



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de 21/10/1966 – São Luís – Maranhão

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE- (PPGCS)

MESTRADO ACADÊMICO



PÂMELA GOMES SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Anacardium*
occidentale FRENTE A BACTÉRIAS DO GRUPO ESKAPE**

São Luís - MA

2024

PÂMELA GOMES SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Anacardium*
occidentale FRENTE A BACTÉRIAS DO GRUPO ESKAPE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís - MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Gomes Santos, Pâmela.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Anacardium occidentale*
FRENTE A BACTÉRIAS DO GRUPO ESKAPE / Pâmela Gomes Santos.
- 2024.
70 f.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís- Ma, 2024.

1. Antibiótico. 2. Antivirulência. 3. *Staphylococcus*
Aureus. 4. *Mrsa*. I. Nassar Meireles Guerra, Rosane. II.
Título.

PÂMELA GOMES SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Anacardium*
occidentale FRENTE A BACTÉRIAS DO GRUPO ESKAPE**

Dissertação apresentada a banca de defesa do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Aprovado em: 29/11/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Rachel Melo Ribeiro
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Aluísio da Silva Oliveira
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Universidade Federal do Maranhão
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero expressar minha profunda gratidão a Deus por ter concedido esta bênção em minha vida e por me fortalecer ao longo deste caminho desafiador. Apesar de todas as adversidades, Sua presença sustentadora e inspiradora foi o farol que me guiou. Toda honra e glória ao Senhor por Sua inabalável graça e misericórdia.

À minha amada família, meu pai Carlos, minha irmã Paloma, meu irmão Michael, minha mãe Claudinéia e minha avó Teodora, expresso minha eterna gratidão pelo apoio inabalável, tanto emocional quanto financeiro, ao longo desta jornada. Vocês foram fundamentais para esta conquista e por isso lhes sou profundamente grata.

À minha orientadora, a professora Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra, sou imensamente grata por seu incansável suporte e orientação durante a realização desta pesquisa. Sua sabedoria, paciência e a oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa foram verdadeiros privilégios.

Agradeço também a todos os membros do grupo de pesquisa da professora Rosane Guerra, que me acolheram como parte de sua família científica. A oportunidade de trabalhar com esses excelentes cientistas foi uma verdadeira dádiva de Deus. Meus agradecimentos se estendem aos integrantes do Laboratório de Imunofisiologia – LIF pelo suporte técnico indispensável, ao NIBA e o LEFISIO.

À agência CNPq pela bolsa de mestrado, à FAPEMA pelo apoio financeiro ao projeto NATUMED, aprovado no edital IECT - Biotecnologia, e à UFMA pela infraestrutura crucial para a realização deste estudo. Não posso deixar de expressar minha gratidão a todos os professores do curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, cujas contribuições foram essenciais para minha formação.

Por fim, aos meus amigos, sou grata pelo constante apoio e incentivo ao longo desta jornada. E a todos que, de alguma forma, contribuíram para este momento, meu mais profundo agradecimento. Que este seja apenas o começo de uma caminhada repleta de realizações e que as descobertas e percepções provenientes desta pesquisa possam ser aplicados do nosso estado e país.

*“Até os jovens se cansam e ficam exaustos,
e os moços tropeçam e caem; mas aqueles
que esperam no Senhor renovam as suas
forças. Voam bem alto como águias; correm
e não ficam exaustos, andam e não se
cansam”. Isaías 40:30-31*

