e 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Como controle foi utilizado água destilada estéril (Kragh *et al.* 2019).

Para selagem das placas foi utilizada película adesiva transparente (Sigma Aldrich, EUA). As placas foram incubadas a $35 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em leitor de microplacas modelo Varioskan Lux multimode reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), por 24 h, com leituras a cada 15 min a 600 nm.

Após a incubação, alíquotas de 15 μL de cada poço foram plaqueadas em ágar padrão de contagem (PCA - Kasvi, Itália) para avaliação de crescimento. As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 h. A menor concentração de extrato em que não foi observado crescimento foi utilizada como concentração mínima bactericida (CMB).

Para avaliação de biofilme, o conteúdo das microplacas era descartado, seguido da adição de 250 μL de cristal violeta (0,1%) por 30 minutos. Os poços foram lavados 3 vezes cada com 250 μL de água destilada e secos a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Posteriormente, o material era ressuspenso em etanol 95%. A absorbância foi mensurada em leitora de microplaca modelo Varioskan Lux multimode reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a 590 nm (Stepanovic *et al.* 2007).

Os dados foram avaliados pela variação de densidade óptica (DO), com base na diferença entre o valor de cada tempo e o valor inicial. Foram realizadas 4 repetições independentes. Os dados foram analisados em experimento fatorial 2x2, para avaliação da influência da concentração e da cepa sobre os resultados observados. A existência de diferenças foi avaliada com uso do teste de Tukey ao nível de significância de 0,05, com auxílio do programa AgroEstat, versão 1.10.712.

Avaliação do efeito antimicrobiano do extrato sobre biofilmes em cupons de poliestireno

Cupons de poliestireno de 10 x 10 x 1 mm foram higienizados com água e detergente neutro. Após enxague abundante, os cupons eram imersos em etanol por 1 h para remoção de gorduras. Posteriormente, os cupons foram enxaguados 3 vezes com água esterilizada e colocados sob luz ultravioleta por 30 min de cada lado (Andre *et al.* 2019).

Em microplacas de 24 poços, os cupons foram adicionados em caldo TSB, acrescido de concentrações inibitórias e subinibitórias de extrato de *E. dysenterica*. Para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foram utilizadas concentrações entre 1.250 a 78 µg/mL e para a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 foram utilizadas concentrações entre 2.500 a 156 µg/mL. Cada cultura era adicionada em população de 5 log₁₀ UFC/mL. Como controle foi utilizado água destilada estéril. As microplacas foram seladas com película adesiva (Sigma Aldrich, EUA) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação, os cupons eram removidos, lavados 3 vezes com solução salina 0,85% para remoção de células planctônicas, e adicionados a tubos com 20 mL de solução salina. Para remoção de células aderidas os cupons eram submetidos à sonicação a frequência de 45 Hz por 30 minutos e agitação em vortex a 2500 rpm por 3 minutos .

A quantificação de células foi realizada pela coleta de alíquotas que foram plaqueadas em ágar PCA (Kasvi, Itália) em triplicata pela técnica de microgotas (Morton, 2001). As placas

eram incubadas a 35 ± 2 °C por 12 h para contagem de colônias. As células planctônicas foram avaliadas da mesma forma pela coleta de alíquotas do meio de cultura.

Foram realizadas 4 repetições independentes e as diferenças foram avaliadas com uso do programa AgroEstat, versão 1.10.712, e o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Avaliação da resistência do biofilme à composto clorado

A formação do biofilme foi realizada em cupons de poliestireno incubados em microplaca de 24 poços com caldo TSB (Kasvi, Itália) acrescido ou não de extrato de *E. dysenterica* na concentração determinada pelos resultados do ensaio anterior.. A cultura de *S. aureus* ATCC 25923 foi inoculada na população de $5 \log_{10}$ UFC/mL. A microplaca foi fechada com película adesiva e incubada como descrito anteriormente.

