

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

TIAGO GOMES FERNANDES

**Efeito sinérgico do extrato aquoso das folhas de *Psidium guineense* Swartz em associação
com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga
resistentes**

RECIFE

2011

TIAGO GOMES FERNANDES

Efeito sinérgico do extrato aquoso das folhas de *Psidium guineense* Swartz em associação com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eulália Azevedo Ximenes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Obtenção de Produtos Naturais e Bioativos

RECIFE

2011

Fernandes, Tiago Gomes

Efeito sinérgico do estado aquoso das folhas de *Psidium guineense* Swartz em associação com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes/ Tiago Gomes Fernandes. – Recife: O Autor, 2011.

57 folhas: il., fig. e quadro; 30 cm.

Orientador: Eulália Azevedo Ximenes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Myrtaceae. 2. *Psidium guineense*. 3. Sinergismo. 4. Checkerboard. 5. FIC índice. . I. Ximenes, Eulália Azevedo. II. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 06 de setembro de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 06 de setembro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Eulália
Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes**
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares.
(Deptº Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Rejane Pereira Neves.
(Deptº de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. José Dalci Brondani

**COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profª. Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profª. Ana Cristina Lima Leite

**... Agradeço a Deus pela minha vida.
A minha família, na distância, por acompanhar
meus passos e apoiar todos os meus sonhos**

AGRADECIMENTOS

A Profa. Eulália Azevedo Ximenes, pela orientação, exemplo de profissionalismo e dedicação que tive a oportunidade de vivenciar ao longo desses anos. Pela sua amizade, minha sincera gratidão.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos acadêmicos essenciais para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

A Profa. Karina Randau por colaborar na produção e análise fitoquímica do extrato utilizado neste estudo.

A Biomédica Ana Albertina pelo apoio na obtenção do material microbiológico.

A Bióloga Olívia Cano, pela identificação botânica dos materiais vegetais empregados no preparo do extrato utilizado nessa pesquisa.

A secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Margarete Valdevino pela atenção e dedicação para com os assuntos relacionados a defesa da dissertação.

Aos amigos e colegas de bancada, Gustavo Dimech, Leonardo Aquino, Lucas Pacheco, Luciana Macêdo pelo apoio durante os experimentos, e momentos de descontração, essenciais para superar os dias difíceis de manipulação.

A amiga e também colega de bancada, Amanda Mesquita, pela amizade, confiança e inspiração. Obrigado pelo apoio e por ajudar-me a acreditar em meu potencial.

Aos amigos farmacêuticos, Ana Célia Azevedo, Antônio Teixeira e Cristiane Marques pelo apoio e acompanhamento nas várias fases desse trabalho.

Aos amigos, Amanda Duda, Antônio Pessoa, Fernando Barros e João Paulo Beltrão que mesmo distantes com seu apoio e incentivo se fizeram presentes.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Psidium guineense* Swartz (Araçá-do-campo) e cinco agentes antimicrobianos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina e meropenem, frente a doze cepas de *Staphylococcus aureus* com fenótipo de resistência. Quatro cepas de *S. aureus* (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) apresentaram resistência a todos os agentes antimicrobianos testados e foram selecionadas para o estudo da interação entre o extrato aquoso de *P. guineense* e agentes antimicrobianos, pelo método do tabuleiro de xaderz (checkerboard). Os critérios utilizados para avaliar a atividade sinérgica foram definidos pelo índice fracional da concentração inibitória (FICI). Todas as cepas de *S. aureus* foram suscetíveis ao *P. guineense*, determinado pelo método de microdiluição. A combinação do extrato de *P. guineense* com os agentes antimicrobianos resultou em uma redução de oito vezes no valor da CIM, e o índice da concentração inibitória fracionada (FICI) variou de 0.125 – 0.5, sugerindo uma interação sinérgica frente as cepas de *S. aureus* multidroga resistentes. A combinação do extrato aquoso de *P. guineense* com cefoxitina apresentou os menores valores FICI. Este estudo demonstrou que o extrato aquoso de *P. guineense*, quando associado aos agentes antimicrobianos betalactâmicos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos age sinergicamente, inibindo cepas multirresistente de *S. aureus*.

Palavras-chave: Myrtaceae; *Psidium guineense*; Sinergismo; Checkerboard; FIC índice

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of aqueous extract of *Psidium guineense* Swartz (Araçá-do-campo) and five antimicrobials (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ciprofloxacin, and meropenem), against twelve strains of *Staphylococcus aureus* with a resistance phenotype. Four *S. aureus* strains (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) showed resistance to all antimicrobial agents tested and were selected for the study of the interaction between aqueous extract of *P. guineense* and antimicrobial agents, by the checkerboard method. The criteria used to evaluate the synergic activity were defined by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). All *S. aureus* strains were susceptible to *P. guineense* as determined by microdilution method. The combination of the *P. guineense* extract with the antimicrobial agents resulted in a eight-fold reduction in their MIC, which frational inhibitory concentration index (FICI) ranged from 0.125 to 0.5, suggesting a synergic interation against multi-drug resistant *S. aureus*. The combination of the aqueous extract of *P. guineense* with cefoxitin showed the lowest FICI values. This study demonstrated that the aqueous extract of *P. guineense* combined with beta lactamics antimicrobials, fluoroquinolones and carbapenems, acts synergistically inhibit multidrug resistant *S. aureus*.

Keywords: Myrtaceae; *Psidium. guineense*; Synergism; Checkerboard; FIC Index

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Tabela 2. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de <i>Psidium guineense</i> e agentes antimicrobianos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> multiudroga resistentes	35
Tabela 3. Interação do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> com agentes antimicrobianos	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Psidium guineense</i> Swartz	21
Figura 2. Metabólitos secundários como modificadores dos mecanismos de resistência bacteriana	26
Figura 3. Pesquisa de metabólitos secundários do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> por Cromatografia em Camada Delgada	30
Figura 4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> e agentes antimicrobianos.....	33
Figura 5. Representação do método do tabuleiro de xadrez (<i>Checkerboard method</i>).....	34

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Revisão bibliográfica	15
3.1 Plantas medicinais: Fonte de agentes antimicrobianos	15
3.2 Família Myrtaceae e <i>Psidium guineense</i> Swartz	19
3.3 Resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos agentes antimicrobianos	22
4. Materiais e Métodos	29
4.1 Preparação do extrato	29
4.2 Determinação do perfil fitoquímico do extrato aquoso de <i>P. guineense</i>	29
4.3 Micro-organismos	31
4.4 Preparação do inóculo	32
4.5 Agentes antimicrobianos	32
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	32
4.7 Determinação <i>in vitro</i> da atividade sinérgica	34
5. Resultados	35
5.1 Perfil fitoquímico	35
5.2 A Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de <i>P. guineense</i> e agentes antimicrobianos	35
5.3 Determinação <i>in vitro</i> da atividade sinérgica	36
6. Discussão	40
7. Conclusão	44
8. Referências	45

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas superiores para fins medicinais é incontestavelmente o recurso mais antigo empregado pelos seres humanos para o tratamento de várias enfermidades (WHO, 1999; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2005).

Muito antes da descoberta da existência de micro-organismos como agente etiológico de várias patologias infecciosas, as plantas eram utilizadas para a cura, devido a presença de compostos com atividade antimicrobiana (RÍOS e RECIO, 2005). A observação e experimentação, pelos povos primitivos, das propriedades terapêuticas das plantas medicinais foram sendo propagadas ao longo de gerações, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Ao conhecimento tradicional empírico, vem sendo associado as pesquisas científicas, para utilização de agentes fitoterápicos de forma racional e segura. Além disso, a utilização de plantas medicinais é uma alternativa econômica quando comparada aos medicamentos alopáticos, sendo de fácil acesso à população, principalmente aquela, mais carente (MAGASSOUBA, 2007; WANG, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65 a 80% da população mundial de países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas para o tratamento primário a saúde (CALIXTO, 2005; VIEGAS et al., 2006; WHO, 2002).

A resistência de micro-organismos aos fármacos antimicrobianos é uma realidade bem documentada cientificamente e um sério problema de saúde pública em todo mundo (KLEVENS et al., 2007; NABER 2009). Dados recentes da literatura científica indicam um aumento da prevalência de cocos Gram positivos multidroga resistentes isolados do ambiente hospitalar que inspiram preocupação dos órgãos de vigilância epidemiológica. Dentre estes, destaca-se *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), comumente implicado em infecções em diferentes tecidos e órgãos acarretando desde infecções localizadas como furúnculo, abscesso, e infecções sistêmicas como, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (PEREIRA et al., 2004; NABER 2009).

Dados do Programa de Vigilância Epidemiológica - SENTRY revelaram um aumento na prevalência de MRSA isolados nos centros médicos da América Latina, em especial no Brasil, de 33,7% em 1997 para 40,2% em 2006 (PICAO et al., 2008). No Rio Grande do Sul, Brasil, em 2003, *S. aureus* foi o micro-organismo mais prevalente isolado de infecções nosocomiais, sendo que 64% destes eram MRSA (LISBOA et al., 2007).

Desde que MRSA foi descrito em 1961, o mesmo tem sido relacionado como um agente etiológico de infecções nosocomiais e normalmente não encontrado em áreas comunitárias. Entretanto esse conceito tem mudado nos últimos quinze anos e infecções causadas por MRSA de origem comunitária têm se tornado prevalentes e disseminadas por todo o mundo (DeLEO et al., 2010). No Brasil, em 2003, foi publicado o primeiro caso de infecção causada por MRSA de origem comunitária na América Latina, no qual três cepas caracterizadas eram oriundas de pacientes com infecções na derme, mucosas ou artrite séptica (RIBEIRO et al., 2005; GUZMÁN-BLANCO et al., 2009).

O aumento da resistência de MRSA frente a antibióticos de última geração tem induzido os pesquisadores a adotar métodos complementares para inibir a proliferação desses micro-organismos (HEMAISWARYA, 2008; WAGNER, ULRICH-MERZENICH, 2009).

O problema da resistência bacteriana é crescente e a perspectiva para a utilização de agentes antimicrobianos eficazes é incerta. Diante dessa realidade urge adotar ações de controle para a administração de agentes antimicrobianos, desenvolver pesquisas para elucidar mecanismos genéticos de resistência e métodos para o seu bloqueio, aprofundar os estudos para o desenvolvimento de novos fármacos ou protótipos de origem natural que servirão de modelo para novos antimicrobianos oferecendo ao paciente uma terapia racional e eficiente (PINTO et al., 2002; VIEGAS JR et al., 2006; GURIB-FAKIM, 2006).

As propriedades farmacológicas de metabólitos secundários presentes nas plantas são reconhecidas empiricamente pela população e algumas delas comprovadas cientificamente (DUARTE, 2006). Em sua maioria, os metabólitos secundários de plantas medicinais que apresentam atividade antimicrobiana são polifenóis, incluindo flavonóides e taninos (KOŁODZIEJ et al., 1999; RIOS e RECIO, 2005), sendo alguns com eficácia comprovada cientificamente contra MRSA (ALCARAZ et al., 2000; KUBO et al., 2002; GIBBONS et al., 2004; ROCCARO et al., 2004; FUJITA et al., 2005; HATANA et al., 2005; KITAHARA et al., 2006; PESEWU, et al., 2008).

Diversos trabalhos têm sido publicados utilizando extratos brutos ou fitofármacos associados a fármacos antimicrobianos, potencializando desta forma sua atividade, principalmente, sobre cepas de micro-organismos multidroga resistente para as quais não se dispõem de terapia eficaz (DARWISH et al., 2002; AQUIL et al., 2005; BRAGA et al., 2005; BETONI et al., 2006; ESIMONE et al., 2006; ADWAN et al., 2008).

Dentro deste contexto surge *Psidium guineense* Swartz, popularmente conhecido como araçá-do-campo, pertencente a família Myrtaceae. Este arbusto é nativo e de ampla dispersão

em toda a América tropical. No Brasil, ocorre principalmente em toda a costa litorânea (PIO-CORRÊA, 1984; POTT e POTT, 1994; SILVA e JUNQUEIRA, 1994).

Raras são as pesquisas científicas sobre a atividade farmacológica desta planta embora seja utilizada pela população para tratar infecções do trato geniturinário e gastrointestinal (GONZÁLEZ et al., 2005).

Diante deste relato, o presente trabalho objetivou numa primeira etapa um estudo da atividade antimicrobiana pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e posteriormente a avaliação da interação do extrato aquoso de *P. guineense* com agentes antimicrobianos frente a amostras de *S. aureus* multidroga resistentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a interação da associação do extrato aquoso obtido a partir das folhas de *Psidium guineense* Swartz e cinco agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes.

2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato aquoso de *Psidium guineense*, bem como dos seguintes agentes antimicrobianos: ampicilina; amoxicilina/ácido clavulânico; cefoxitina; ciprofloxacino; gentamicina; meropenem frente a doze cepas de *S. aureus* multidroga resistentes;
- Avaliar o tipo de interação entre o extrato aquoso de *P. guineense* com agentes antimicrobianos frente a quatro amostras de *Staphylococcus aureus* pelo método do tabuleiro de xadrez.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas medicinais: Fonte de agentes antimicrobianos

A aplicação de plantas para uso medicinal é amplamente difundida em todo o mundo e representou, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. Suas propriedades anti-sépticas são as mais conhecidas, sendo mencionadas na Bíblia e também evidenciadas no processo de embalsamento durante a arte de mumificação pelos antigos egípcios (APEL et al. 2006; CALIXTO et al., 2001).

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a fonte de protótipos para o desenvolvimento de medicamentos. Anteriormente estas eram utilizadas como encontradas na natureza, e depois seus extratos passaram a ser concentrados para melhorar sua ação farmacológica. A medida que a química evoluía, os princípios ativos, oriundo das plantas, puderam ser isolados e, finalmente utilizados como modelo para a síntese orgânica, com o propósito de aumentar o rendimento, custo e atividade (APEL et al., 2006; CALIXTO et al., 2001, SILVEIRA et al., 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta que cerca de 65 a 80% da população mundial que não tem acesso ao atendimento primário de saúde recorre a medicina tradicional, especialmente as plantas medicinais. A dificuldade de acesso as formas alopáticas de tratamento, devido ao elevado custo dos medicamentos induziu a OMS a apoiar a pesquisa com plantas medicinais e estimular a sua utilização pela população (OLIVEIRA, 1998; ALONSO, 1998).

A importância do estudo das plantas medicinais pode ter três implicações diretas: Resgatar o patrimônio cultural tradicional de uma população, assegurando a sobrevivência e manutenção do mesmo; Otimizar a utilização pela população de preparados terapêuticos (remédios caseiros) de baixo custo e organizar os conhecimentos tradicionais de maneira a utilizá-los no desenvolvimento de produtos através de processos tecnológicos (AMOROZO, 1996; ELISABETSKY, 2001).

A busca por novas alternativas terapêuticas, aliada às tendências globais de desenvolvimento sustentável e valorização da biodiversidade fizeram ressurgir, dentre outros, o interesse pela comprovação das propriedades farmacológicas das plantas (PINTO et al., 2002).

O interesse das indústrias farmacêuticas por substâncias bioativas inéditas foi intensificado nos anos 90, especialmente utilizando espécies das florestas tropicais, onde se

concentra grande parte da biodiversidade mundial (PINTO, et al., 2002). A diversidade química associada a uma grande variedade biológica, encontrada em ecossistemas terrestres e aquáticos, é um dos aspectos a ser considerado na pesquisa e desenvolvimento de biofármacos (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999).

A busca por medicamentos a partir de vegetais superiores é iniciada pela decisão de qual espécie será pesquisada. Tal decisão pode ser baseada no conhecimento antecipado de efeitos terapêuticos, tal como a pesquisa etnofarmacologia que utiliza o conhecimento pré-existente nas comunidades nativas; por acesso a bancos de moléculas disponíveis; ou por pesquisa aleatória, com espécies existentes e disponíveis em local previamente escolhido (MARINHO, 2008).