RESUMO

A bioprospecção de produtos naturais, com ação antimicrobiana e finalidade terapêutica, vem ganhando bastante destaque no mundo, sobretudo considerando o elevado número de microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais. Nesse contexto, os produtos derivados de *Anacardium occidentale*, espécie nativa do Brasil e popularmente conhecida como cajueiro, surgem como uma promissora alternativa, devido ao seu potencial antimicrobiano. O presente estudo avaliou o efeito do extrato etanólico das flores de *A. occidentale* (EAO) *in vitro*, considerando a ação sobre a adesão e formação de biofilme de bactérias do grupo ESKAPE, bem como os efeitos do extrato na infecção letal ocasionada por *Staphylococcus aureus* em larvas de *Tenebrio molitor*. A composição química do extrato foi analisada por HPLC e LC-MS. A ação antimicrobiana *in vitro* foi avaliada pelo ensaio de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) sobre cepas padrão *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e em linhagens clínicas multirresistentes (MRSA 240016969961 e MRSA 240016969962). Os efeitos do EAO também foram avaliados sobre a viabilidade e biomassa da adesão e biofilmes pré-formados e formados. Os ensaios *in vivo* com as larvas de *T. molitor* determinaram a toxicidade do EAO, e os efeitos do extrato na infecção letal induzida por *S. aureus*. As larvas foram divididas em seis grupos (N=10), sendo um **Sham**, sem infecção ou tratamento e cinco grupos infectados, letalmente, com *S. aureus* (10^5 UFC/ μ L), por via intracelômica (ic.) e tratados pela mesma via. Os três grupos tratados com diferentes concentrações do extrato: **EAO1/2**: extrato na concentração correspondente a 1/2 MIC (3,12 mg/mL), **EAO CIM**: EAO no valor de MIC (6,25 mg/mL) e **EAO2**: Tratado com EAO no valor de 2x MIC (12,5 mg/mL). Esses grupos foram comparados ao grupo **Controle**: recebeu solução salina balanceada com foscato (PBS) e ao grupo **CiPro**: recebeu ciprofloxacina (1,56 μ g/mL). No EAO foram identificados como compostos majoritários: ácido chiquímico, ácido gálico, quercetina, isoquercetina, galoil glucose, digaloilglucose, isômero 1 e isômero 2 de tetragaloilglucose. Os valores de CIM variaram entre 6,25 e 50 mg/mL, sendo a melhor atividade para *S. aureus* (ATCC 25923) (CIM=6,25 mg/mL) e para as linhagens de MRSA (CIM 12,5 mg/mL). A ação do EAO foi bactericida de acordo com a relação CBM/CIM. O extrato reduziu a biomassa e a viabilidade da adesão e dos biofilmes pré-formados e formados de *S. aureus*, *E. coli* e MRSA. *In vivo* os resultados mostraram baixa toxicidade para *T. molitor*, para a maioria das concentrações testadas. O tratamento com EAO aumentou a sobrevivência das larvas letalmente infectadas com *S. aureus*, tendo efeito dose dependente. Em conclusão, o EAO prolongou a sobrevivência de larvas letalmente infectadas por *S. aureus*, possivelmente devido sua ação antibacteriana e seus efeitos sobre a adesão e os biofilmes bacterianos.

Palavras-Chave: antibiótico; antivirulência; *Staphylococcus aureus*; MRSA.

ABSTRACT

The bioprospection of natural products, with antimicrobial action and therapeutic purpose, has been gaining much prominence worldwide, especially considering the high number of microorganisms resistant to conventional treatments. In this context, products derived from *Anacardium occidentale*, a species native to Brazil and known as the cashew tree, emerge as a promising alternative due to their antimicrobial potential. The present study evaluated the effect of ethanolic extract of *A. occidentale* (EAO) flowers *in vitro*, considering the action on the adhesion and biofilm formation of ESKAPE's bacteria group, as well as on lethal *Staphylococcus aureus* infection induced in *Tenebrio molitor* larvae. HPLC and LC-MS determined the chemical composition of the extract. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) determined the antibacterial activity on standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 29922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) and in multidrug-resistant clinical strains of *S. aureus* (MRSA 240016969961 and MRSA 240016969962). The effects of EAO were also evaluated on the viability and biomass of adhesion and preformed and formed biofilms. For the *in vivo* assays, *T. molitor* larvae were used to determine the toxicity of EAO, standardize the lethal inoculum of *S. aureus*, and evaluate the EAO effect after lethal infection with *S. aureus*. The animals were divided into six groups (N=10) to determine their survival during the lethal infection. Sham: without infection or treatment, and five groups lethally infected with *S. aureus* (10^5 CFU/ μ L), intracelomic and treated with EAO or CIPRO by the same route. Groups EAO1/2: treated EAO in a concentration corresponding to 1/2 MIC (3.12 mg/mL), EAO CIM: EAO in MIC concentration (6.25 mg/mL) and EAO2: treated with EAO corresponding to 2x MIC concentration (12.5 mg/mL). Negative control: received phosphate-balanced salt solution (PBS), CiPro: treated with ciprofloxacin (1,56 μ g/mL). The major compounds identified were: shikimic acid, gallic acid, quercetin, isoquercetin, galloyl glucose, digaloylglucose, isomer 1 and isomer 2 of tetragalloylglucose. The MIC values ranged from 6.25 to 50 mg/mL for the strains, with the best activity for *S. aureus* (MIC=6.25 mg/mL) and the MRSA strains (MIC 12.5 mg/mL). The EAO had bactericidal action according to CBM/CIM. The extract reduced the biomass and viability of adhesion-preformed and formed biofilms of *S. aureus*. EAO showed low toxicity to *T. molitor*. Treatment with EAO increased the larvae's survival after lethal infection with *S. aureus* in a dose-dependent way. In conclusion, EAO prolonged the survival of larvae lethally infected by *S. aureus*, possibly due to its antibacterial action and its effects on adhesion and biofilms.