Após a incubação, os cupons eram retirados, lavados com solução salina e adicionados a 10 mL de solução clorada a 200 mg/L (Dicloroisocianurato de sódio sódio, Sumaveg®, Diversey™ Brasil) por diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15 e 30 minutos) (Von Hertwig *et al.* 2022). Ao final de cada tempo, o cupom foi removido e adicionado em 5 ml de solução salina a 0,85% acrescida de 1% de tiosulfato de sódio pelo tempo mínimo de 6 minutos para neutralização do sanitizante (Von Hertwig *et al.* 2022).

Posteriormente, os cupons eram transferidos para tubos com 20 mL de solução salina, e submetidos ao mesmo procedimento para enumeração de células aderidas. Os dados foram avaliados pela variação do número de células sésseis $\text{UFC}/\text{cm}^2_f - \text{UFC}/\text{cm}^2_i$, em que UFC/cm^2_f corresponde ao número determinado em cada tempo e UFC/cm^2_i , corresponde ao número inicial, sem exposição ao composto clorado. Foram realizadas 3 repetições independentes e as diferenças foram avaliadas por análise de variância ANOVA com uso do programa AgroEstat, versão 1.10.712, e o teste de *Tukey*, com nível de significância de 5%.

Resultados

Atividade antimicrobiana e antibiofilme contra S. aureus

O crescimento das culturas em ausência do extrato foi similar (Tabela 1). O extrato aquoso de *E. dysenterica* apresentou atividade antimicrobiana contra ambas as cepas de *S. aureus*, embora com distintos valores de concentração mínima inibitória (CMI) (Tabela 1). A cepa *S. aureus* ATCC 25923 demonstrou maior sensibilidade ao exibir menores valores de CMI e CMB (concentração mínima bactericida), a saber, 156 e 313 µg/mL, respectivamente. Enquanto que a cepa *S. aureus* ATCC 29213 exibiu CMI e CMB de 313 e 625 µg/mL, respectivamente (Tabela 1). Mesmo quando foi observado crescimento, a densidade máxima atingida pela população de ambas as cepas era significativamente menor que em ausência de extrato, o que reforça a existência de atividade antimicrobiana no mesmo.

Tabela 1 Densidade óptica máxima de culturas de *S. aureus* em caldo TSB com presença ou ausência de extrato de *E. dysenterica* em microplacas de 96 poços e número de poços positivos para crescimento em placas de ágar padrão de contagem, incubadas a 35 °C por 24 h.

Concentração (µg/ml)	Densidade óptica máxima (600 nm)		Crescimento em PCA (n° de poços com crescimento)	
	ATCC 25923 / ATCC 29213		ATCC 25923 / ATCC 29213	
10000	0,0890dA	0,1110cdeA	0	0
5000	0,0990dA	0,1840bcdB	0	0
2500	0,1380cdA	0,0760deA	0	0
1250	0,0197dA	0,0267eA	0	0
625	0,0080dA	0,0180eA	0	3
313	0,0160dA	0,0880deA	1	13
156	0,0700dA	0,2310bcB	15	16
78	0,2370bcA	0,2510bA	16	16
39	0,3090bA	0,3080bA	16	16
19	0,2660bcA	0,2850bA	16	16
0	0,4730aA	0,4950aA	16	16

*^{a-c}: Médias seguidas por uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey a 0,05; ^{A-B}: Médias seguidas por uma mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey a 0,05. O número mínimo e máximo de poços são 0 e 16 respectivamente.

A capacidade de formação de biofilme foi similar entre as duas cepas ($p=0,33$), com valores de 0,614 nm e 0,594 nm para as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213, respectivamente. A adição de extrato de *E. dysenterica* desencadeou efeitos distintos, a depender da concentração. Nas menores concentrações, em que foi observado crescimento microbiano a formação de biofilme foi similar ao controle (Tabela 2). Naquelas condições em que houve inibição do crescimento microbiano foi observada também atividade antibiofilme (Tabela 2).