O Brasil é um país de dimensões continentais e de ampla biodiversidade. Os ecossistemas brasileiros respondem pela maior diversidade genética vegetal do mundo, sendo que 30% das florestas tropicais mundiais estão situadas em território brasileiro (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

A utilização de plantas medicinais, pelos brasileiros, além das influências africanas e européias, tem suas raízes fortemente ligadas a cultura indígena. Essas influências contribuíram para o enriquecimento da cultura popular, e podem servir como alicerce para estudos científicos (MARTINS et al., 1994). Entretanto, as pesquisas realizadas para a avaliação da utilização segura de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes (VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2005) e a maioria das espécies brasileiras continua sem qualquer estudo químico e principalmente aqueles referentes as propriedades farmacológicas (PINTO et al., 2002).

Na década de 80 foram identificados 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies, os quais têm sido usualmente empregados como produtos terapêuticos nos países ocidentais. Além disso, do total de medicamentos aprovados no período de 1983-1994, 6% foram obtidos diretamente de espécies vegetais, 24% são compostos derivados e 9% foram desenvolvidos a partir de compostos de vegetais, cuja estrutura molecular serviu como unidade precursora em processo de síntese (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999). São exemplos de medicamentos sintéticos desenvolvidos a partir de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, a procaína, cloroquina, vimblastina, vincristina, podofilotoxina, taxol e camptotecina (PINTO et al., 2002).

Embora o uso de produtos naturais *in natura* como insumos na indústria farmacêutica tenha decrescido ao longo dos últimos anos, estas substâncias ainda vêm sendo bastante utilizadas como protótipos para novas síntese orgânicas. Dos 847 fármacos de baixo peso

molecular lançados no mercado entre 1981 e 2006, 43 eram produtos naturais, 232 produzidos por semi-síntese a partir de produtos naturais e 572 obtidos por síntese total. Entretanto, 262 entre estas últimas substâncias possuíam um grupo farmacofórico inspirado em produtos naturais ou poderiam ser considerados análogos de produtos naturais (SCHMIDT et al., 2008)

Estima-se que $\frac{1}{4}$ dos 8 bilhões de dólares do faturamento da indústria farmacêutica nacional em 1996, foram resultantes de medicamentos derivados de produtos vegetais. Entretanto, apenas 8% das espécies botânicas brasileiras foram estudadas com o objetivo de obtenção de moléculas bioativas (AMORIM et al., 2003).

Os avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas de produtos e a diversidade estrutural presente na natureza são os fatores responsáveis por este renovado interesse (SCHMIDT et al., 2008).

As propriedades medicinais apresentadas pelas plantas se devem a variedade e complexidade de seus metabólitos. Estes metabólitos, os quais são produzidos como mecanismo de defesa dos vegetais às condições ambientais hostis e a presença de micro-organismos, insetos, animais (MONTARI e BOLZANI, 2001).

Os metabólitos secundários de vegetais superiores apresentam uma ampla diversidade estrutural e distribuição muito variada. Por representar uma interface química entre a planta e o ambiente circundante, sua síntese é frequentemente afetada por fatores relacionados a fisiologia da própria planta e mudanças ambientais. Os metabólitos secundários frequentemente estão restritos a uma espécie ou gênero vegetal e muitas vezes podem ser ativados somente durante um determinado estágio do desenvolvimento vegetal, em estações específicas do ano, sob condições de estresse ou de disponibilidade hídrica ou de nutrientes (LOURENCO 2003; GOBBO-NETO & LOPES 2007).

As moléculas bioativas de origem vegetal constituem uma estratégia para inovação farmacêutica e competitividade do setor, tendo em vista a singularidade estrutural das substâncias encontradas e sua perspectiva de patenteamento e sua importância como protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA, 2003).

As raras doenças infecciosas em plantas silvestres são um indicativo da efetividade dos mecanismos de defesa desenvolvido por esses vegetais. As plantas são conhecidas por produzirem uma enorme variedade de pequenas moléculas, com atividade antimicrobiana, geralmente classificadas como fitoalexinas. Sua composição química é diversificada, apresentando terpenóides, glicosteróides, flavonóides e polifenóis. (HEMAISWARYA, 2008).

Muitas plantas têm sido avaliadas não somente pela atividade antimicrobiana direta, mas também pela modificação do perfil de resistência ao agente antimicrobiano (GIBBONS, 2004; HEMAISWARYA, et al., 2008; WAGNER., H. e ULRICH-MERZENICH G., 2009). Várias moléculas oriundas de síntese orgânica ou de origem natural apresentam atividade antimicrobiana, pela reversão da resistência a fármacos, promovendo a eliminação de plasmídios e inibindo o transporte de agentes através da membrana plasmática (GUNICS et al., 2006; MOLNAR et al., 2004).

Compostos fenólicos, fenóis ou polifenóis pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande variedade de estruturas simples e complexas, que tem, no mínimo, um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxílico. Como exemplos podem ser citados fenóis simples tal como o catecol e a epicatecina (COWAN, 1999). Compostos lipofílicos interferem na estrutura da membrana microbiana. Um aumento na hidroxilação destes compostos está relacionado a um aumento de toxicidade. (URS e DUNLEAVY, 1975; SCALBERT, 1991; COWAN, 1999).

Outros compostos com atividade biológica são os flavonóides; nome dado a polifenóis de baixo peso molecular, encontrados em diversas plantas. Desde que foram descobertos, os flavonóides foram reconhecidos por serem sintetizados pelas plantas em resposta às infecções microbianas, sendo reconhecida também, *in vitro* sua ação antimicrobiana contra um grande número de micro-organismos (COWAN, 1999; SIMÕES et al., 1999; SARTORI et al., 2003).

O mecanismo de ação dos flavonóides ocorre pela habilidade de se complexar com proteínas e com células bacterianas (formar complexos irreversíveis com ácidos amino nucleofílicos em proteínas (STERN et al., 1996), frequentemente levando à inativação da proteína e perda da função). Muitos flavonóides lipofílicos podem ainda romper a parede bacteriana (TSUCHIYA et al., 1996; COWAN, 1999).

Os taninos são substâncias não cristalizáveis que na presença de água formam soluções coloidais. Apresentam reação ácida e é adstringente. Quanto a sua atividade antimicrobiana esta, está relacionada à ligação com proteínas e adesinas, inibição de enzimas, privação do substrato microbiano, formação de complexos com a parede celular e com íons metálicos e ruptura da membrana plasmática (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997; COWAN, 1999).

3.2 A família Myrtaceae e *Psidium guineense* Swartz

A família Myrtaceae, descrita por Antoine Laurent de Jussieu, inclui cerca de 129 gêneros e aproximadamente 4.620 espécies arbustivas e arbóreas, bem representada na Austrália, oeste da Índia e América tropical, e várias outras em climas temperados (DI, STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Myrtaceae é uma das famílias botânicas com maior riqueza de espécies nas formações vegetais da costa oriental brasileira, especialmente na Mata Atlântica, sendo a identificação de suas espécies condição indispensável para a quantificação da biodiversidade desse ecossistema (BARROSO, PEIXOTO, 1992; LIMA et al., 1997).

Os representantes da família Myrtaceae são árvores ou arbustos que apresentam tronco com córtex esfoliante, folhas simples, geralmente opostas, com margens inteiras, de coloração verde, e flores geralmente brancas e bissexuadas (BARROSO et al., 1984; LORENZI, 2002). LORENZI, 2002).

No Brasil esta família está representada por 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies, de árvores lenhosas dominantes em várias formações vegetais brasileiras (LANDRUM e KAWASAKI 1997). Essa família inclui gêneros como *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Pseudocaryophyllus*, *Syzygium*, *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Melaleuca*.

A família Myrtaceae tem grande importância econômica, uma vez que várias espécies são cultivadas, seja por conta dos frutos comestíveis, com finalidade ornamental, pela extração de essências ou madeiras de alto valor comercial, fornecem também madeiras e possuem propriedades medicinais (MELO, 2008). Uma característica marcante das mirtáceas é a presença, em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (BARROSO et al., 1984).

Diversas substâncias químicas, com atividade farmacológica, foram isoladas a partir de espécies dessa família, tais como flavonóides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e taninos (LEE et al., 2000; SALIB e MICHAEL, 2004; BEGUM et al., 2002). Os constituintes dessa família incluem, além de óleos essenciais, leucoantocianinas, taninos, ácidos fenólicos e ésteres, sendo rara a presença dos glicosídeos cianogênicos e alcalóides (EVANS, 1996).

Lima e colaboradores, 2006, demonstraram o potencial antibacteriano contra micro-organismos Gram-positivos dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica. As folhas das mirtáceas são caracterizadas ainda pela presença notável de taninos e de cristais de oxalato de cálcio (METCALFE; CHALK, 1950). Segundo Carvalho et al. (2002), muitas espécies dessa família são utilizadas, como antiinflamatório, antineoplásico,

antiviral, e são utilizadas na medicina popular no controle de diarreias e outros distúrbios gastrintestinais.

No Brasil, várias espécies dos gêneros *Psidium* (Goiaba, Araçá), *Myrciaria* (Gabuticaba), *Eugenia* (Pitanga, Cereja-nacional, Jambo e Cambuci) e *Paivaea* se destacam pelo valor alimentício; os gêneros *Pimenta* (Pimenta) e *Syzygium* (Cravo-da-índia) destacam-se como condimentos (JOLY, 1998).

Um dos gêneros da família das Mirtáceas que mais ocorre no Brasil é o gênero *Psidium*. Trata-se de arbustos, raramente árvores com inflorescência em pedúnculos unifloros e trifloros. Compreende aproximadamente 120 espécies, distribuídas por toda América tropical. Nos estados brasileiros vegeta por toda costa litorânea. O maior número de espécies encontra-se da Amazônia até o sul do México e Antilhas (REITZ; KLEIN, 1977).

O gênero *Psidium* apresenta diversas espécies como *myrtoides*, *australis*, *cattleyanum*, *guineense* e *guajava*. Dentre essas espécies, *P. guajava* é uma das mais estudadas onde destaca-se por sua atividade antiinflamatória, antipirética e antidiarréica (OLAJIDE et al., 1999).

A espécie *Psidium guineense*, popularmente conhecida como araçá-do-campo, é um arbusto de 2 a 2,5 m de altura, podendo chegar até 5 metros, com vários galhos e caule bastante tortuoso, seu tronco apresenta casca lisa, que se descama. Possui folhas opostas, curto-pecioladas e glabras; botões florais tomentosos ou glabros, com cálice membranoso; flores hermafroditas, diclamídeas, actinomorfas, brancas e com numerosos estames. Produz frutos ovóides ou oblongos, amarelos, de polpa branca e mucilaginosa, sendo muito apreciados pela população na forma de araçazada, geléia, suco, doce, sorvete e licor. Seus frutos lembram a goiaba, embora sejam mais ácidos e de perfume mais intenso (POTT; POTT, 1994; SILVA e JUNQUEIRA, 1994; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), Figura 1.

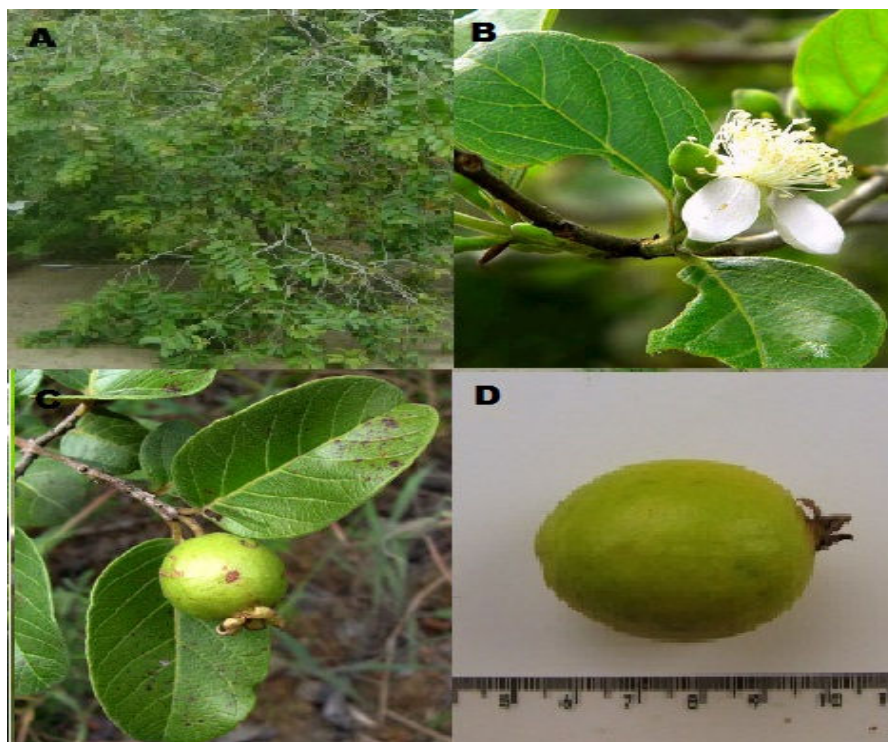


Figura 1. *Psidium guineense* Swartz. **A.** Hábito. **B.** Folhas. **C, D.** Frutos.

Foto: (Tiago G. Fernandes, 2011)

P. guineense floresce de junho a dezembro, frutifica de janeiro a maio, mas pode fornecer fruto o ano todo e perder quase todas as folhas nas estações mais secas. Essa conexão entre maior produção de taninos em períodos de maior exposição a herbívoros está relacionada com os mecanismos de defesa dos vegetais, pois a característica adstringente desse metabólito garante as sementes, folhas, frutos ou demais tecidos jovens, um sabor impalatável as espécies fitófagas (POTT; POTT, 1994).

O araçá cresce bem em solos arenosos e pobres em nutrientes, apresentando potencial para os mal-drenados. Não é exigente quanto ao clima, resistindo a geadas, campos inundáveis, solos arenosos e argilosos (SILVA; TASSARA, 1998). Trata-se de um arbusto nativo e de ampla dispersão na América Tropical. No Brasil, ocorre desde a região Norte até a Ilha de São Sebastião, em São Paulo. No Nordeste, é encontrada nas regiões do Litoral e Zona da Mata, principalmente nos tabuleiros costeiros, caracterizados por possuírem solos pobres, ácidos e arenosos (PIO-CORRÊA, 1984).

Segundo Caldeira e colaboradores (2004), os teores dos minerais tais como potássio, cálcio, magnésio, ferro e fósforo encontrados em *P. guineense* são mais elevados que os de frutos mais comumente consumidos pela população brasileira como a maçã, o pêssego, a pêra, o morango e o abacaxi. Apresenta potencial para exploração econômica devido à boa aceitação de seus frutos para consumo *in natura*, pelo elevado teor de vitamina C, que é cerca

de quatro vezes maior que as frutas cítricas (RASERA; RASERA, 1994). A madeira é utilizada para construção de vigas, mourões e cabos para ferramentas agrícolas, explorando-se também a lenha e o carvão com alto poder calorífico (PIO-CORRÊA, 1984).

Como possui ainda alta capacidade de frutificação, resistência a doenças e pragas (exceto a mosca das frutas) e grande dispersão, ele se adapta a diferentes habitats (RASERA e RASERA, 1994).

Na Mata Atlântica, as comunidades tradicionais usam a decocção das folhas como antiinflamatório e cicatrizante local, enquanto a infusão das folhas é usada na forma de gargarejo como anti-séptico bucal e também como antiinflamatório externo (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Rodrigues e Carvalho, (2001), relataram que as raízes de *P. guineense* são utilizadas pela população como diuréticas e antidiarréicas e suas cascas na tanagem do couro, devido ao elevado teor de taninos, o que justifica a utilização da população como planta medicinal, através da decocção das raízes para o tratamento de infecções do trato geniturinário, e gastrointestinal. Na Costa Rica a planta é empregada no tratamento de resfriados, bronquites e também úlceras e varizes (GONZÁLEZ et al., 2005)

Num dos raros estudos sobre a atividade antimicrobiana de *P. guineense*, Gonzales et. al., 2005, estudaram o perfil fitoquímico da casca e da polpa do fruto deste arbusto e correlacionaram a presença dos flavonóides avicularina, guaijaverina e quercetina caracterizados no extrato etanólico, com a atividade sobre cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de pacientes. A composição química do extrato etanólico da polpa do fruto apresenta ainda aldeídos, fenóis, esteróides, triterpenos, cetonas, taninos e açúcares.