Keywords: antibiotic; anti-virulence; *Staphylococcus aureus*; MRSA.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Número de casos de MRSA relatados no território brasileiro entre os anos 2000 e 2010. Adaptado de Andrade <i>et al.</i> , 2020.....	25
Figura 2. Principais etapas envolvidas nas infecções bacterianas.....	26
Figura 3. Mecanismos de evasão do sistema imune por <i>Staphylococcus aureus</i> ..	27
Figura 4. Etapas na formação de um biofilme.....	28
Figura 5. Resposta imune adaptativa contra patógenos no interior dos macrófagos. Resposta Th1 (A) e TCD8 (B).....	30
Figura 6. Aspecto geral da árvore de <i>Anacardium occidentale</i> L (A) e de suas estruturas botânicas (B) Flores; (C) Fruto e pseudofruto e (D) Folhas.....	32
Figura 7. Flores de <i>Anacardium occidentale</i> (A) pétalas na flor masculina e (B) pétalas distendidas e pistilo nas flores hermafroditas	33
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Tenebrio molitor</i> . Ovo; Larva; Pupa e Besouro.....	38
Figura 9. Resumo ilustrativo do teste da infecção aguda.....	45
Figura 10. Avaliação química do extrato etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> L.....	48
Figura 11. O extrato etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO) inibiu a adesão de <i>S. aureus</i> , MRSA e <i>E. coli</i>	51
Figura 12. O extrato etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO) inibiu a evolução do biofilme pré-formado de <i>S. aureus</i> , MRSA e <i>E. coli</i>	52
Figura 13. O extrato etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO) inibiu o biofilme formado de <i>S. aureus</i> , MRSA e <i>E. coli</i>	53
Figura 14. Toxicidade do Extrato Etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO) em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	54
Figura 15. Determinação do inóculo de <i>S. aureus</i> capaz de ocasionar infecção letal em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	55
Figura 16. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com <i>S. aureus</i> (ATCC25923)	56
Figura 17. O tratamento com o extrato etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO) aumenta a sobrevivência e a expectativa de vida de larvas de <i>T. molitor</i> infectadas com <i>S. aureus</i> (ATCC25923).....	57

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Ativação do sistema imunológico frente aos fatores de virulência <i>S. aureus</i> durante a infecção.....	30
Tabela 2. Alguns estudos etnofarmacológicos das estruturas de <i>Anacardium occidentale</i> no território brasileiro entre os anos de 2013 a 2023.....	35
Tabela 3. Atividade biológica das estruturas de <i>Anacardium occidentale</i> descrita em alguns ensaios pré-clínicos entre os anos de 2013 e 2023.....	36
Tabela 4. Classificação taxonômica de <i>T. molitor</i>	37
Tabela 5. Compostos obtidos após caracterização química do extrato etanólico de <i>Anacardium occidentale</i> por HPLC-ESI-IT/MS.....	49
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Extrato etanólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO) para bactérias Gram-positivas; Gram-negativas do grupo ESKAPE....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AdsA- Adenosina sintase A

AMH- Ágar Muller-Hinton

CBM- Concentração Bactericida Mínima

CFX- Ciprofloxacina

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

CV- Cristal Violeta

dAdsA- Desoxiadenosina

DMSO- Dimetilsulfóxido

EAO- Extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale*

EAP- Proteína de adesão extracelular

EPS- Substância polissacarídea extracelular

FPR2- Receptor formil 2

GLASS- Relatório Global de Resistência Antimicrobiana e Sistema de Uso de Antimicrobiano

HDPs- Peptídeos de defesa do hospedeiro

HPLC-PDA- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector PDA

Ic- Intracelômica

ICPs- Infecções crônicas persistentes

IBS- Infecções bacterianas secundárias

MDSCs- Células supressoras derivadas de mieloides

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MTT- Brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil -2,5-difenil-2H-tetrazólio

NETs- Redes extracelulares de neutrófilos

NOD2- Receptor Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2

NSPs- Proteases dos neutrófilos

Nuc- Nuclease estafilocócica

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAMPs- Padrões associados a patógenos

PIA- Polissacarídeo adesina extracelular

PRR- Receptores de reconhecimento padrão

PSMs- Modulinas solúveis em fenol

RAM- Taxa de Resistência Microbiana

RM- Resistência Microbiana

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SBI- Infecções bacterianas secundárias