Tabela 2 Biofilme de culturas de *S. aureus* em caldo TSB com presença ou ausência de extrato de *E. dysenterica* em microplacas de 96 poços incubadas a 35 °C por 24 h.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Densidade óptica (590 nm)
10.000	0,3419c
5.000	0,3512c
2.500	0,4011c
1.250	0,4105c
625	0,5754b
313	0,7481a
156	0,7479a
78	0,6951ab
39	0,7330a
19	0,8026a
0	0,8377a

*a-c: Médias seguidas por uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey a 0,05.

Desta forma, foram escolhidas as concentrações inibitórias e subinibitórias de cada cepa para realização dos ensaios de viabilidade. Assim, para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foram utilizadas as concentrações entre 78 e 1.250 µg/mL e para a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 foram utilizadas concentrações entre 156 e 2.500 µg/mL.

Os ensaios de viabilidade confirmaram os resultados obtidos (Tabela 3). A adição de extrato de *E. dysenterica* reduz o número de células planctônicas de ambas as cepas de *S. aureus* ($p < 0,0001$), tendo sido observado uma CMB de 313 µg/mL para ambas as cepas (Tabela 3). Em relação ao número de células sésseis, as cepas exibiram resultados distintos. Curiosamente, a cepa *S. aureus* ATCC 29213 demonstrou maior sensibilidade, pois a formação de biofilme foi inibida em quaisquer das concentrações de extrato utilizadas. Já a cepa *S. aureus* ATCC 25923 exibiu formação de biofilme similar ao controle apenas na menor concentração utilizada (78 µg/mL). Assim, mesmo concentrações subinibitórias do extrato demonstraram reduzir a viabilidade das células sésseis contra ambas as cepas de *S. aureus*.

Tabela 3 Quantidade de células planctônicas e sésseis em cupons de poliestireno de *S. aureus* em TSB com presença ou ausência de extrato de *E. dysenterica* após 24 h incubada a 35 °C.

Concentração (µg/mL)	Células planctônicas (Log UFC/mL)		Células sésseis (Log UFC/cm ²)	
	ATCC 25923	ATCC 29213	ATCC 25923	ATCC 29213
2500	-	< 1,70c	-	<2,70b
1250	< 1,70d	< 1,70c	<2,70b	<2,70b
625	< 1,70d	< 1,70c	<2,70b	<2,70b
313	< 1,70d	< 1,70c	<2,70b	<2,70b
156	5,33c	4,76b	<2,70b	<2,70b
78	8,62b	-	5,67a	-
0	9,21a	9,18a	6,03a	7,10a

*a-c: Médias seguidas por uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey a 0,05.

Os ensaios de resistência à compostos clorados demonstram uma rápida atividade do produto sobre o biofilme, pois mesmo nos cupons expostos por segundos, foi observada uma redução da viabilidade de células sésseis (Fig 1). Em presença de pequenas concentrações de extrato de *E. dysenterica*, a quantidade de células sésseis foi similar ao controle, mas há uma menor resistência deste biofilme, observada pela ausência de crescimento já nos primeiros tempos de plaqueamento (p=0,006).