Pesquisas que objetivam avaliar o potencial farmacológico e antimicrobiano dessa espécie devem ser incentivadas, uma vez que esta é utilizada na medicina popular brasileira e escassos são os estudos a seu respeito.

3.3 Resistência de *Staphylococcus aureus* aos agentes antimicrobianos

O gênero *Staphylococcus* pertencente a família Micrococcaceae, é composto de 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostra biológica humana. Os estafilococos são geralmente encontrados na pele e em mucosas e de outros animais (KONEMAN, 2008).

Alguns estafilococos patogênicos para o homem produzem uma enzima denominada coagulase, e a detecção dessa enzima é usada em laboratório para sua identificação. A espécie

de estafilococos coagulase positiva mais frequentemente isolada em infecções humanas é o *S. aureus* (KONEMAN, 2008).

As doenças provocadas por *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, devido as toxinas por ele produzidas (DAS et al., 2007). Infecções graves provocadas por este micro-organismo podem ocorrer frequentemente em pacientes hospitalizados, podendo gerar um prognóstico desfavorável, principalmente no que diz respeito a antibioticoterapia e sobrevida do paciente (FELTEN et al., 2002).

Segundo Corbella e colaboradores, (1997), e Santos et al., 2007, as infecções causadas por *S. aureus* podem se localizar em um ou múltiplos sítios, recebendo assim diferentes denominações, como foliculite, sico (bicho-do-pé), carbúnculo, antraz, hordéolo (terçol) e impetigo. A capacidade de *S. aureus* desencadear infecções invasivas está intimamente relacionada com os fatores de virulência, tais como cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, adesinas, síntese de enzimas e toxinas extracelulares (FLOCK et al., 1996; COELLO et al., 1997; NOSTRO et al., 2004).

Quanto ao mecanismo de invasão do tecido, *S. aureus* tem a capacidade de adesão a pele ou mucosa, rompendo as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas e ligações intercelulares, como desmossomos e junções de aderência, pela atividade da enzima hialuronidase (IWATSUKI et al., 2006). Após a colonização, outras estratégias estão envolvidas na sobrevivência e proliferação do micro-organismo patogênico no organismo do hospedeiro, como a opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas humoral e celular do sistema imunológico (VELAZQUES-MEZA, 2005).

Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (MRSA) isoladas de área comunitária foram primeiramente descritas na literatura, no começo dos anos 90 (COOMBS, 2006). Segundo Klevens, (2007), clones de MRSA de origem comunitária multidroga resistentes disseminaram-se rapidamente pelos Estados Unidos, alcançando proporções epidêmicas e caracterizando um problema de saúde pública.

Embora os surtos de infecções causados por MRSA de origem comunitária estejam relacionados com afecções da epiderme, esses micro-organismos podem se tornar invasivos (BOYLE-VAVRA, 2007). Um estudo demonstrando a incidência e distribuição de infecções invasivas, nos Estados Unidos, causadas por MRSA revelou que 75,2 % foram bacteremias e que 13,7 % destas estavam relacionadas com cepas de MRSA de origem comunitária (KLEVENS, 2007). MRSA são produtores das toxinas, α , β , γ , e δ enterotoxina e panto-valentine leucocidina, sendo causadora de celulite e pneumonia necrosante (DURAI, 2010).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos provocou, a partir da década de 70, um aumento no aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos, especialmente nos ambientes hospitalares. (LINARES-RODRIGUES, 2005). A resistência bacteriana aumenta principalmente para aquelas bactérias patogênicas mais frequentemente isoladas de amostras humanas na mesma proporção da utilização indiscriminada de antimicrobianos (COHEN, 1997).

Desde de 1961 que MRSA vêm sendo associado as infecções relacionadas aos cuidados em saúde, e tem se tornado causa da crescente relação morbidade/mortalidade em todo mundo (MULLIGAN et al., 1993; SANTOS et al., 2007; LIVERMORE, 2003). Wang e Barrett, (2007), relataram que os surtos de infecção por MRSA têm sido freqüentes em unidades de terapia intensiva e uma ameaça a sobrevivência de pacientes imunocomprometidos.

Os primeiros relatos de surtos de infecção hospitalar provocados por MRSA foram documentados no Reino Unido e que rapidamente emergiram em outros países da europa, sendo na ocasião, isolado no Japão, Estados Unidos e Austrália (RUBIN et al, 1999; ENRIGHT et al., 2002; TVERDEK et al., 2008).

Na década de 80, no Japão, os casos de infecção nosocomial decorrentes de MRSA se tornaram um problema de saúde pública, sendo que 50 a 70% dos casos de infecção nosocomial causados por cepas de *S. aureus*, eram resistentes a meticilina (ANDO et al., 2004), acarretando na extensa utilização de cefalosporinas de terceira geração (ITO, 1998). No Reino Unido, MRSA é agente etiológico mais frequentemente isolado de infecções nosocomiais, e responsável por 1/5 das infecções hospitalares adquiridas, custando cerca de 1 bilhão de libras ao Serviço Nacional de Saúde, por ano (CEPEDA, 2005).

No Brasil, dados do Programa de Vigilância a Antimicrobianos, publicaram que MRSA correspondem a 56% das causas de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo o mais prevalente dentre todos os micro-organismos patogênicos (SADER et al., 2004).

A colonização por MRSA é comum tanto em pacientes hospitalizados quanto pacientes em comunitários. Uma determinada população sã pode servir como reservatório para esse micro-organismo (DURAI, 2010). De acordo com Witte e Mielke, (2007), cerca de 30% da população mundial pode estar hospedando cepas de MRSA. Morita et al, (2007), detectaram a presença de cepas de MRSA nas fossas nasais de 3% dos pacientes analisados.

As cepas de MRSA apresentam fenótipo de resistência não somente aos beta-lactâmicos, mas também a fluoroquinolonas, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina e aminoglicosídeos (HIRAMATSU, 1998). Os glicopetídeos vancomicina e teicoplanina são

utilizados para o tratamento de infecções causadas por MRSA, no entanto modificações na terapêutica mostram-se necessárias devido a intolerância por parte dos pacientes ou falha no tratamento por seleção de cepas resistentes. A resistência de MRSA aos glicopeptídeos pode estar relacionada ao espessamento da parede celular com redução da permeabilidade e da atividade autolítica (SIERADZKI, 2003).

As cepas de MRSA estão se tornando resistentes a vancomicina, resultando em três cepas adicionais resistentes ao antimicrobiano: *S. aureus* vancomicina intermediário, *S. aureus* vancomicina intermediário heterogêneo, *S. aureus* vancomicina resistente (DURAI, 2010). As cepas de MRSA com resistência intermediária e heterogênea a vancomicina podem se tornar totalmente resistentes durante infecções persistentes em que há falha na resposta ao tratamento com glicopeptídeos, com significativas mudanças de fenótipo (MOORE et al., 2003; TENOVER et al., 2005).

Melo e colaboradores, (2005), relataram que em Uberlândia, Brasil, 9 de 41 pacientes portadores de cepas MRSA em tratamento com vancomicina desenvolveram resistência heterogênea e um dos isolados apresentou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) da ordem de 8µg/mL.

A quantidade de cepas MRSA resistentes às quinolonas ou resistentes a outros tem crescido, limitando as alternativas terapêuticas para seu controle. (PESAVENTO, 2007). O risco de infecção por cepas de MRSA aumenta quase duas vezes com a administração prévia de antimicrobianos, principalmente quinolonas, cefalosporina e betalactâmicos (TACCONELLI, 2008).

Nos últimos anos novos agentes antimicrobianos voltados especificamente para micro-organismos Gram positivos ou MRSA estão sendo desenvolvidos, mas cepas com baixa susceptibilidade a esses agentes têm sido isoladas frequentemente e o desenvolvimento de novas drogas, num futuro próximo, parece estar comprometido (SPELLBERG, 2004; CHOPRA, 2003; STEFANI, 2003).

Cepas de *S. aureus* podem se tornar MRSA a partir da aquisição do gene *MecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina (PBP2a), presente na sua membrana, apresentando dessa forma baixa afinidade a meticilina, bem como aos antimicrobianos betalactâmicos (PALAVECINO, 2007; MARTINS; CUNHA, 2007). Segundo Forestier, 2007, 40% das cepas isoladas de *S. aureus* são meticilina resistentes.

Outra estratégia de resistência promovida por MRSA está na expressão do gene *SCCmec*. Esse gene é definido pela combinação do tipo de gene das *crrs*, recombinases responsáveis pelo complemento e a classe do complexo *MecA* (ITO et al., 2001; 2003;

CONCEIÇÃO et al., 2010). Os genes *SCCmec* tipos I, II e III, associados a infecções nosocomiais, têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos betalactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina e quinolonas (HIRAMATSU et al., 1999).

Uma estratégia empregada para vencer a resistência bacteriana é a combinação de agentes antimicrobianos. Inibidores das β -lactamases são administrados como co-droga. A estratégia mais bem sucedida que tem sido adotada para inibir as β -lactamases é através da administração do ácido clavulânico com drogas como amoxicilina, sulbactam e tazobactam (LEE et al., 2003). Mas a frequente utilização do clavulanato tem favorecido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes (BLASQUEZ et al., 1993; ENRIGHT et al., 2002).

Metabólitos secundários, produzidos por vegetais superiores, são considerados como fonte promissora para a terapia antimicrobiana seja ela combinada ou não. Vários fitoquímicos atuam como modificadores da resistência bacteriana, agindo em pontos específicos da célula procariótica, potencializando o efeito do antimicrobiano sintético, figura 2 (HEMAISWARYA et al., 2008). Os fitoquímicos quando utilizados em associação com agentes antimicrobianos, têm a propriedade de modificar receptores ou sítios ativos responsáveis pela resistência ou de bloquear rotas metabólicas (HEMAISWARYA et al., 2008).

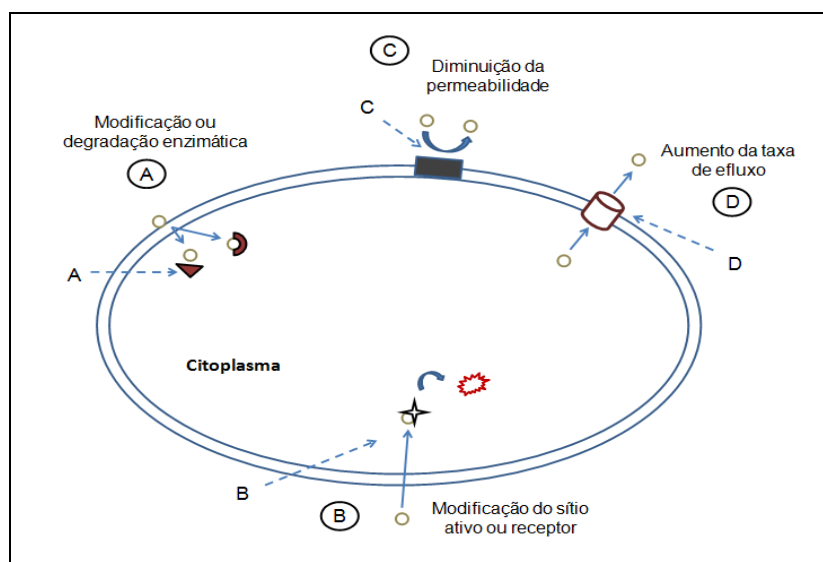


Figura 2 – Metabólitos secundários como modificadores dos mecanismos de resistência bacteriana. (A*) Corilagina, Telimagrandina I, Diterpeno 416 e componente P inibe PBP2a, modificando o receptor; (B*) Epigalocatequina inibe β -lactamase; (C*) Timol, Carvacrol, Ácido gálico aumenta a permeabilidade da membrana; (D*) Epigalocatequina, 5-metoxihidnocarpina, reserpina, ácido carnósico e derivados da isopimarana inibem a bomba de efluxo (HEMAISWARYA et al., 2008).

O sinergismo entre agentes beta-lactâmicos e produtos naturais como catequinas (TAKAHASHI et al, 1995), Epigallocatequina (EGCg) presente no chá verde (*Camellia sinensis*) (SURESH, et al, 1997), corilagina (*Arctostaphylos uva-ursi*) (SHIMIZU, et al., 2001). Corilagina, um polifenol isolado de *Arctostaphylos uva-ursi* é capaz de reduzir significativamente a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de agentes beta-lactâmicos frente a isolados de MRSA. Essa atividade pode estar relacionada com a inibição da atividade da enzima PBP2a, ou da inibição de sua produção (SHIMIZU, et al., 2001).

Segundo Hu et al, (2002), EGCg apresenta atividade sinérgica quando associado a carbapenêmicos, frente a cepas de MRSA, entretanto o mecanismo de ação ainda não está elucidado. A interação de EGCg com agentes beta-lactâmicos se mostra sinérgica visto que ambos atuam na formação das camadas de peptidoglicano na parede celular da célula bacteriana (ZHAO, 2001).

Inúmeros fitofármacos assim como flavonas glicosiladas atuam como inibidores através da supressão da atividade da enzima topoisomerase IV (BERNARD et al., 1997), miricetina como inibidor da DNA helicase (GRIEP et al., 2007) e alicina inibindo a síntese de RNA (FELDBERG, 1988).

Outro mecanismo que favorece a resistência aos antimicrobianos é através da síntese de enzimas sítio específicas que destroem ou modificam a estrutura química do antimicrobiano. Dentre as estratégias que levam a inativação dos antimicrobianos estão, hidrólise, oxidação, redução e transferência de radicais. Grupos químicos hidroliticamente susceptíveis como, ésteres e amidas são clivados por enzimas produzidos por micro-organismos resistentes. A modificação química do grupo ativo através de acilação, fosforilação e glicosilação, produzidos pelo micro-organismos, podem tornar inócuo o agente antimicrobiano (WRIGHT, 2005).

EGCg é capaz de inibir penicilinas produzidas por *S. aureus*, exibindo uma taxa de 50% de inibição, em uma concentração de 10 µg/mL, recuperando a atividade da penicilina. A CIM de ampicilina e sulbactam (16 µg/mL) é reduzida a 4 µg/mL quando associados a EGCg, visto que a combinação desses dois agentes antimicrobianos, por si só, não é suficiente para inibir o crescimento de cepas de MRSA e outras cepas produtoras de β-lactamase. (HU et al., 2001).

O desenvolvimento de bombas de efluxo é outro mecanismo de defesa empregado pelas bactérias contra a acumulação de agentes antimicrobianos no interior da célula procariótica. Esse mecanismo exige hidrólise de Adenina Trifostato (ATP) ou gradiente iônico para promover a expulsão do antimicrobiano (HEMAISWARYA et al., 2008).

A bomba de efluxo Nor A produzida por *S. aureus*, é responsável pela resistência a fluoroquinolona (YOSHIDA et al., 1990), Qac A é responsável pela resistência a acriflavina e brometo de etídio (LITTLEJOHN et al., 1992) e os transportadores TET (K) e Msr (A) são específicos pelo efluxo de tetraciclina e macrolídeos (RENAU et al., 1999).

Segundo Roccaro e colaboradores, (2004), EGCg, aumenta o acúmulo de tetraciclina nas cepas de *S. aureus*, inibindo a bomba de efluxo promovida por TET (K) e TET (B). EGCg também potencializa a atividade de norfloxacin frente a cepas de *S. aureus* produtoras da bomba Nor A (GIBBONS et al., 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Preparação do extrato

Folhas de *P. guineense* foram coletadas, em novembro de 2009, no município de Moreno – Pernambuco – Brasil (08°07'07" S - 35°05'32" W) .