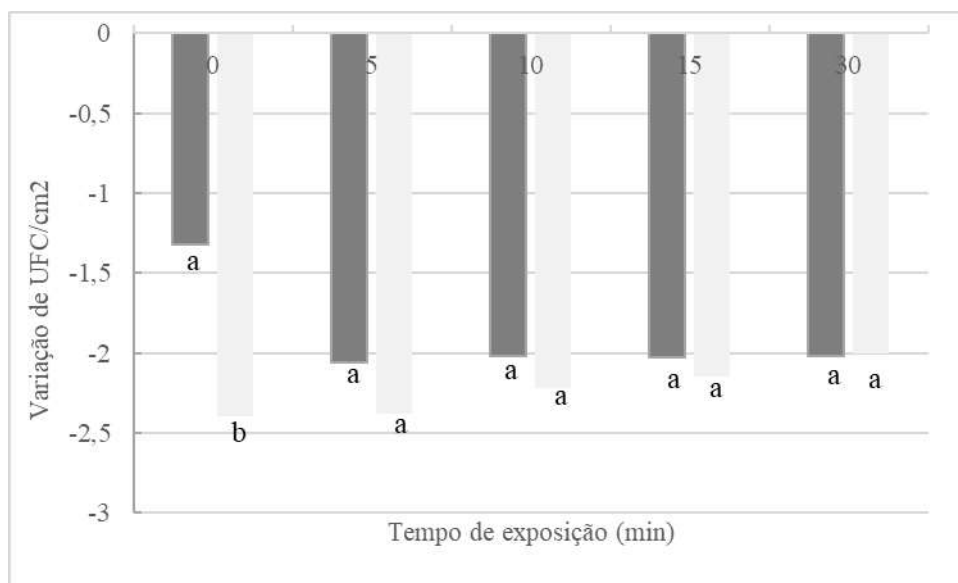


Figura 1 Variação da população de células sésseis viáveis de *S. aureus* em cupons de poliestireno em TSB com ausência (■) ou com presença (□) de extrato aquoso de *E. dysenterica* a 35 °C por 24 h, após exposição a composto clorado (200ppm). *a-b: Médias seguidas por uma mesma letra em cada tempo não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey a 0,05.

Discussão

A urgente necessidade de desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, advém da crescente ameaça à saúde humana, representada pelo aumento da resistência de micro-organismos patogênicos aos antibióticos disponíveis (Martínez, Catalán e Micol 2020). A formação de biofilme é um fator de virulência importante, pois favorece uma maior resistência dos micro-organismos, o que compromete a eficácia dos antibióticos disponíveis (Tigabu e Getaneh 2021). Neste contexto, *S. aureus*, além de ser o agente etiológico de patologias que pode ameaçar a vida do indivíduo contaminado, tem desenvolvido diversos mecanismos de resistência, como por exemplo a produção de enzimas contra linezolida, a proteção ativa do local alvo farmacológico das drogas, a síntese de beta-lactamase contra beta-lactâmicos e o

efluxo ativo de drogas bacterianas (Tahaei *et al.* 2021; Tigabu e Getaneh 2021; Bonikosva *et al.* 2022).

Neste cenário, a síntese e o desenvolvimento de novos compostos sintéticos enfrenta desafios como o longo período de tempo e os altos custos (Guimarães *et al.* 2010). Assim, a busca de antimicrobianos de origem natural tem ganhado destaque por permitir reduzir o custo de produção de novas substâncias, otimizar o tempo de pesquisa e ampliar as possibilidades terapêuticas para combate a micro-organismos resistentes (Guimarães *et al.* 2010).

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais foi demonstrada pelos nossos resultados, em que o extrato de *E. dysenterica* exibiu atividade antibacteriana contra células planctônicas e sésseis de diferentes cepas de *S. aureus* (Tabelas 1-3). A existência deste potencial em plantas da família *Eugenia*, já foi previamente relatada em outro estudo, em que o extrato aquoso de *Eugenia involucrata* apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*, embora com CIM maior que nossos resultados, a saber 50.000 µg/mL para ambos micro-organismos (Toledo *et al.* 2023). Outro exemplo, foi o estudo de Simonetti *et. al* (2016), em que o extrato etanólico de *Eugenia anomala* exibiu atividade antimicrobiana contra *E. coli*, com CIM de 2.500 µg/mL e CBM de 10.000 µg/mL. A atividade antifúngica também já foi exibida pelo óleo essencial de *E. dysenterica*, em que foi observada inibição de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatii*, com CIM inferior a 250 µg/mL para ambos os micro-organismos (Costa 2000). Estes dados reforçam a relevância do estudo de espécies deste gênero como potenciais candidatas ao desenvolvimento de compostos com atividade contra patógenos de importância a saúde humana.

Dados da literatura revelam resultados diversos sobre a atividade antimicrobiana de *E. dysenterica* contra *S. aureus*. Enquanto Costa *et al.* (2000) não observaram atividade, com uso de extrato de *E. dysenterica*, Oliveira *et al.* (2017) observaram CMI de 42,1 µg/mL com uso do óleo essencial. A existências de diferenças em relação a atividade de materiais de uma mesma

espécie pode ser relacionada às características como a origem da planta, o período de realização da coleta, métodos de extração, concentrações utilizadas, além de características distintas das cepas do micro-organismo utilizado (Fennel *et al.* 2004; Alves 2008).

A atividade antimicrobiana de *E. dysenterica* pode estar associada a presença de metabólitos como compostos fenólicos, tais como catequina e quercetina, além de sesquiterpenos, saponinas e taninos (Sousa 2008; Coutinho *et al.* 2015; Thomaz *et al.* 2018). Tais compostos apresentam atividade antimicrobiana com diferentes mecanismos, que em muitos casos estão presentes nas plantas com a função de defesa contra predação de insetos e microrganismos (Spletzer 2021). Neste sentido, uma das possibilidades de mecanismos para a ação antimicrobiana envolve a ocorrência de danos na membrana celular, relacionada a atividade de flavonoides, como as catequinas, as quais são intercaladas entre os lipídeos da membrana do micro-organismo, o que poderia causar uma ruptura mecânica (Tsuchiya 2001, WU e Brown 2021).

No entanto, apesar do potencial de atividade antimicrobiana de diversas espécies vegetais há poucos dados sobre a atividade antibiofilme de espécies do Cerrado, especialmente biofilmes de *S. aureus*. Mas o potencial antibiofilme já foi observado em espécies do mesmo gênero, como por exemplo *Eugenia pyriformis*, cujo extrato aquoso e etanólico reduziram biofilme de *Streptococcus mutans* em 95,74 e 93,25%, respectivamente (Soares 2017). Outro exemplo foi observado no trabalho de Sardi *et al.* (2017), em que os extratos etanólicos de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia leitonii* demonstraram atividade antibiofilme contra *Candida albicans*.

Por outro lado, outro ponto importante, é a utilização de mais de uma metodologia para busca de potenciais atividades biológicas, sendo este um diferencial do nosso estudo. A análise de biofilmes em microplacas de poliestireno com coloração em cristal violeta, é uma técnica amplamente utilizada e eficiente para avaliação da massa total do biofilme produzido, mas não

fornece dados sobre a viabilidade celular destes biofilmes (O'Toole 2011, Kadam *et al.* 2013). Nossos dados permitem observar uma menor viabilidade celular, mesmo em condições de boa formação de biofilme (Tabelas 2 e 3), o que sugere que o biofilme formado em microplaca, ao menos parcialmente, possa ser devido à presença de células mortas (Kadmam *et al.* 2013, Kragh *et al.* 2019).

A análise de resistência dos biofilmes também é uma característica relevante, especialmente a compostos amplamente utilizados, como os compostos clorados (Rossoni E Gaylarde 2000, Banach *et al.* 2018). A boa eficiência destes compostos já foi relatada na literatura, como verificado por Melo *et al.* (2014), ao analisarem o efeito do hipoclorito de sódio (150 mg/L) contra *S. aureus*, pois após 10 minutos de exposição já não era observada viabilidade de células sésseis. Neste sentido, nossos dados revelam que a presença do extrato de *E. dysenterica* reduz também a resistência do biofilme (Fig 1).

Assim, torna-se importante a continuidade do estudo da bioatividade de plantas de biomas pouco conhecidos como o Cerrado, especialmente com uso de partes renováveis da planta como folhas e frutos. Tais estratégias além de revelar novos potenciais com aplicação em distintas áreas podem contribuir também com a valorização das espécies e a sua preservação (Arruda, 2022). Outro ponto importante é o isolamento dos compostos ativos da espécie, além de estudos contra outros micro-organismos.