Um espécime deste vegetal foi identificado pela bióloga Olivia Cano e depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima – IPA sob o número 83.564.

As folhas de *P. guineense* foram secas a temperatura ambiente e em seguida trituradas em moinho elétrico. O extrato aquoso das folhas de *P. guineense* foi obtido, a partir de 50 gramas de folhas secas, e em seguida colocado em 1000 ml de água destilada fervente e exaustivamente extraído sob temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida o extrato foi liofilizado, acondicionado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

4.2 Determinação do perfil fitoquímico do extrato aquoso de *P. guineense*

Do extrato aquoso de *P. guineense* foram retirados 15 µL e submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de gel de sílica (MERCK-Germany, 15553), empregando-se o sistema de solventes A- [EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11: 11: 27 v/v)] como fase móvel para separação de alcaloides, flavonóides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, saponinas, iridóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos e B - [n-BuOH-Me₂CO-tampão fosfato pH 5,0 (40 : 50 : 10 v/v)] para separar taninos hidrolisáveis e açúcares redutores. Reveladores específicos para estes metabólitos secundários foram utilizados com base no que preconiza Randau et al., (2004) (Figura 3), (Quadro 1).



Figura 3 – Pesquisa de metabólitos secundários do extrato aquoso de *P. guineense* Swartz por Cromatografia em Camada Delgada

Quadro 1 - Sistemas de solventes e reveladores em cromatografia de camada delgada para caracterização de metabólitos secundários do extrato aquoso de *Psidium guineense* (RANDAU et al., 2004)

Metabólitos secundários	Fase móvel	Revelador	Referência
Alcalóides	A	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	A	2-amino etildifenil borinato	Wagner & Bladt, 1996
Flavonóides	A	2-amino etildifenil borinato	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocinidinas	A	Vanilina clorídrica	Roberts, 1956
Taninos hidrolisáveis	B	2-amino etildifenil borinato Alúmen de ferro	Stiasny, 1912; Xavier, 2002
Iridóides	A	Vanilina sulfúrica ácida	Wagner & Bladt, 1996
Saponinas	A	Anisaldeído	Wagner & Bladt, 1996
Açúcares redutores	B	2,3,5 cloreto trifeniltetrazolio	Metz, 1961

A - [EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11: 11: 27 v/v)]; B – [n-BuOH-Me₂CO-tampão fosfato pH 5,0 (40 : 50 : 10 v/v)]

4.3 Micro-organismos

Neste trabalho foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (n=11) isoladas de amostras clínicas e de alimentos, bem como uma cepa padrão obtida do “*American Type Culture Collection*”, *S. aureus* ATCC 25923.

O fenótipo de resistência destas cepas obtido através do método de difusão em meio sólido, está apresentado na tabela 1. Estas cepas foram mantidas a – 80 °C em caldo Brain Heart Infusion – BHI (Acumedia Manufacturers®, USA), contendo 20% v/v glicerol a reativação destas culturas foi realizada a cada experimento.

Tabela 1 - Origem e susceptibilidade das cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

<i>Staphylococcus aureus</i>	Origem	Sensibilidade	Resistência
ATCC 25923	ATCC	CFX; OXA; CIP; SZT; GET; TEC; AZI; AMC; TET	AMP
LFBM 01	Queijo	TET, TEI	CFX; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC; GET; OXA
LFBM 05	Secreção	CIP; TEC; GET; SZT; AMC; TET	CFX; AMP; AZI; OXA
LFBM 08	Secreção vaginal	GET; SZT; TEI; AMC; TET	CFX; CIP; AMP; AZI; OXA
LFBM 16	Escarro	CIP; GET; SZT; TEI; TET	CFX; OXA; AMP; AZI
LFBM 26	Sangue	TEI, TET	CFX; OXA; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC
LFBM 28	Sangue	TEI; TET	CFO; OXA; CIP; GET; SZT; AMP; AZI; AMC
LFBM 29	Sangue	CIP; GET; SZT; TEI; AZI; TET	CFO; OXA; AMP; AMC
LFBM 30	Secreção traqueal	GET; SZT; TEI; AMC; TET	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI
LFBM 31	Secreção traqueal	GET; SZT; TEI; AMC; TET	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI
LFBM 32	Sangue	GET; SZT; TEI;	CFO; OXA; AMP; CIP
LFBM 33	Sangue	TET; TEI	CFO; OXA; CIP; SZT; AMP; AZI

AMP: Ampicilina 10 µg; AMC: Amoxicilina/Ác. clavulânico 30 µg ; AZI: Azitromicina 15 µg ; CFO: Cefoxitina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg ; GET: Gentamicina 10 µg; TEI: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; SZT – Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg; OXA – Oxacilina 1 µg. LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos.

4.4 Preparação do inóculo

As culturas de *S. aureus* foram preparadas em caldo Mueller Hinton e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação estas culturas foram padronizadas em 10^8 UFC/mL, utilizando o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, e em seguida diluídas em soro fisiológico a fim de obter um inóculo final de 10^7 UFC/mL.

4.5 Agentes antimicrobianos

O pó de referência dos agentes antimicrobianos, Ampicilina; Amoxicilina/Ácido clavulânico; Cefoxitina; Ciprofloxacino; Gentamicina; Meropenem, foram cedidos por Eurofarma Laboratório do Brasil LTDA

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição, modificado (CLSI, 2010). Este ensaio foi realizado em placas de microdiluição, com 96 poços de fundo em forma de “U”.

O extrato aquoso liofilizado de *P. guineense* e os agentes antimicrobianos foram pesados analiticamente e depois solubilizados em água destilada esterilizada de forma a obter uma solução de 1000 µg/mL e 400 µg/mL para o extrato aquoso de *P. guineense* e agentes antimicrobianos respectivamente. Destas soluções, 200 µL foram pipetados nos orifícios de 1 a 12 da linha A. Os demais poços foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller Hinton. Uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para a linha B, e este procedimento foi repetido até a linha H, a fim de obter concentrações que variaram de 500 a 3,9 µg/mL para o extrato aquoso de *P. guineense* e de 200 a 3,12 µg/mL para os agentes antimicrobianos.

Um volume de 5 µL das culturas padronizadas de *S. aureus* foi inoculado em todos os orifícios. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas.

A inibição do crescimento bacteriano foi demonstrada por densidade óptica utilizando um leitor de microplacas (Thermo plate - TP Reader[®]) utilizando um comprimento de onda de 630 nm. Considerando o crescimento total (100%) no controle de poço (MHB + bactérias), o percentual de redução do crescimento foi atribuído aos poços restantes.

Para confirmação da inibição do crescimento bacteriano, após a leitura espectrofotométrica, foi adicionado a cada um dos orifícios da microplaca 20 μL de uma solução aquosa a 0,5% de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC), para confirmação da inibição do crescimento bacteriano, e reincubadas por três horas a 35°C (Figura 4).

A presença de uma coloração vermelha nos orifícios é interpretada como prova negativa do efeito inibitório, enquanto a ausência da coloração vermelha, considerada como prova positiva da atividade antimicrobiana.

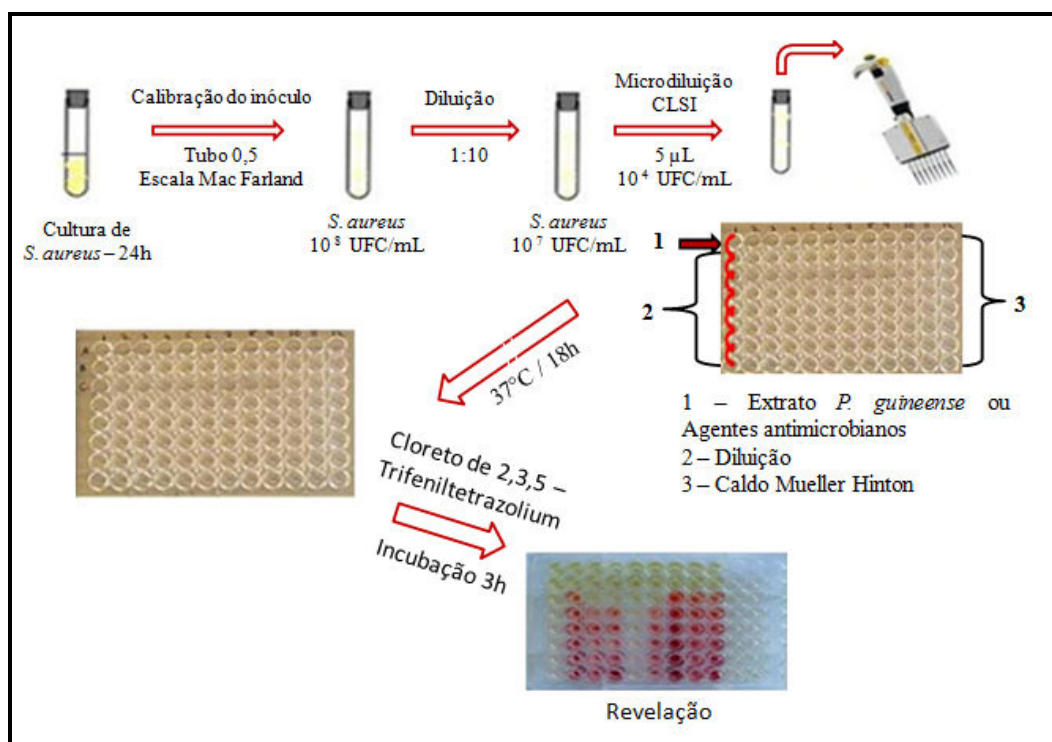


Figura 4 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato aquoso de *P. guineense* e agentes antimicrobianos

A este experimento foi adicionado uma placa de microdiluição como controle do crescimento das cepas de *S. aureus*.

A CIM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível das cepas de *S. aureus*.

A determinação da CBM foi realizada de acordo com os valores da CIM. Dessa forma concentrações mais altas que a CIM foram semeadas em Mueller Hinton Agar e incubadas por 24 horas a 37°C. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato aquoso de *P. guineense* ou agente antimicrobiano capaz de matar 99,9 % das cepas de *S. aureus*.

4.7 Determinação *in vitro* da atividade sinérgica

O estudo da interação entre o extrato aquoso de *P. guineense* e os agentes antimicrobianos foi realizado de acordo com o método do tabuleiro de xadrez (**checkerboard method**) (LORIAN, 1996).

Com base nos valores da CIM foram preparadas soluções em caldo Mueller Hinton do extrato aquoso de *P. guineense* e dos agentes antimicrobianos de forma a obter concentrações que variaram de 0,5xCIM a 0,016xCIM e de 0,5xCIM a 0,002xCIM respectivamente. Nos orifícios das placas de microdiluição, foram pipetados 100 µL do extrato e 100 µL do agente antimicrobiano. (Figura 5).

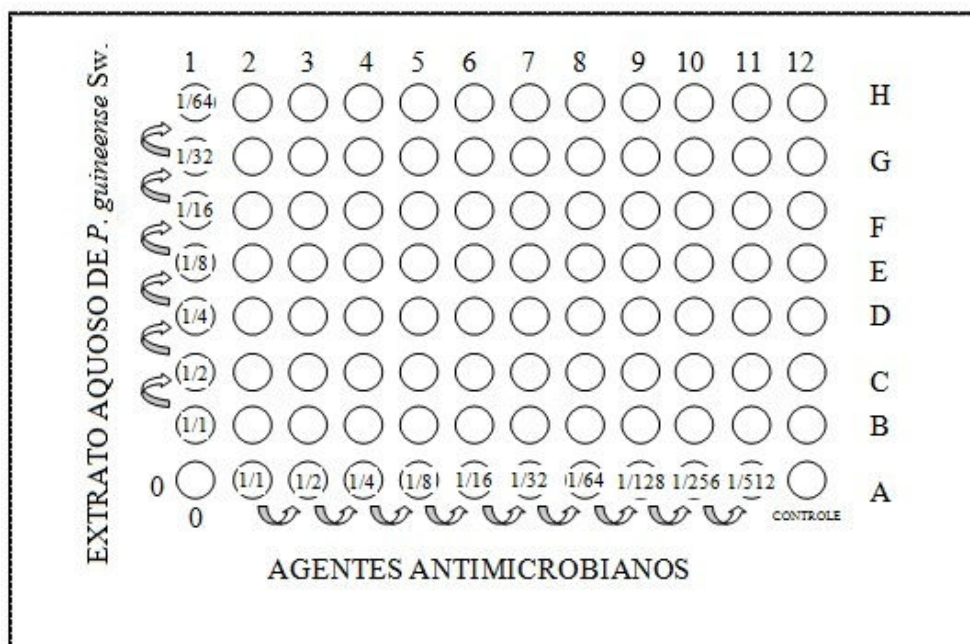


Figura 5 – Representação do método do tabuleiro de xadrez (**Checkerboard method**).

Cada poço foi inoculado com 5 µL da suspensão bacteriana contendo 10^4 UFC/mL das seguintes cepas, LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33.

A interpretação destas interações foi realizada através do cálculo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) pela seguinte equação $FICI = (CIM \text{ da associação } P. \text{ guineense e agente antimicrobiano} / CIM \text{ de } P. \text{ guineense}) + (CIM \text{ da associação agente antimicrobiano e } P. \text{ guineense} / CIM \text{ do agente antimicrobiano})$. O FICI foi interpretado como sendo sinérgico quando o valor for $\leq 0,5$; aditivo ou indiferente quando o valor for $> 0,5$ e < 1 ; e antagônico quando > 1 (ELIOPOULUS e MOELLERING, 1991).

5. RESULTADOS

5.1 Perfil fitoquímico

O perfil fitoquímico do extrato de *Psidium guineense* revelou a presença de taninos, flavonóides, proantocianidinas condensadas, leucoanthocyanidins e açúcares redutores. Por outro lado, não foi verificada a presença de alcalóides fenilpropanóides, e saponinas. O rendimento do extrato aquoso de *P. guineense* foi de 3,7% (p/p) em relação a 50 gramas de material vegetal.

5.2 A Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *P. guineense* e agentes antimicrobianos

Os valores da CIM e CBM do extrato aquoso de *P. guineense* e da ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina, gentamicina e meropenem contra doze cepas de *Staphylococcus aureus* estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Psidium guineense* e agentes antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* multiudroga resistentes

<i>S. aureus</i>	CIM/CBM (µg/ mL)						
	AMC	AMP	CEF	CIP	GET	MER	EAQ
ATCC 25923	0.77/1.55	1.55/3.12	1.55/3.12	3.12/6.24	0.39/0.78	0.77/1.55	250/500
LFBM 01	25.0/50.0	400/800	400/800	50.0/100	12.5/25.0	25.0/50.0	250/500
LFBM 05	6.25/12.5	100/200	25/50.0	3.12/6.24	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500
LFBM 08	3.12/6.24	100/200	12.5/25.0	3.12/6.24	3.12/6.24	6.25/12.5	250/500
LFBM 16	12.5/25.0	25.0/50.0	12.5/25.0	3.12/6.24	3.12/6.24	6.25/12.5	250/500
LFBM 26	50.0/100	400/800	400/800	50.0/100	25.0/50.0	25.0/50.0	250/500
LFBM 28	25.0/50.0	400/800	100/200	50.0/100	25.0/50.0	12.5/25.0	250/500
LFBM 29	12.5/25.0	50.0/100	25/50.0	3.12/6.24	3.12/6.24	12.5/25.0	500/1000
LFBM 30	12.5/25.0	200/400	12.5/25.0	50.0/100	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500
LFBM 31	12.5/25.0	100/100	12.5/25.0	50.0/100	3.12/6.24	6.25/12.5	250/500
LFBM 32	12.5/25.0	200/200	12.5/25.0	50.0/100	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500
LFBM 33	12.5/25.0	200/200	200/200	50.0/100	25.0/50.0	12.5/25.0	250/500

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima;

ATCC: American type culture collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos

AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico (CIM ≥ 8 µg/mL); AMP: Ampicilina (CIM ≥ 0,25 µg/mL); CFO: Cefoxitina (CIM ≥ 4 µg/mL); CIP: Ciprofloxacina (CIM ≥ 4 µg/mL); GET: Gentamicina (CIM ≥ 8 µg/mL);

EAQ: Extrato aquoso de *P. guineense*

O extrato aquoso de *P. guineense* mostrou forte atividade contra todas as cepas de *S. aureus* com CIM valores entre 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$. As cepas de *S. aureus* revelaram um perfil de resistência contra a maioria dos agentes antimicrobianos testados, em particular aos antibióticos beta-lactâmicos. Os valores da CIM para ampicilina e cefoxitina variaram de 3,12 - 400 $\mu\text{g/mL}$, que mostraram ser menos eficazes contra as cepas de *S. aureus* testadas. Para amoxicilina/ácido clavulânico os valores da CIM variaram de 3,12 - 50 $\mu\text{g/mL}$. Entre todas as cepas de *S. aureus* testadas, sete mostraram-se resistentes à ciprofloxacina. Para meropenem valores MIC variou 3,12 - 25 $\mu\text{g/mL}$. Todas as cepas mostraram-se sensíveis à gentamicina, exceto (LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33).