Conflito de interesses

Não há conflitos de interesse a declarar.

Referências

- Achmit M, Aoussar N, Mellouki F, Ait Mhand R, Ibáñez MD, Blázquez MA, Akssira M, Zerouali K & Rhallabi N (2021). In vitro antibacterial and biofilm inhibitory activity of the sawdust essential oil of *Tetraclinis articulata* (vahl) against catheter-associated *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr. Res. Biotechnol*, 3(3), 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.12.001>
- Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha W R & Martins CHG (2008). Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quím. Nova*, 31(5), 1224–1229. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000500052>
- Andre C, Jesus PFN, Almeida CPM., & Vanetti MCD. (2019). Changes in the composition and architecture of staphylococcal biofilm by nisin. *Braz. J. Microbiol.*, 50(4), 1083–1090.
<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00135-w>
- Arruda HS, Araújo MVL, & Marostica Junior MR. (2022). Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food Chem: Molecular Sciences*, 5(100148), 100148. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100148>
- Balducci E, Papi F, Capialbi DE & Del Bino L. (2023). Polysaccharides, Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. *Int. J. Mol. Sci*, 24(4), 4030. <https://doi.org/10.3390/ijms24044030>
- Banach, JL, van Overbeek LS, Nierop Groot MN, van der Zouwen PS & van der Fels-Klerx HJ (2018). Efficacy of chlorine dioxide on *Escherichia coli* inactivation during pilot-scale fresh-cut lettuce processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 269(128), 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.013>

Belém GM, Cardoso Filho O, Fonseca FSA & Duarte ER (2021). Plantas do cerrado com atividade antimicrobiana: uma revisão sistemática da literatura. *Res. Soc. Dev.* 10(16), e07101622753. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i16.22753>

Bhattacharya S & Haldar PK (2013). The triterpenoid fraction from *Trichosanthes dioica* root suppresses experimentally induced inflammatory ascites in rats. *Pharm. Biol.* 51(11), 1477–1479. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.795176>

Bonikowska MB, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, & Marusza W (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci* 23(15), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>

Breves A, Miranda CAC, Flores C, Filippis I de, & Clementino MM (2015). Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 51(3), 143–152. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150025>

Calixto J (2003). *Biodiversidade Como Fonte de medicamentos*. Disponível em <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v55n3/a22v55n3.pdf>> acesso em: 12 de julho 2023.

Costa OE, Felício GJ, Priscilla AM., Ribeiro AR, Silva ETW, & Valle CR (2000). Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. *Napgama*, 3(4), 6–13.

Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião, LM, Ferri PH, Paula JR., Ferreira, HD, Sales BHN, & Silva M do RR. (2000). Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J. Ethnopharmacology*, 72(1-2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00214-2)

Fennel CW, Lindsey KL, Mc Gaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, Grace OM, Van Staden J 2004. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J Ethnopharmacol* 94: 205-217.

- Hiltunen AK, Savijoki K, Nyman TA, Miettinen I, Ihalainen P, Peltonen J, & Fallarero A (2019). Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*, 7(12), 584. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120584>
- Jenul C, & Horswill AR (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol. Spectr.*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018>
- Kadam SR, den Besten, HMW, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol* 165(3), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Kragh KN, Alhede M, Kvich L, & Bjarnsholt T. (2019). Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1(1), 100006. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100006>
- Maia DSV, Haubert L, Kroning, IS, Soares K dos S, Oliveira TL & da Silva WP (2020). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. *LWT-Food Sci. Technol*, 117(2), 108685. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108685>
- Martínez AFJ, Catalán BE, & Micol, V. (2020). Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, 8(10), 405. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>
- Melo PC, Sousa C, Botelho C, Oliveira R, & Nader-Filho A. (2014). NaOCl effect on biofilm produced by *Staphylococcus aureus* isolated from the milking environment and mastitis infected cows. *Pesq. Vet. Bras.* 34(2):109-113. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/pvb/a/M4JMF8jmsftKy7N3Kb9vN7t/?lang=en&format=pdf>> acesso em 16 jul. 2023

Miao J, Lin, S, Soteyome T, Peters BM, Li Y, Chen H, Su J, Li L, Li B, Xu Z, Shirtliff ME, & Harro JM (2019). Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* under food heat processing conditions: first report on cml production within biofilm. *Sci. Rep*, 9(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35558-2>

Moormeier DE, & Bayles KW (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol*, 104(3), 365–376.