Quatro cepas de *S. aureus* (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) apresentaram resistência a todos os agentes antimicrobianos testados. Este perfil de resistência selecionou os micro-organismos para o estudo da interação entre o extrato aquoso de *P. guineense* e agentes antimicrobianos. Os valores da CBM foram superiores aos valores da CIM em uma diluição.

5.3 Determinação *in vitro* da atividade sinérgica

O valores da CIM obtidos pela combinação do extrato aquoso de *P. guineense* com ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina e meropenem contra cepas de *S. aureus* (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) estão listados na Tabela 3.

A concentração inibitória mínima do extarto aquoso de *P. guineense* (250 $\mu\text{g} / \text{mL}$) aumentou a atividade antistaphylococcica de todos os agentes antimicrobianos. A atividade sinérgica foi detectada por uma diminuição de oito vezes o valor da CIM dos agentes antimicrobianos na combinação e determinado pelo $\text{FICI} \leq 0,5$.

A combinação do extrato aquoso de *P. guineense* e cefoxitina apresentaram os menores valores que de FICI que variaram de 0,125 - 0,5. A CIM da cefoxitina (CIM individual 100-400 $\mu\text{g} / \text{mL}$) foi reduzido para 1/512 (CIM da associação variou 0,19 - 0,78 $\mu\text{g} / \text{mL}$), quando foi usado em associação com o extrato aquoso de *P. guineense* (CIM 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Para as cepas de *S. aureus* 26 e LFBM, LFBM 33, esta associação também foi eficiente na redução da CIM do extrato aquoso de *P. guineense* para 1/8 x MIC (31.25 $\mu\text{g/mL}$) ou 1/4 x MIC (62,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$), respectivamente.

A inibição do crescimento de todas as cepas *S.aureus* pelo meropenem foi aumentada quando associado ao extrato aquoso de *P. guineense* (FICI 0,5). Esta combinação foi mais

eficaz contra LFBM 28 (FICI 0,25) que reduziu a CIM individual de *P. guineense* (250 µg/mL) para 1/4xCIM.

Para a cepa de *S. aureus* LFBM 33, o valor da CIM da ciprofloxacina (CIM individual 50 µg/mL) foi reduzida para 0,09 µg/mL quando combinado com extrato aquoso de *P. guineense* (1/4xCIM), aumentando a atividade dessa fluoroquinolona (FICI 0,25).

Todas as outras combinações do extrato aquoso de *P. guineense* com agentes antimicrobianos demonstraram atividade sinérgica, aumentando a atividade desses agentes antimicrobianos (FICI 0,5).

Tabela 3 - Interação do extrato aquoso de *Psidium guineense* com agentes antimicrobianos

<i>Staphylococcus aureus</i>	Associação	CIM Agentes antimicrobianos (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)	FIC Individual	FIC índice (FICI)	Interpretação	% redução CIM	% redução de células viáveis ¹
LFBM 01	AE + AMC	250/25	125/0,048	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	80,21
	AE + AMP	250/400	125/0,78	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	84,43
	AE + CFO	250/400	125/0,78	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	87,04
	AE + CIP	250/50	125/0,09	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	93,49
	AE + MER	250/25	125/0,048	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	84,24
LFBM 26	AE + AMC	250/50	125/0,78	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	88,82
	AE + AMP	250/400	125/0,78	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	83,58
	AE + CFO	250/400	31.25/0,78	0,125/0,002	0,25	Sinérgico	87,5 / 99,8	80,90
	AE + CIP	250/50	125/0,09	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	94,59
	AE + MER	250/25	125/0,048	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	80,76
LFBM 28	AE + AMC	250/12,5	125/0,024	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	83,38
	AE + AMP	250/400	125/0,78	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	89,71
	AE + CFO	250/100	125/0,19	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	86,91
	AE + CIP	250/50	125/0,09	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	94,45
	AE + MER	250/25	62.5/0,048	0,25/0,002	0,25	Sinérgico	75,0 / 99,8	89,08

LFBM 33	AE + AMC	250/12,5	125/0,024	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	78,89
	AE + AMP	250/200	125/0,39	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	76,72
	AE + CFO	250/200	62.5/0,39	0,25/0,002	0,25	Sinérgico	75,0 / 99,8	81,53
	AE + CIP	250/50	62.5/0,78	0,25/0,002	0,25	Sinérgico	75,0 / 99,8	94,09
	AE + MER	250/12,5	125/0,024	0,5/0,002	0,5	Sinérgico	50,0 / 99,8	81,84

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Fracionária Mínima;

AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico; AMP: Ampicilina; CFO: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacina; MER: Meropenem; EA: Extrato aquoso de *P. guineense*; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos

¹Associação do extrato (1/2 CIM) e agentes antimicrobianos (1/512 CIM)

6. DISCUSSÃO

Fitofármacos têm grande potencial como compostos antimicrobianos, e têm sido provados a ter grande potencial terapêutico (STAVRI et al., 2007). Alguns metabólitos secundários têm a capacidade de aumentar a susceptibilidade do microorganismo aos agentes antimicrobianos. Quando utilizados em combinação, estes metabólitos, têm o potencial de inibir sítios modificados ou exibem uma atividade sinérgica através do bloqueio de uma ou mais rotas metabólica, atuando como um modificador de mecanismos de resistência a múltiplas drogas (HEMAISWARYA et al., 2008).

Diversos estudos têm investigado as interações entre antibióticos e extratos brutos contra *Staphylococcus aureus* multidroga resistente (GIBBONS et al. 2004, ROCCARO et al., 2004; FUJITA et al., 2005; HATANO et al., 2005; KITAHARA et al., 2006; BETONI et al., 2006; ESIMONE et al., 2006; ADWAN et al., 2008; PESEWU et al., 2008).

Na família Mirtaceae há uma grande variedade de fitoquímicos com atividade antimicrobiana, que incluem, terpenos presentes em óleos essenciais, flavonóides, (SLOWING et al., 1994; LIS-BALCHIN et al., 2000; HERNÁNDEZ et al., 2000) e taninos (SCLBERT, 1991; DJIPA et al., 2000).

O gênero *Psidium* é nativo da América, mas é distribuído por todo mundo. Seus espécimes são tradicionalmente usadas na prevenção ou tratamento de um grande número de doenças. Preparações de galhos ou folhas de espécies de *Psidium* são amplamente utilizados para o controle de doenças gastrointestinais e respiratórias, bem como no tratamento de infecções da pele (ANESINI E PEREZ, 1993; CÁCERES et al., 1991; CÁCERES et al., 1993).

Uma avaliação etnofarmacológica demonstrou a atividade antimicrobiana de *Psidium* ssp. justificando sua utilização para o tratamento de doenças infecciosas do aparelho digestivo, respiratório, do trato urinário, bem como a pele e mucosas (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002). Dentro deste gênero, *P. guajava* é a espécie mais estudada e utilizada (CABIESES, 1993; AGUILAR et al., 1994). No entanto nós estamos interessados em *P. guineense*, uma planta nativa do Brasil, caracterizada pelo seu amplo espectro de utilização, incluindo distúrbios gastrointestinais, infecção do trato geniturinário, o tratamento de resfriados, bronquite, e úlceras (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; GONZÁLEZ et al., 2005).

A CIM do extrato aquoso de *P. guineense* foi determinada pelo método de diluição em caldo. De acordo com Aligiannis et al., 2001 e Sartorato et al., 2004, uma forte atividade do

extrato é para valores de CIM entre 50 - 500µg/mL, atividade moderada MIC entre 600 - 1500 µg/ mL e atividade fraca acima de 1500 µg/mL. Comparando nossos resultados com os relatados na literatura, podemos considerar que o extrato aquoso de *P. guineense* (250 - 500 g µg/mL) tem uma forte atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes.

De acordo com Ferreira e colaboradores (2011), a análise fitoquímica das folhas de *P. guineense* indicou a presença de flavonóides, taninos hidrolisáveis e condensados, e óleos essenciais distribuídos por todo o tecido foliar. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo.

González et al., 2005 associaram a presença dos flavonóides, principalmente avicularina, quercetina e guaijaverina presentes no extrato etanólico de *P. guineense*, com atividade frente a isolados clínicos de *Streptococcus mutans*.

Os flavonóides têm a capacidade de se complexar com proteínas e células bacterianas formando complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos (STERN et al. 1996). Este complexo, muitas vezes leva a inativação da proteínas e perda de sua função (TSUCHIYA et al. 1996, COWAN, 1999).

Taninos são substâncias não cristalizáveis, e em um sistema aquoso forma soluções coloidais. A atividade antimicrobiana dos taninos pode ser descrita da seguinte forma (i) ligação com proteínas e adesinas e inibindo enzimas (ii) complexação com a parede da célula e íons metálicos e (iii) ruptura da membrana plasmática (ROBBERS et al 1997; SHUNG et al., 1998; COWAN, 1999).

Sinergismo de produtos naturais e agentes antimicrobianos é uma promissora área da pesquisa fitomedicinal, desenvolvendo novas perspectivas para os fitofármacos. A abordagem não é exclusiva para combinações de extratos, mas também combinações entre fitoquímicos isolados e óleos essenciais com agentes antimicrobianos (HEMAISWARYA et al., 2008; WAGNER-MERZENICH, 2009).

Além de atingir efeitos sinérgicos, combinações de dois ou mais compostos pelas seguintes razões: (1) para prevenir ou reprimir o surgimento de cepas resistentes, (2) para diminuir a dose-toxicidade relacionada, (3) para atingir o amplo espectro de atividade (ELIOPOULUS e MOELLERING, 1991; MUROI e CUBO 1996).

Neste estudo, um efeito sinérgico do extrato aquoso de *P. guineense* contra cepas de *S. aureus* multidroga resistentes, foi observado para as combinações com beta-lactêmicos, carbapenêmicos e fluoroquinolonas.

A combinação do extrato aquoso de *P. guineense* e beta-lactâmicos pode ajudar a reduzir a quantidade de agentes antimicrobianos utilizados e desenvolver um medicamento com potência similar ou superior aos antimicrobianos. Mais importante, uma vez que os fitofármacos são estruturalmente diferentes dos agentes antimicrobianos, com diferentes mecanismos de ação, eles podem fornecer novos meios de estudar os mecanismos de controle bacteriano em um nível molecular (HEMAISWARYA et al., 2008).

Com o aumento da prevalência de *S. aureus* multirresistente, testes para avaliação sinérgica, utilizando várias combinações de fitoquímicos com agentes antimicrobianos pode ser uma ferramenta poderosa para ajudar a seleção da terapia antimicrobiana adequada (SAKHARKAR et al., 2009). Tendo em vista a capacidade dos extratos de plantas de melhorar a atividade de agentes antimicrobianos vários pesquisadores estudaram essa interação sinérgica (DARWISH et al., 2002; AQUIL et al., 2005; BRAGA et al., 2005; BETONI et al., 2006; ESIMONE et al 2006; ADWAN et al., 2008).

Vários fitofármacos atuam como inibidores dos mecanismos de resistência bacteriana e alguns deles são flavonas glicosiladas que suprimem a atividade da Topoisomerase IV (BERNARD et al., 1997), miricetina inibindo DNA helicase (GRIEP et al., 2007), alicina inibindo a síntese de RNA (FELDBERG et al., 1998). Corilagina, um polifenol isolado de *Arctostafilos uva-ursi* foi capaz de reduzir significativamente o valor da CIM de beta-lactâmicos contra MRSA.

De acordo com Shimizu e colaboradores, (2001), existem duas possibilidades quanto ao mecanismo de ação da corilagina, inibindo a atividade da proteína de ligação a penicilina (PBP2a), ou inibindo sua produção.

O polifenol galato de epigalocatquina (EGCg) isolado do chá verde, apresentou efeito sinérgico com agentes beta-lactâmicos, uma vez que ambos têm afinidade pelo mesmo sítio, ou seja, a camada de peptideioglicano presente na parede celular bacteriana (ZHAO et al., 2001). EGCg inibe a penicilinase produzida por *S. aureus*, assim restaurando a atividade da penicilina. A combinação de EGCg com ampicilina/sulbactam reduziu a CIM 90 de um valor inicial de 16 µg/mL para 4 µg/mL (Hu et al., 2001).

Hatano e colaboradores, (2005), investigaram a atividade sinérgica de duas proantocianidinas isoladas de frutos do gênero *Zizyphus*. Embora a CIM desses polifenóis tenha sido de 512 – 1024 µg/mL, ambos reduziram o valor da CIM para o antimicrobiano oxacilina (1/2 – 1/6 x CIM)

É interessante notar que a maioria dos metabólitos secundários têm atividade antimicrobiana fraca, de magnitude menor do que os agentes antimicrobianos produzidos por

bactérias e fungos. Apesar do fato de que antimicrobianos derivados de plantas são menos potentes, plantas combatem doenças infecciosas com sucesso. Dessa forma torna-se evidente que as plantas desenvolvem mecanismos sinérgicos envolvendo seus fitofármacos para combater infecções (HEMAISWARYA et al., 2008).

De acordo com Rosales Reyes e colaboradores, (2005), a restrição do extrato bruto utilizado nesse estudo foi intencional e baseado na crença de que ele representaria a forma mais próxima de como é utilizado nas preparações tradicionais.

Por isso, especula-se que a eficácia de um extrato bruto pode ser devido a interação entre os diferentes componentes ativos que podem estar presentes no extrato, levando ao aumento da atividade e/ou diminuição da toxicidade potencial de alguns dos seus componentes individuais (BIRDI et al., 2010).

7. CONCLUSÃO

Efeitos sinérgicos resultantes da combinação de agentes antimicrobianos com plantas têm sido documentados em vários estudos. Dados da literatura, bem como nossos resultados revelam o potencial das plantas para o tratamento terapêutico. Este efeito permite a utilização desses agentes antimicrobianos, quando não são eficaz por si só. Portanto, mais estudos precisam ser conduzidos para busca de tais compostos e extratos de plantas antes de serem utilizados em tratamentos, devem ser testado quanto a toxicidade *in vivo*.

O efeito antibacteriano do extrato aquoso de *P. guineense* e o efeito sinérgico em combinação com agentes antimicrobianos pode ser uma terapia alternativa interessante para a doenças infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* multirresistentes.