<https://doi.org/10.1111/mmi.13634>

Morton RD. Aerobic plate count FP. Downes, K. ITO (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington (2001), pp. 63-67

Mourenza Á, Gil JA, Mateos LM, & Letek M. (2021). Novel Treatments and Preventative Strategies Against Food-Poisoning Caused by *Staphylococcal* Species. *Pathogens*, 10(2), 91.

<https://doi.org/10.3390/pathogens10020091>

Nan L, Yang K, & Ren G (2015). Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. *Mater. Sci. Eng: C*, 51(51), 356–361.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.012>

Nobre CB, Sousa EO, Silva JMFL, Coutinho HDM, & Costa JGM. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of fixed oils of *Mauritia flexuosa* and *Orbignya speciosa* associated with aminoglycosides, *Eur. J. Integr. Med.*, 23(1), 84-89.

Nobre MLM, Santos LS, Silva DRP, Oliveira FA, Araújo AR, Campos MS, Sousa BC,

Figueirêdo AV, Muratori MCS, & Soares MJS. (2021). Multiresistance and virulence factors

of *Staphylococcus aureus* isolated from pigs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 73(1), 343–351.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-11953>

O'Toole GA. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.*, 1(47).

<https://doi.org/10.3791/2437>

Oliveira DCS *et al.* Composição química e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. (Myrtaceae). 2017, Anais.. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul/UCS, 2017. Disponível em:

<http://www.sboe.net.br/cd/autores.html>.

Oliveira E, Felício GJ, Priscilla AM, Ribeiro AR Silva, ETW, & Valle CR (2000). Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo.

Napgama, 3(4), 6–13.

Pal M, Kerorsa GB, Marami LM, & Kandi, V (2020b). Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of *Staphylococcus Aureus*: A Comprehensive Review. *Am. J. Public Health Res*, 8(1), 14–21.

<https://doi.org/10.12691/ajphr-8-1-3>

Rocha ARF, Sousa HG, Vale JEP, Lima FL, Costa ASG, Araújo AR., Leite JR. SA, Martins, FA, Oliveira, MBPP., Plácido, A., Filho, FSS., & Lago, EC. (2021). Extract sand fractions of *Croton* L. (Euphorbiaceae) species with antimicrobial activity and antioxidant potential, *LWT - Food Sci. Technol*, (139), 110521. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110521>

Rocha S, Jaqueline MP, Jéssica FS, Andrade J, & Rodrigo DD (2020). Artropodofauna associada à cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC., Myrtaceae) em coleção de germoplasma ex situ em Goiás, Brasil. *Ciênc. Florest.*, 30(2), 463–463.

<https://doi.org/10.5902/1980509837139>

Rossoni EMM, & Gaylarde CC (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol*, 61(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00369-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00369-x)

Sardi JCO, Freires IA, Lazarini JG, Infante J, de Alencar, SM, & Rosalen PL (2017).

Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microb. Pathog.* 105(105), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.044>

Schilcher K, & Horswill AR (2020). *Staphylococcal* Biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.: MMBR*, 84(3), e00026-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>

Silva, RSM., Chaves, LJ., & Naves, RV. (2001). Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*eugenia dysenterica* dc.) no sudeste do estado de Goiás, *Rev. Bras. Frutic*, 23(2), 330–334. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452001000200026>

Simonetti E, Ethur ME, Castro LC, Kauffmann C, Giacomini AC, Ledur A, Arossi K, Pacheco LA, Goettert MI, Faleiro D, & Freitas EM (2016). Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Rev. Bras. Plantas Med* 18(1), 9–18. https://doi.org/10.1590/1983-084x/15_005

Soares AP V (2017). Ação antimicrobiana de extratos de *Eugenia pyriformis* Cambess (Myrtaceae) contra *Streptococcus mutans*. Disponível em:

[≤https://www.univates.br/bdu/items/ab19b3a0-7e09-49cc-a09e-a27849e3f529>](https://www.univates.br/bdu/items/ab19b3a0-7e09-49cc-a09e-a27849e3f529) acesso 17 jul 2023.