8. REFERÊNCIAS

- ADWAN, M.G.; ABU-SHANAB A.B and ADWAN, M.K. *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **Pakistan Journal of Medical Science**. 24: 541-544. 2008.
- AGUILLAR, A.; ARGUETA, A.; CANO, L. *Flora Medicinal Indigena de Mexico*. Instituto indigenista de México. 245p. 1994
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 40:4168-4170, 2001.
- ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis ediciones. 1998.
- AMORIM, E.L.C; LIMA, C.S.A; HIGINO, J.S; SILVA, L.R.S; ALBUQUERQUE, U.P. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**. v. 15, n.1-3. 66-69. 2003
- AMOROZO, M.C.M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP. p. 47-68.1996.
- ANDO, E., K. MONDEN, R. MITSUHATA, R. KARIYAMA, AND H. KUMON. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama* v.58; p. 207-214. 2004
- ANESINI, C. e PEREZ, C. Screening of plants used in Argentina folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology** 39: 119-128. 1993.
- APEL, M. A.; LIMA, M. E. L.; SOUZA, A.; CORDEIRO, I.; Young, M.C.M.; SOBRAL, M. E. G.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest. **Pharmacologyonline**. São Paulo. v. 3; p. 376-383, 2006.
- AQIL, F.; KHAN, M. S. A; M. OWAIS, M; AHMAD, I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical of β -lactamase producing methicilin resistant *Staphylococcus aureus* **Journal of Basic Microbiology**. v. 45; p.106-114. 2005
- BARROSO, G. M. & PEIXOTO, A. L. Espécies Novas ou Pouco Conhecidas do Gênero *Marlierea* (Myrtaceae) no Sudeste Brasileiro. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**. v. 1; p.83-96. 1992
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. & LIMA, H. C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil. Myrtaceae**. v.2. Viçosa, Ed. Univ. Fed. Viçosa, 377p. 1984
- BEGUM, S.; HASSAN, S.I.; SIDDIQUI, B.S.; SHAHEEN, F.; GHAYUR, M.N.; GILANI, A.H. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. **Phytochemistry**. v. 61, p. 399–403, 2002.

BELOTTI, V.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A. Frequency of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 137-140, 1999.

BERNARD, F.X., SABLE', S., CAMERON, B., PROVOST, J., DESNOTTES, F., CROUZET, J., BLANCHE, F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 41; p. 992–998. 1997.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JUNIOR, A.. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

BLAZQUEZ J, BAQUERO MR, CANTON R, ALOS I, BAQUERO F. Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.37(10):2059–2063. 1993.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin". **Lab Invest** v. 87; n. 1; p. 3–9. 2007

BRAGA, L.C.; LEITE, A. A.M.; XAVIER, K.G.S.; et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 51; p. 541-547. 2005

CABIESES, F. **Apuntes de la Medicina Tradicional. La racionalidad de lo irracional**. Tomo II. Lima, Peru. p. 123-128. 1993

CALDEIRAS, S. D. et al. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW) e do Tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 145-154. 2004

CALIXTO, J. B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100; p. 131-134. 2005.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó-SC, Editora Argos, 2001.

CACERES, A.L.; FLETES, L.; AGUILAR, A. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology** 38: 31-38. 1993

CACERES, A.B.; LOPEZ, M.; LOGEMANN, H. Actividad antimicótica de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de dermatofitosis. **Revista Mexicana de Micología** 7: 21-38. 1991

CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CEPEDA, J.A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; et al. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. **Lancet**. V. 365; p. 295-304. 2005

CHAMBERS, H.F.; HACKBORTH, C.J. In **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Clinical Management and Laboratory Aspects**. ed. Cafferkey M.T: 21-35. New York: Marcel Dekker. 1992

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. **Emerging infection diseases**. v. 7; p. 178-182. 2001

CHOPRA, I. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: concerns, causes and cures. **Expert Review of Anti-Infective Therap** v. 1; p. 45-55. 2003

CHUNG, P.Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L.Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** 10(1): 25. 2011.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S20 v.30; n. 1; 2010

COELLO, R.; GLYNN-F- J.R.; GASPAR, C.; et al. Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA. **Journal of Hospital Infection**. v. 37; p. 39-46. 1997

CONCEIÇÃO, T.; AIRES-DE-SOUSA, M.; PONA, N.; BRITO, M.J.; et al. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**. v.30; p. 293–297. 2010.

COOMBS, G.W.; PEARSON, J.C.; O'BRIEN, F.G.; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, Western Australia. *Emerging Infection Disease*. v. 12; p. 241–7. 2006.

CORBELLA, X.; DOMINGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease** v.16; p. 351–357. 1997.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, v. 4; P. 1926-1978. 1984.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews** v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DARWISH, R.M.; ABURJAI, T.; AL-KHALIL, S.; MAHAFAZH, A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79; p. 359-364. 2002.

DAS, I.; O'CONNELL, N.; LAMBERT, P. Epidemiology, clinical and laboratory characteristics of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a university hospital in UK. *Journal of Hospital Infection*. v. 65; p. 117-23. 2007.

DeLEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N.; CHAMBERS, H.F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. v. 1; n. 375(9725); p. 1557-1568. 2010

DJIPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 71: 307-313. 2000.

DI STASI, L.C. e HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica**. 2 ed. Ed. UNESP, São Paulo, p. 323 - 331. 2002

DUARTE, M.C.T., Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, Campinas, n.7: 2006.

DURAI, R.; PHILIP, C. H.; HOQUE, H.; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update, **AORN Journal** v. 91; p. 599–606. 2010

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC. p. 87-99.2001.

ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE G.; et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99; p. 7687-7692. 2002

ESIMONE, C.O.; ROHA I.R.; IBEZIM E.C.; et al. In vitro evaluation of the, interaction between tea extracts and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Biotechnology**. v. 5; p. 1082-1086. 2006

FELDBERG, A.R.S.; CHANG, S.C.; KOTIK, T.N.; et al. *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 32; p. 1763–1768. 1988

FELTEN, A.; GRANDRY, B.; LAGRANGE, P.H.; AND CASIN, I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40; p. 2766-71. 2002

FERREIRA, R.B, et al. Morphoanatomy, Histochemistry and Phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) Leaves. **Journal of Pharmacy Research** 4: 4. 942-944. 2011

FLOCK, J.I.; HIENZ, S.A.; HEIMDAHL, A.; SCHENNINGS, T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **Infectology and Immunology**.v. 64; n. 5; p. 1876–1878. 1998

FORESTIER, E.; RÉMY, V.; MOHSENI-ZADEH, M.; et al. MRSA Bacteremia: recent epidemiological and therapeutical trends [in French]. **Revista de Medicina Interna**. v. 28 n. 11; p. 746-755. 2007.

FUJITA, M., SHIOTA, S.; KURODA, T.; et al. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 49; p. 391-396. 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**. v. 21; p. 263-277, 2004

GIESBRECHT, P.; KERSTEN, T.; MAIDHOF, H.; WERKE, J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. **Microbiology and molecular biology review**. 62:1371-1414. 1998

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influencia de metabolitos secundarios. **Química Nova**. v. 30; n. 2; p. 374-381. 2007

GONZÁLEZ, A.M.N.; GONZALEZ, M.B.R.; PINTO, N.L.S. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana Plantas Medicinales**. n. 10; p. 3-4. 2005.

GRIEP, M.A.; BLOOD, S.; LARSON, M.A.; et al. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. **Bioorganic and medicinal chemistry**. v. 15; p. 7203–7208. 2007

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C P.; MENTZ,

GUNICS, G., FARKAS, S., MOTOHASHI, N., SHAH, A., HARSUKH, G., KAWASE, M., MOLNÁR, J. Interaction between 3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridines and ampicillin, and erythromycin on different *E. coli* strains. **In Vivo**. v. 20; n. 3; p. 367-372. 2006.

GUTIÉRREZ, R.M.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology** *Ethnopharmacol* 117: 1–27. 2008

GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ISTURIZ, R.; et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 34; n.4; p. 304-308. 2009.

HARBORNE J.B. **Phytochemical Methods**. 3ed. Chapman & Hall. London. 1998.

HARTMA, B.J.; TOMASZ, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology** 158(2): 513–516. 1984.

HATANO, T.; KUSUDA, M.; INADA, K. Effect of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**. v. 66; p. 2047–2055. 2005.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases.(REVIEW). **Phytomedicine**. v. 15; p. 639 – 652. 2008

HERNANDÉZ, N.E.; TERESCHUK, M.L.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Taí del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology** 73: 317-322. 2000.

HIRAMATSU, K., ITO, T., HANAKI H. Mechanisms of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Bailliere's clinical infectious diseases**, v. 5; p. 221 – 242. 1999

HIRAMATSU K.; HANAKI H. Glycopeptide resistance in staphylococci. **Current opinion in infection disease**. v. 11; p. 653–658. 1998

HU, Z.Q.; ZHAO, W.H.; ASANO, N. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 46; p. 558–560. 2002

ITO, T.; HIRAMATSU, K. Aquisition of methicilin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* **Yonsei medical journal**. v. 39; p. 526-533. 1998

ITO, T.; KATAYAMA. Y.; ASADA. *et al.* Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 45; p. 1323-1336. 2001

ITO, T.; OKUMA, K.; MA X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug resistance updates**. v. 6; p. 4152. 2003

KITAHARA, T.; AOYAMA Y.; HIRAKATA, Y. *et al.* In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International journal of antimicrobial agents**. v. 27; n. 1; p. 51-57. 2006

KLEVEN, R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J.; *et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of the american medical association**. v. 298; p. 1763–1771. 2007.

KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTE, K.P.; KIDERLEN, A.F. Enhancement of antimicrobial activity of tannins and related compounds by immune modulatory effects In: **Plant Polyphenols 2: Chemistry, Pharmacology, Ecology** (Hemingway, R.W., Gross, G.G., Yoshida, T. Hrsg.) Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 575-594

KONEMAN, E. W., *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565 p. 2008.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49; n. 4; p. 508-536. 1997.

LEE, M.H.; CHIOU, J.F.; YEN, K.Y.; YANG, L.L. EBV. DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v. 154, n. 7, p. 131-136, 2000.

LIMA, A. A.; ARAUJO, E.R.S.; MELO R.R.; PERRELLI, K.R.; XIMENES, E. C. P. A. Atividade antiestafilocócica de extratos secos de três espécies da família myrtaceae. **XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. São Paulo, 2008.

LIMA, H.C.; GUEDES-BRUNI, R.R. Diversidade de plantas vasculares na reserva ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H.C. de; GUEDES-BRUNI, R.R. (eds.) **Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 28-39. 1997.

LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. ; SOBRAL, M. ; MORENO, P. R. H. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas da família Myrtaceae nativas do estado de São Paulo. In: **XIX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS**. 2006.

LINARES-RODRÍGUEZ, J.F, MARTÍNEZ-MENÉNDEZ, J.L. Antimicrobial resistance and bacterial virulence. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**. Madrid, v. 23; n. 2; p. 86-93. 2005.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S.L.; DEANS, S.G. Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka* and *Kunzea ericoides* or *Kanuka*), originating in Australia and New Zealand. **Phytotherapy Research** 14: 623-629. 2000.

LITTLEJOHN, T.G.; PAULSEN, I.T.; GILLESPIE, M.T.; et al. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology letters**. v. 74; p. 259–265. 1992

LIVERMORE D.M.; MUSHTAQ S.; JAMES, D. et al. *In vitro* activity of piperacillin/tazobactam and other broad-spectrum antibiotics against bacteria from hospitalised patients in the British Isles. **International journal of antimicrobial agents** v. 22; p. 14–27. 2003

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. 1ª Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de estudos da flora Ltda, 2002. 544 p.

LOURENÇO, M.V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **O biológico** v. 65; n. 1; p. 63-65. 2003

LYON, B.R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiology Reviews** 51: 88-134. 1987.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3. 2002.

MAGASSOUBA, F.B.; DIALLO, A.; KOUYATÉ, M. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**. v. 114; p. 44-53. 2007.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 23, p. 24-28, 1999.

MARINHO, V.M.C; SEIDL, P.R.; LONGO, W.P. The biological diversity - a potential source of competitive advantage for brazilian pharmaceutical industry. **Espacios**, v. 29; n. 1; p. 49-67. 2008.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C., DIAS; J.E. **Plantas medicinais** Viçosa: Editora UFV, 1994. 220p.

MELO, G.B.; MELO, M.C.; GAMA, A.P.; et al. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian journal of microbiology**. v. 36; p. 126-130. 2005.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. v 1. Oxford: Clarendon Press, 1950. 1500p.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations **Naturwissenschaften**, n.48, p.569-570, 1961.

MOLNAR, J., MOLNAR, A., SPENGLER, G., MANDI, Y.: Infectious plasmid resistance and efflux pump mediated resistance. **Acta microbiology immunology hungarian journal**. v. 51; n. 3; p. 333-349. 2004

MONTARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOORE, M.R.; PERDREAU-REMGTON, F.; CHAMBERS, H.F. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. Antimicrobial agents chemotherapy. v. 47; p. 1262-1266. 2003.

MORITA, J.E.; FUJIOKA, R.S.; TICE, A.D.; et al. Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in healthy college students, Hawai'i. **Hawaii medical journal**. v. 66; n. 8; p. 213-215. 2007.

MULLIGAN, M.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. **American journal of medicine**. v. 94; p. 313-328. 1993

MUROI, H.; KUBO, I. Bactericidal effects of anacardic acid and totarol on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 1925-1926. 1994

MUSTAKALLIO, K. K.; AHOS, E. O. Tetrazolium reduction test for milk. **Science**, v. 122; p. 971-972. 1955

NABER, C.K. *Staphylococcus aureus* bacteremia: Epidemiology, pathophysiology, and management strategies. **Clinical and infectious disease**. v. 48; p. 231–237. 2009

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**. v. 31; n. 4; p. 247-256. 2000.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol . **FEMS Microbiology Letters**. v. 230; p. 191-195. 2004.

OLAJIDE O.A; AWE, S.O; MAKINDE, J.M Pharmacological studies on leaf of *Psidium guajava*, **Fitoterapia** v. 70; p. 25–31. 1999.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**. São Paulo, v.1, p. 49-58. 2003

PALAVECINO, E. Clinical, epidemiological, and laboratory aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. **Methods in molecular biology**. v. 391; p. 1-19. 2007

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; NOSTRO, A.L. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control** v. 18; p. 196–200. 2007

PESEWU, G.A.; CUTLER, R.R.; HUMBER, D.P. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology* v. 16; n. 1; p. 102-111. 2008

PICAO, R.; SADER, H.; JONES, R.; et al. Analysis of resistance and vancomycin 'reverse creep' in Latin America *Staphylococcus aureus*: ten-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2006). **Clinical Microbiology Infection**. v. 14: S173. 2008

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; Lopes, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. **Química Nova**, v. 25; 45. 2002

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 2.ed.1984.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1994. 320 p.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; et al. Estudo Farmacognóstico De *Croton Rhamnifolius* H.B.K. E *Croton Rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RASEIRA, A. e RASEIRA, M.C.B. Cultivar de araçazeiro lançada pela EMBRAPA/CPACT. *Hirti Sul, Pelotas*, v.3, n.1, p.37-39, 1994.

REITZ, C. D; KLEIN, R. **Mirtáceas (Flora Ilustrada Catarinense)**. Herbário Barbosa Rodrigues. SANTA CATARINA, 1977. 158.p

RENAU, T.E.; R. LEGER, E.M.; FLAMME, J.; et al. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. **Journal of medicinal chemistry**. v. 42; p. 4928-4931. 1999.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of clinical microbiology**. v. 43; n. 4; p. 1985-1988. 2005

RÍOS, J.L; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100; p. 80-84. 2005.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROBERTS, E. A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; WOOD, D.J. Flavonols of tea. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, n. 7; p. 637-646. 1956.

ROCCARO, A.S., BLANCO, A.R., GIULIANI, F.; et al. Epigallocatechin gallate enhances the activity of tetracycline in *Staphylococci* by inhibitory its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 48, 1968–1973. 2004

ROSALES-REYER, T.; de la GARZA, M.; ARIAS-CASTRO, C. et al. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 115: 381-386. 2008

SADER, S.H.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the

SAKHARKAR, M.K.; JAYARAMAN, P.; LIM, C.S. et al. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. **International Journal of Biological Science** 6(6): 556-68. 2010

SALIB, J.Y.; MICHAEL, H.N. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. **Phytochemistry**. v. 65; p. 2091–2093, 2004.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial* v. 43; n. 6; p. 413-23. 2007.

SANTOS, E. B; SLUSARZ P. A. A., KOZLOWSKI JÚNIOR, V. A, SWARTZ, J. P. Eficácia antimicrobiana de produtos naturais frente a microorganismos causadores da endocardite bacteriana **Biological Health Science**. V. 13; p. 67-72. 2007

SARTORATTO A; MACHADO, ALM; DELARMELINA, C. ET AL. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 35:275-280. 2004

SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (Acmela brasiliensis) (ASTERACEAE), **Pharmazie**, v.58, n.8, p.567-9, 2003.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.T.; RASKIN I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism** v. 57; S3-S9. 2008.

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian journal of infectious diseases**. v. 5; n. 4; p. 200- 214. 2001

SHELDON, A.T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical laboratory science**. v. 18; p. 170–180. 2005.

SHIMIZU, M.; SHIOTA, S.; MIZUSHIMA, T.; et al. Marked potentiation of activity of b-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 45; p. 3198–3201. 2001.

SIERADZKI, K.; TOMASZ, A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology** v. 185. p. 7103-10. 2003

SILVA, J.A.; SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.N. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília, DF: EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados - CPAC, 1994. 166 p.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Empresa das Artes, 1996. 230 p.

SILVEIRA, L.M.S.; ROSAS, L.S.; OLEA, R.S.G.; et al. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39; n. 4; p. 299-301, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis/Porto Alegre; Ed. Da UFSC, 1999.

SLOWING, K.; SÖLLHUBER, M.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Flavonoid glycosides from *Eugenia jambos*. **Phytochemistry** 37: 255-258. 1994

SPELLBERG, B.; POWERS, J.H.; BRASS, E.P.; et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical and infection diseases**. v. 38; p. 1279-1286. 2004

STAVRI, M.; PIDDOCK, L.J.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pumps inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 59: 1247-1260. 2007

STEFANI, S., VARALDO, P.E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. **Clinical microbiology infections** v.9; p. 1179-1186. 2003

STERN, J. L.; HAGERMAN, A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, P.K. Phlorotanninprotein interactions. **Journal of chemical ecology**. v. 22; p. 1887–1899. 1996.

STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. **Collegium**, p.483-499, 1912.

SURESH, B.S., DHANARAJ, S.A., ELANGOSRIRAM, K., CHINNASWAMY, K., 1997 Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. **Journal of ethnopharmacology**. v. 55; p. 151–159. 1997

TACCONELLI, E.; DE ANGELIS, G.; CATALDO, M.A.; et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. v. 61; n. 1; p. 26-38. 2008

TAKAHASHI, O.; CAI, Z.; TODA, M.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Appearance of antibacterial activity of oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the presence of catechin. **Kansenshogaku Zasshi** v. 69; p. 1126–1134. 1995.

TAVARES, W. **Pequena história sobre os antimicrobianos**. **Arquivos Brasileiros de Medicina**. Rio de Janeiro, v. 59, n. 3. 1985.

TENOVER, F.C.; MC DONALD, L.C. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: Epidemiology and control. **Current opinion in infection disease**. v. 18; p. 300–305. 2005

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 27–34. 1996.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

TVERDEK, F.P.; CRANK, C.W.; SEGRET, J. Antibiotic therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care, **Critical Care Clinics**. v. 24; n. 2; p. 249-60. 2008.

URS, N.V.R.R.; DUNLEAVY, J.M. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds. **Phytopathology**, v. 65; p. 686–690. 1975.

VELAZQUEZ-MEZA, M.E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Publica de Mexico**. v. 47; p. 381–7. 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova** v. 28, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.R – Os Produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29; n. 2; p. 326-337. 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis*. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. v. 16; n. 2-3; p. 97-110. 2009

WANG, L.; BARRETT J.F. Control and prevention of MRSA infections. **Methods in Molecular Biology**. v. 391; p. 209-225. 2007.

WANG, R.; BRAUGHTON, K.R.; KRETSCHMER, D.; et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. **Natural medicine**. v. 13; p. 1510-1514. 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Policy perspectives on medicines: medicina tradicional – necesidades crecientes y potencial**. Geneva, 2002.

WITTE, W.; MIELKE, M. Community MRSA [in German]. **Zentralbl Chir**. v. 132; n. 2; p. 124-129. 2007.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced drug delivery reviews**. v. 57; p. 1451–1470. 2005

XAVIER, H.S. et al. **Contribuição à caracterização dos taninos hidrolisáveis. Recife, 53 Congresso Nacional de Botânica**. Resumos p. 20, 2002.

YOSHIDA, H., BOGAKI, M., NAKAMURA, S.; et al. Nucleotide sequence and characterization of *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of bacteriology**. v. 172; p. 6942–6949. 1990.

ZHAO, W.H.; HU, Z.Q.; OKUBA, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Mechanism of synergy between epigallocatechingallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 45; p. 1737–1742. 2001

ANEXOS

***In vitro* Synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains**

Tiago Gomes Fernandes¹, Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita¹,

Karina Perelli Randau², Eulália Azevedo Ximenes^{1*}

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos

²Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia
Universidade Federal de Pernambuco
CEP- 50670-901 Recife, Pernambuco- Brasil

*Corresponding author:

Mailing address:

Eulália Azevedo Ximenes
Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos, Centro de Ciências Biológicas,
Departamento de Antibióticos- Universidade Federal de Pernambuco
CEP- 50670-901 Recife, Pernambuco- Brasil
Tel.: +55-8121268347; fax: +55-8121268346.
E-mail address: eulaliaximenes@yahoo.com.br

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of aqueous extract of *Psidium guineense* Swartz (Araçá-do-campo) and five antimicrobials (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ciprofloxacin, and meropenem), against twelve strains of *Staphylococcus aureus* which resistance phenotype was previously determined by the disk diffusion method. Four *S. aureus* strains (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) showed resistance to all antimicrobial agents tested and were selected for the study of the interaction between aqueous extract of *P. guineense* and antimicrobial agents, by the checkerboard method. The criteria used to evaluate the synergic activity were defined by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). All *S. aureus* strains were susceptible to *P. guineense* as determined by microdilution method. The combination of the *P. guineense* extract with the antimicrobial agents resulted in an eight-fold reduction in their MIC, which fractional inhibitory concentration index (FICI) ranged from 0.125 to 0.5, suggesting a synergic interaction against multi-drug resistant *S. aureus*. The combination of the aqueous extract of *P. guineense* with cefoxitin showed the lowest FICI values. This study demonstrated that the aqueous extract of *P. guineense* combined with beta lactamics antimicrobials, fluoroquinolones and carbapenems, acts synergistically inhibit multidrug resistant *S. aureus*.

Keywords: *Psidium guineense*; multidrug resistant *Staphylococcus aureus*; Checkerboard; Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC Index)

INTRODUCTION

The widespread emergence of bacteria resistance to a large number of antimicrobial agents poses major health problems because of difficulties in treatment [1]. *Staphylococcus aureus* is an important pathogen both in community acquired and nosocomial infections, and a common etiological agent of infections of many different tissues and organs (e.g. furuncle, carbuncle, abscess, myocarditis, endocarditis, pneumonia, meningitis, bacterial arthritis and osteomyelitis) [2]. The multidrug resistant *Staphylococcus aureus* strains now pose serious problem to hospitalized patients, and their care providers, because has numerous strategies for resisting the action to practically all antimicrobial agents [3]. Thus, it is extremely important to find new antimicrobial agents or new ways for the treatment of infectious diseases caused by multidrug resistant microorganisms [4].

The screening of plant extracts and phytochemicals for antimicrobial activity has shown that higher plants, in special their secondary metabolites, are a source to provide structurally diverse bioactive compounds with different pharmacological activities, including antimicrobials [5].

According to [6], the plants-derived antimicrobial are less potent, and it hence the need to adopt a synergic interaction between its bioactive compounds to combat infections. Based on this knowledge, several studies have been published using crude plant extracts or phytochemicals combined with antimicrobial agents. These combinations can enhance the efficacy of the antimicrobial agents, and are an alternative to treat infections caused by multidrug resistant microorganisms, which no effective therapy is available [4,7,8].

Psidium guineense Swartz (Myrtaceae), popularly known as “araçá”, is a shrub native and widely dispersed throughout Tropical America. In Brazil, it mainly occurs across the coastline [9,10].

Few studies have searched the phytochemical profile and pharmacological activity of this plant, although it is widely used in folk medicine in Tropical America to treat infections of the gastrointestinal and genitourinary tract [11]. These authors associated the presence, in the fruits and leaves of *P. guineense*, mainly flavonoids and tannins, effective against *Streptococcus mutans* strains.

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of the aqueous extract of *P. guineense* and determine the synergistic potential of the combination of this extract with five antimicrobial agents against multi-resistant *S. aureus* strains.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extract preparation

The plant materials used in this study consisted of *Psidium guineense* Swartz (leaves) that were collected in November/2009 from Moreno city – Pernambuco - Brazil, (08°07'07" S - 35°05'32" W). This plant was identified by the biologist Olivia Cano, a voucher specimen was deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima - Instituto Agronômico de Pernambuco and registered under number 83.564.

The leaves were air-dried for two weeks and then ground into fine powder using an electric dry mill. A total of 50g of the ground powder was soaked in 1000 ml of distilled boiled water and extracted exhaustively at room temperature for 48 hours. The extracts were filtered through Whatman No. 2 filter paper. The aqueous extract was lyophilized to obtain a dry powder extract.

Phytochemical screening

The preliminary phytochemical screening was carried out for various secondary metabolites present on aqueous extract of *P. guineense* using standard procedures [12,

[13,14]. The chromatographic analyses were made by TLC on Si gel (MERCK-Germany, 105553) developed by different solvent systems: [EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O (100: 11 :11 : 26, v/v)], [n-BuOH-Me₂CO-buffer phosphate pH = 5.0 (40 : 50 : 10 v/v)] appropriate reveals and chromatographic patterns. It was investigated the presence of saponins, sugars, flavonoids, tannins, phenylpropanoids, alkaloids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins and iridoids.

Bacterial strains and inoculum standardization

S. aureus strains (n=11) were isolated from clinical specimens and food. The standard strain used was *S. aureus* ATCC 25923. Strains were isolated in sheep blood agar and after identification they were stored in brain heart infusion (BHI) plus glycerol 20% v/v [15]. The *S. aureus* strains used in this study showed a resistance phenotype, by diffusion method, to several antimicrobial agents such as beta-lactams, aminoglycosides, macrolides, fluoroquinolones and tetracycline, chloramphenicol, lincosamides. These strains were cultured into Mueller Hinton Agar (MHA) (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) and incubated at 37°C for 18 hours. Isolated colonies were selected and inoculated into Mueller-Hinton broth (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) to turbidity comparable to that of 0.5 McFarland standard, which is equivalent to a bacterial count of approximately 10⁸ CFU/mL. After that, the bacterial suspension was diluted in saline (1:10) to obtain a final inoculum (10⁷ CFU/ mL).

Antimicrobial Agents

The standard reference powder of ampicillin; amoxicillin/clavulanic acid; cefoxitin; ciprofloxacin; gentamicin and meropenem were provided by Eurofarma Laboratório LTDA - Brazil. Resistance was defined for each case: ampicillin (AMP, MIC ≥ 0.25µg/mL);

amoxicillin/clavulanic acid (AMC, MIC $\geq$ 8 μ g/mL); cefoxitin (CFO, MIC $\geq$ 4 μ g/mL); ciprofloxacin (CIP, MIC $\geq$ 4 μ g/mL); gentamicin (GEN, MIC $\geq$ 8 μ g/mL and meropenem (MER, MIC $\geq$ 16 μ g/mL)

Antimicrobial activity

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) test was performed by the microdilution broth method, following the recommendations established by Clinical Laboratory Standards Institute, [16], with some modifications. Serial two-fold dilutions of aqueous extract of *P. guineense* and antimicrobial agents were prepared in sterile 96-well microplates containing Mueller Hinton broth (MHB). Five microliters of bacterial suspension were inoculated in each well to give a final concentration of 10⁴ CFU/mL. *P. guineense* extract and antimicrobial agents concentrations ranged from 7.25 to 1000 μ g/mL and 3.12 to 400 μ g/mL respectively. The growth inhibition was demonstrated by optical density at 630nm using a microplate reader (Thermo plate - TP Reader[®]). Considering the total growth (100%) in the control well (MHB+bacteria), the percentage of growth reduction was attributed to the remaining wells. The MIC was reported as the lowest concentration of *P. guineense* extract or antimicrobial agents that inhibited the bacterial growth after 24 h of incubation at 37°C. In order to determine the Minimal Bactericidal Concentration (MBC), the contents of the well that showed higher or equal than 70% of growth inhibition were seeded into MHA. After 24h of incubation at 37°C, the number of surviving *S. aureus* was determined. The MBC was defined as the lowest extract concentration at which 99, 9% of the bacteria have been killed. All the experiments were carried out in duplicate on two different days.

Determination of *in vitro* synergic activity

Combinations of *P. guineense* and antimicrobial agents were tested by the checkerboard method. The appropriate dilution of *P. guineense* extract and antimicrobial agents were performed into MHB. From these dilutions, one hundred microliters were added in 96-well microplates to obtain final concentration equal to MIC or six dilutions lower than MIC to *P. guineense* and nine dilutions lower than MIC to antimicrobial agents. Each well received 5 μ L of the bacterial suspensions (10^7 CFU/mL). Plates were incubated for 24 hours. Interpretation of the data was achieved by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI) as follows: (MIC of *P. guineense* in combination with antimicrobial agents/MIC of *P. guineense*) + (MIC of antimicrobial agents in combination with *P. guineense*/MIC of antimicrobial agents). The combination was considered to be synergistic when the FICI was ≤ 0.5 ; additive when it was 0.5 to ≤ 1 and antagonistic when ≥ 2 [17].

RESULTS

Phytochemical profile

The phytochemical profile from the *Psidium guineense* extract showed the presence of tannins, flavonoids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, and sugar. In the other hand, it wasn't verified the presence of alkaloids, phenylpropanoid and saponins. The aqueous extract yielded 3.7% (w/w) over 50g of leaves of *P. guineense*.

Antimicrobial activity

MIC and MCB values of *P. guineense* extract and of the ampicilin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ciprofloxacin, gentamicin and meropenem against twelve *S. aureus* strains are shown in table 1.

The aqueous extract of *P. guineense* showed a strong activity against all *S. aureus* strains with MIC values between 250 and 500 µg/mL. The *S. aureus* strains revealed a resistance profile against most antimicrobial agents tested, in particular to the beta-lactam antibiotics. The MIC values for ampicillin and cefoxitin ranged from 3.12 to 400 µg/mL which showed to be less effective against *S. aureus* strains tested. For amoxicillin/clavulanic acid such values ranged from 3.12 to 50 µg/mL. Among all *S. aureus* strains tested, seven showed to be resistant to ciprofloxacin. For meropenem MIC values ranged from 3.12 to 25 µg/mL. All strains showed to be sensitive to gentamicin, except (LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33). Four strains of *S. aureus* (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) showed resistance to all antimicrobial agents tested and they were selected for the study of the interaction between *P. guineense* extract and antimicrobial agents. The values of MCB were higher than MIC in one dilution.

Table 1 - MIC/MBC of the aqueous extract of *Psidium guineense* and antimicrobial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* strains.