Souza A, de Oliveira C, de Oliveira V, Betim F, Miguel O, & Miguel M (2018). Traditional uses, phytochemistry, and antimicrobial activities of eugenia species – a review. *Planta Med* 84(17), 1232–1248. <https://doi.org/10.1055/a-0656-7262>

Souza LB (2015). *Capacidade de adesão e formação de biofilme de Candida spp. isoladas da cavidade oral de pacientes transplantados* (p. 106p) [Dissertação]. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/20306/1/CapacidadeAdesaoFormacao_Souza_2015.pdf> acesso em: 15 Jul. 2023

Souza, ERB. de, Naves, RV., & Oliveira, MF. (2013). Início da produção de frutos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC) implantada em Goiânia, Goiás. *Rev. Bras. Frutic*, 35(3), 906–909. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452013000300030>

Spletozer, AG., Santos, LA. Sanches, & Garlet, J. (2021). Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. *Ciênc Florest*, 31(2), 974–997. <https://doi.org/10.5902/1980509832244>

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, GD., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

Tahaei, SAS., Stájer, A., Barrak, I., Ostorházi, E., Szabó, D., & Gajdács, M. (2021). Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in staphylococcus aureus isolates: A laboratory-based study in hungary and a review of the literature. *Infect. Drug Resist*, 14(23), 1155–1168. <https://doi.org/10.2147/IDR.S303992>

Thomaz, DV., Peixoto, LF., de Oliveira, TS., Fajemiroye, JO., da Silva Neri, HF., Xavier, CH., Costa, EA., dos Santos, FCA., de Souza Gil, E., & Ghedini, P. C. (2018). Antioxidant

and neuroprotective properties of *Eugenia dysenterica* leaves. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018(<http://dx.doi.org/10.1155/2018/3250908>), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/3250908>

Tigabu, A., & Getaneh, A. (2021). *Staphylococcus aureus*, ESKAPE bacteria challenging current health care and community settings: A literature review. *Clin. Lab* 67(07/2021). <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2020.200930>

Toledo, AG., Souza, JGL., Santana, CB., Mallmann, A P., dos Santos, CV., Corrêa, JM., & Pinto, FGS. (2023). Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical prospection of *Eugenia involucrata* DC. leaf extracts. *Braz. J. Biol.*, 83(<https://doi.org/10.1590/1519-6984.245753>). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.245753>

Tsuchiya, H. (2001). Stereospecificity in membrane effects of catechins. *Chem. Biol. Interact.*, 134(1), 41–54. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00308-2](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00308-2)

Valli, M., & Bolzani, VS. (2019). Natural products: perspectives and challenges for use of brazilian plant species in the bioeconomy. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 91(suppl 3), e20190208. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190208>

Von Hertwig, AM., Prestes, FS., & Nascimento, MS. (2022). Biofilm formation and resistance to sanitizers by *Salmonella* spp. Isolated from the peanut supply chain. *Food Res. Int.*, 152,10882. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110882>

World Health Organization. (2017, February 27). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. Disponível em: <www.who.int. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>> acesso em: 10 Jul. 2023.

Wu, S., Huang, J., Zhang, F., Wu, Q., Zhang, J., Pang, R., Zeng, H., Yang, X., Chen, M., Wang, J., Dai, J., Xue, L., Lei, T., & Wei, X. (2019). Prevalence and characterization of food-

related methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. *Front. Microbio*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00304>