<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC/ MBC (µg/mL)							Resistance Phenotype ¹
	AMC	AMP	CEF	CIP	GET	MER	AE	
ATCC 25923	3.12/6.24	3.12/6.24	3.12/6.24	3.12/6.24	0.39/0.78	3.12/6.24	250/500	Control strain
LFBM 01	25.0/50.0	400/800	400/800	50.0/100	12.5/25.0	25.0/50.0	250/500	AMC, CFO, CIP, GET
LFBM 05	6.25/12.5	100/200	25/50.0	3.12/6.24	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500	AMP, AZI, CFO, PEN
LFBM 08	3.12/6.24	100/200	12.5/25.0	3.12/6.24	3.12/6.24	6.25/12.5	250/500	AMP; AZI, CIP, CFO
LFBM 16	12.5/25.0	25.0/50.0	12.5/25.0	3.12/6.24	3.12/6.24	6.25/12.5	250/500	AMP, AZI, CFO, PEN
LFBM 26	50.0/100	400/800	400/800	50.0/100	25.0/50.0	25.0/50.0	250/500	AMC, AMP, CFO, CIP
LFBM 28	25.0/50.0	400/800	100/200	50.0/100	25.0/50.0	12.5/25.0	250/500	AMC, CIP, CFO, GET
LFBM 29	12.5/25.0	50.0/100	25/50.0	3.12/6.24	3.12/6.24	12.5/25.0	500/1000	AMC, AMP, CFO, PEN
LFBM 30	12.5/25.0	200/400	12.5/25.0	50.0/100	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500	AMC, AMP, CFO, CIP
LFBM 31	12.5/25.0	100/100	12.5/25.0	50.0/100	3.12/6.24	6.25/12.5	250/500	AMP, AZI, CFO; CIP;
LFBM 32	12.5/25.0	200/200	12.5/25.0	50.0/100	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500	AMP, CFO, CIP, PEN
LFBM 33	12.5/25.0	200/200	200/200	50.0/100	3.12/6.24	12.5/25.0	250/500	AMC, AMP, CFO, CIP

MIC: Minimal inhibitory concentration; MBC: Minimal bactericidal concentration; ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; AMC: Amoxicillin/clavulanic acid; AMP: Ampicillin; AZI: Azithromycin; CFO: Cefoxitin; CIP: Ciprofloxacin; GET: Gentamicin; PEN: Penicillin; MER: Meropenem; AE: Aqueous extract of *P.guineense*; ¹Resistance phenotype determined by disk-diffusion method

Determination of in vitro synergic activity

The MICs obtained by the combination of the aqueous extract of *P. guineense* with ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ciprofloxacin and meropenem, against *S. aureus* strains (LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 33) are listed in Table 2. The minimal inhibitory concentrations of *P. guineense* extract (250 µg/mL) enhanced the antistaphylococcal activity of all antimicrobial agents. The synergistic activity was detected by an eight-fold decrease in the MIC of the antimicrobial agents in the combination and determined by the $FICI \leq 0.5$.

The combination of the aqueous extract of *P. guineense* and cefoxitin showed the lowest FICI which values ranged from 0.125 to 0.5. The MIC of cefoxitin (individual MIC 100 – 400 µg/mL) was lowered to 1/512 (combined MIC ranged 0.19- 0.78 µg/mL), when it was used in combination with the aqueous extract of *P. guineense* (MIC 250 µg/mL). For *S. aureus* LFBM 26 and LFBM 33 strains, this combination was also efficient on reducing the MIC of *P. guineense* extract to 1/8 x MIC (31.25µg/mL) or 1/4 x MIC (62.25 µg/mL) respectively.

The inhibition of the growth of all the *S. aureus* strains by meropenem was enhanced by *P. guineense* extract (FICI 0.5). This combination was more effective against LFBM 28 (FICI 0.25) which individual MIC of *P. guineense* (250 µg/mL) lowered to 1/4 x MIC.

For *S. aureus* LFBM 33 strain, the MIC value of ciprofloxacin (individual MIC 50 µg/mL) was lowered to 0.78 µg/mL when combined with *P. guineense* extract (1/4 x MIC) enhancing the antistaphylococcal activity of this fluoroquinolone (FICI 0.25). All other combinations of the aqueous extract of *P. guineense* with antimicrobial agents demonstrated synergistic activity, enhancing its activity, with FICI 0.5.

Table 2. Combination testing of the aqueous extract of *Psidium guineense* with antimicrobial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	Combination	Individual MIC (µg/mL)	Combination MIC (µg/mL)	Individual FIC	FICindex (FICI)	Interpretation	% MIC reduction	% reduction of viable cells ¹
LFBM 01	AE + AMC	250/25	125/0.048	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	80.21
	AE + AMP	250/400	125/0.78	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	84.43
	AE + CFO	250/400	125/0.78	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	87.04
	AE + CIP	250/50	125/0.09	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	93.49
	AE + MER	250/25	125/0.048	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	84.24
LFBM 26	AE + AMC	250/50.0	125/0.78	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	88.82
	AE + AMP	250/400	125/0.78	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	83.58
	AE + CFO	250/400	31.25/0.78	0.125/0.002	0.125	Synergic	87.5 / 99.8	80.90
	AE + CIP	250/50.0	125/0.09	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	94.59
	AE + MER	250/25	125/0.048	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	80.76
LFBM 28	AE + AMC	250/12.5	125/0.024	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	83.38
	AE + AMP	250/400	125/0.78	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	89.71
	AE + CFO	250/100	125/0.19	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	86.91
	AE + CIP	250/50.0	125/0.09	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	94.45
	AE + MER	250/25.0	62.5/0.048	0.25/0.002	0.25	Synergic	75.0 / 99.8	89.08
LFBM 33	AE + AMC	250/12.5	125/0.024	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	78.89

AE + AMP	250/200	125/0.39	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	76.72
AE + CFO	250/200	62.5/0.39	0.25/0.002	0.25	Synergic	75.0 / 99.8	81.53
AE + CIP	250/50.0	62.5/0.78	0.25/0.002	0.25	Synergic	75.0 / 99.8	94.09
AE + MER	250/12.5	125/0.024	0.5/0.002	0.5	Synergic	50.0 / 99.8	81.84

MIC: Minimal inhibitory concentration; FIC: Fractional inhibitory concentration; AMC: Amoxicillin/clavulanic acid; AMP: Ampicillin; CFO: Cefoxitin; CIP: Ciprofloxacin; MER: Meropenem; AE: Aqueous extract of *P. guineense*; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos

¹Combination of extract (1/2 MIC) and antibiotics (1/512 MIC)

DISCUSSION

Phytochemicals have great potential as antimicrobial compounds, and have been proven to have great therapeutic potential [18]. Some secondary metabolites have the ability to increase the susceptibility of the microorganism. When used in combination, these metabolites have the potential to either inhibit the modified targets or exhibit a synergy by blocking one or more of the targets in the metabolic pathway, acting as a modifier of multidrug resistance mechanisms [6].

Several studies have investigated the interactions between antibiotics and phytochemicals or crude extracts against multidrug resistant *S. aureus* strains [4,7,8,19].

In the Myrtaceae family there is a large variety of phytochemicals with antimicrobial activity which include, terpenes present in essential oils, flavonoids, [20] and tannins [21].

The genus *Psidium* is native to America but are worldwide distributed. Their specimens are traditionally used in the prevention or treatment of a large number of diseases. Preparations of twigs or leaves of *Psidium* species are extensively used for the control of gastrointestinal and respiratory disorders as well as in the treatment of skin damage [22].

Ethnopharmacological evaluation demonstrated the antimicrobial activities of *Psidium* spp. that explain its use for the treatment of infectious diseases of the digestive, respiratory, urinary tract as well as the skin and soft tissues [23]. Within this genus, *P. guajava* is the most studied and used specie [24]. Thus, we are interested in *P. guineense*, an indigenous plant to Brazil, because it is characterized by its ample spectrum of uses including gastrointestinal disorders, infection of the genitourinary tract, treatment of colds, bronchitis, ulcers [11].

According to Sartorato et al. 2004[25], strong activity is for MIC values between 50 – 500 µg/mL, moderate activity MIC values between 600 – 1500 µg/mL and weak activity above 1500 µg/mL. Comparing with literature results the aqueous extract of *P. guineense* (250 – 500 µg/mL) has a strong activity against multidrug resistant *S. aureus* strains tested.

The phytochemical analyses from the leaves of *P. guineense* indicated the presence of flavonoids, hydrolysable and condensed tannins, and essential oils distributed throughout the leaf tissue. These results are in agreement with those obtained in the present study[26].

González et al. 2005 [11], associated the presence of the flavonoids, mainly avicularin, quercetin and guaijaverin present in the ethanolic extract of *P. guineense*, with the activity against clinical isolated *Streptococcus mutans* strains.

The flavonoids has the ability of complexing with proteins and bacterial cells forming irreversible complexes, mainly, with nucleophilic amino acids. This complex often leads to inactivation of the protein and loss of its function [27].

Tannins are not crystallizable substances, and in the aqueous system form colloidal solutions. The antimicrobial activity of tannins can be summarized as follows (i) binding with proteins and adhesins, inhibiting enzymes, (ii) complexation with the cell wall and metal ions and (iii) disruption of the plasmatic membrane [27, 24].

Synergism of natural products and antimicrobial agents is a thrust area of phytomedicinal research, developing novel perspective of phytopharmaceuticals. The synergism of plant derived compounds and antimicrobial agents has been evaluated previously against pathogenic microorganisms. The approach is not exclusive for extract combinations, since effective combinations between single natural products, essential oils or extracts with chemosynthetics or antibiotics have been described [6,28].

In addition to achieving these synergistic effects, combinations of two or more compound for the following reasons: (1) to prevent or suppress the emergence of resistant strains, (2) to decrease dose-related toxicity, as a result dosage, (3) to attain the broad spectrum of activity [17].

In this study, a growth inhibitory effect of *P. guineense* extract on multidrug resistant *S. aureus* was observed for the combinations with beta-lactams, carbapenems, and fluroquinolones.

The combination of *P. guineense* extract and beta-lactam may help to reduce the amount of antimicrobial agent used and deliver a medicine with similar or greater potency as antimicrobial. More importantly, since phytochemicals are structurally different from antimicrobial agents and often have different modes of action, they may provide novel means of studying the mechanisms of bacterial control at a molecular level. With the increase prevalence of multidrug resistant *S. aureus*, synergism testing using various combinations of phytochemicals with antimicrobial agents could be a powerful tool to aid selection of appropriate antimicrobial therapy [6, 28].

The indiscriminate use of antimicrobial agents in the treatment of bacterial infections has led to the emergence and spread of resistant strains, and such loss of clinical efficacy of previously effective first-line antimicrobials results shifting of antimicrobial treatment regimen to second-line or third-line antimicrobial agents that are often more expensive with many side effects [29]. Based upon the fact the ability of crude extracts of plants to enhance the activity of antimicrobial agents have been studied [4,7,8].

There is a wide list of phytochemical which act as inhibitors and a few of them are glycosylated flavones suppressing topoisomerase IV activity, myricetin inhibiting DnaB helicase, allicin inhibiting RNA synthesis. Corilagin, a polyphenol from *Arctostaphylos uva-ursi* is found to markedly reduce the MIC of beta-lactam agents against MRSA. According to Hemaiswarya et al. 2008[6], there are two possibilities regarding the mechanism of action of corilagin, namely inhibition of penicillin binding protein (PBP2a) activity or inhibiting its production.

The polyphenol epigallocatechin gallate (EGCg) from green tea, was achieved to be synergic with beta-lactam agents since both attacked the same target site namely, peptidoglycan. EGCg inhibits the penicillinase produced by *S. aureus* thereby restoring the activity of penicillin. The combination of EGCg with ampicillin/sulbactam reduced the MIC₉₀ to 4 µg/mL from initial value of 16 µg/mL [6].

Hatano et al. 2005[30], investigated the synergic activity of two proanthocyanidins isolated from the fruits of the *Zizyphus* genus. Although the MICs of these polyphenols were 512-1024 µg/mol, both reduced the MIC for oxacyllin to 1/2 - 1/16 of those in the absence of the polyphenols.

It is interesting to note that most of plant secondary metabolites have weak antimicrobial activity, several orders of magnitudes less than that of common antimicrobial agents produced by bacteria and fungi. In spite of the fact that plant-derived antimicrobials are less potent, plants fight infections successfully. Hence, it becomes apparent that plants adopt a synergistic mechanism between their compounds [28].

According to Rosales-Reyes et al. 2005[31], the use of the crude extract for our study was intentional and based on the belief that it would represent the nearest from traditional preparations.

Therefore, it is speculated that the efficacy of a crude extract may be due to the interplay between the different active constituents that may be present in the extract leading to better activity and/or decrease in potential toxicity of some individual constituents [32].

CONCLUSION

An antibacterial effect of *P. guineense* extract and a synergic effect in combination with antimicrobial agents might be an interesting alternative therapy for infection disease caused by multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. However, more studies need to be

conducted to search for this plant before being used in new therapeutics treatments, should have their toxicity tested *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting the fellowship, as well as the financial support and infrastructure provided by the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) which made this study possible.

REFERENCES

1. Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, et al. 2009. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int. J. Antimicrobiol. Agents* 34(4): 304-308.
2. Nostro A, Blanco A.R, Cannatelli M.A, et al. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 191-195.
3. Mulligan, M.E. 1993. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am. J. Med.* 94: 313-328.
4. Adwan M.G, Abu-Shanab A.B, Adwan M.K. 2008. *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. *Pak. J. Med. Sci.* 24: 541-544.
5. Chung P.Y, Navaratnam P., Chung L.Y. 2011. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10(1):25

6. Hemaiswarya S, Kruthiventi A.K, Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomed.* 15: 639 – 652.
7. Betoni J.E.C, Mantovani R.P, Barbosa L.N, et al. 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 387-390.
8. Esimone C.O, Roha I.R, Ibezim E.C, et al. 2006. *In vitro* evaluation of the, interaction between tea extracts and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Biot.* 5: 1082-1086.
9. Pio Corrêa, M. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 2. ed. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
10. Silva J.A, Silva D.B, Junqueira N.T.V, Andrade L.R.N 1994. *Frutas nativas dos cerrados*. Brasília, DF: EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados-CPAC.166 p.
11. González A.M.N, Gonzalez M.B.R, PINTO N.L.S. 2005. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. *Rev. Cubana Plant. Med.* 10: 3-4.
12. Roberts E.A.H, Cartwright, R.A, Wood D.J. 1956. Flavonols of tea. *J. Sci. Food Agr.* 7: p.637-646.
13. Wagner H, BLADT S. 1996. *Plant drug analysis*. 2.ed. New York: Springer Verlag.
14. Harborne J.B. 1998. *Phytochemical methods*. 3.ed. London: Chapman & Hall.
15. Koneman, E. W. et al. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565 p. 2008.
16. CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. 2010. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S20*.

17. Stavri M, Piddock L.J, Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pumps inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 1247-1260.
18. Gibbons S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21: 263-277.
19. Hernández N.E, Tereschuk M.L, Abdala L.R. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). *J. Ethnopharmacol.* 73: 317-322.
20. Djipa C.D, Delmee M, Quentin-Leclercq J. 2000. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 71:307-313.
21. Caceres A., L. Fletes, L. Aguilar. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *J. Ethnopharmacol.* 38: 31-38.
22. Di Stasi L.C, Hiruma-Lima CA. 2002. *Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica*. 2 ed. Ed. UNESP, São Paulo: 323 - 331.
23. Aguilar A, Argueta A, Cano L. 1994. *Flora Medicinal Indígena de México*. Instituto indigenista de México. 245p.
24. Sartoratto A, Machado A.L.M, Delarmelina C. et al. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35:275-280.
25. Ferreira, R.B, et al. 2011. Morphoanatomy, Histochemistry and Phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) Leaves. *J. Pharm. Res.* 4(4) 942-944.
26. Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-582.
27. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. *Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals*. *Phytomed.* 16(2-3): 97-110.

28. Eliopoulos G.M, Moellering R.C Jr. 1996. Antimicrobial combinations. *In Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co: 330-338.
29. Mandal S, Deb Mandal M, Pal NK. 2010. Synergistic anti-*Staphylococcus aureus* activity of amoxicillin in combination with *Emblica officinalis* and *Nymphae odorata* extracts. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 3: 711-71
30. Hatano T, Kusuda M, Inada K. 2005. Effect of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochem.* 66: 2047–2055.
31. Rosales-Reyes T, de la Garza M, Arias-Castro C. et al. 2008. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *J. Ethnopharmacol.* 115: 381-386.
32. Birdi T, Daswani P, Brijesh S, et al. 2010. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. *BMC Complement. Altern. Med.* 10: 33