SEIW- Superantígeno estafilocócico

SEIX- Enterotoxina estafilocócica bifuncional

SPIN- Peroxidase estafilocócica

TLR2- Receptor Toll-Like 2

UFC- Unidades formadora de colônia

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 Infecções bacterianas.....	23
2.1.1 Mecanismos de patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2 Sistema imune e as infecções bacterianas.....	28
2.3 Desafios no tratamento de infecções e bioprospecção de novos compostos antimicrobianos.....	31
2.4 <i>Anacardium occidentale</i> L.....	32
2.5 Modelos experimentais de infecção em invertebrados: <i>Tenebrio molitor</i>	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E METÓDOS	40
4.1 Obtenção do extrato das flores de <i>Anacardium occidentale</i> (EAO).....	40
4.2 Prospeção química do extrato.....	40
4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplado ao PDA.....	40
4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado ao Detector de Espectrometria de Massas (LC-ESI-IT/MS)	41
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do EAO.....	41
4.3.1 Microrganismos.....	41
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42
4.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CIM).....	42
4.3.4- Erradicação da adesão e biofilmes pré-formado e formado.....	43
4.4 Ensaios <i>in vivo</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	44
4.4.1 Avaliação da toxicidade aguda.....	44
4.4.2 Padronização de inóculo letal de <i>S. aureus</i>	44
4.4.3 Infecção letal.....	45
4.4.4 Quantificação das Unidades Formadora de Colônia (UFC) em larvas de <i>T. molitor</i> infectadas letalmente por <i>S. aureus</i>	46
4.5 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	47

5.1 Análise química e identificação de substâncias presentes no EAO.....	47
5.2 Atividade antimicrobiana do EAO frente a bactérias do grupo ESKAPE.....	49
5.3 O tratamento com o EAO reduziu a adesão e os biofilmes de <i>S. aureus</i> , MRSA e <i>E. coli</i>	50
5.4 O EAO apresentou baixa toxicidade para larvas de <i>T. molitor</i>	54
5.5 Determinação do inóculo letal de <i>S. aureus</i> na infecção das larvas de <i>T.</i> <i>molitor</i>	54
5.6 Confirmação da infecção de <i>T. molitor</i> por <i>S. aureus</i>	55
5.7 O tratamento com EAO prolonga a sobrevivência das larvas de <i>T. molitor</i> infectadas letalmente com <i>S. aureus</i>	56
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	63
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas ocasionadas por microrganismos multirresistentes, especialmente os pertencentes ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), se configuram como uma das principais ameaças à saúde global, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. Esses microrganismos possuem elevado grau de patogenicidade e frequentemente estão associados a Infecções Bacterianas Secundárias (IBS) (Oliveira *et al.*, 2020; Karnwal *et al.*, 2023; Miller; Arias, 2024).

O controle da evolução e a terapêutica empregada nas infecções bacterianas, sobretudo nas causadas pelo grupo ESKAPE são um grande desafio aos sistemas de saúde mundiais, pois essas espécies são resistentes a uma variedade de antibióticos, incluindo as cefalosporinas, fluoroquinolonas e carbapenemas; e em pacientes críticos, como os internados nas unidades de terapia intensiva (UTI), estão associadas a um elevado número de óbitos. (Ribeiro *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023).

Nas últimas duas décadas, a humanidade enfrentou quatro surtos epidemiológicos, sendo a pandemia da Covid-19 a mais recente, considerada a quinta mais mortal da história humana. Nos pacientes graves infectados pelo SARS-CoV-2 ocorreu elevada incidência de IBS, resultando em elevados percentuais de morbi-mortalidade. Mais de 50% das mortes dos pacientes com COVID ocorreram por infecções secundárias não tratáveis. Entre os principais microrganismos oportunistas associados a essas infecções, foram identificadas as bactérias do grupo ESKAPE. (Mirzaei *et al.*, 2020; Nazir *et al.*, 2023).

O tratamento das infecções multirresistentes é feito com antibióticos; no entanto, há, ainda hoje, uma escassez na inserção de novos antimicrobianos no mercado. De acordo com Hutchings *et al.*, (2019), de 2003 a 2012, apenas quatro classes de antibióticos (Lipopeptídeos, Lipiarmicinas, Pleuromutilinas, Diarilquinolinas) foram introduzidas clinicamente. Além disso, a maioria dos antibióticos em fase de ensaios clínicos deriva de classes já conhecidas, sejam de produtos naturais de microrganismos ou antibióticos sintéticos. Esse cenário aliado a prescrição ou uso inadequado desses fármacos acelera a seleção de espécies e variantes resistentes, contribuindo para o aumento da resistência microbiana, que é considerada umas das dez maiores ameaças à saúde mundial, devido aos elevados custos hospitalares e altas taxas de mortalidade (Anvisa,2023). Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado a busca por novos bioativos

antimicrobianos, que possam ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos ou como adjuvantes (Glass, 2022). Nesse contexto as plantas surgem como promissoras fontes para a bioprospecção desse tipo de compostos.

Anacardium occidentale L., espécie vegetal nativa do Brasil, é frequentemente utilizada pela população para diversos fins terapêuticos, que incluem tratamento de infecções e cicatrização. Estudos realizados pelo nosso grupo na Universidade Federal do Maranhão e por outros autores mostraram a atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos utilizando diferentes partes do cajueiro (Silva *et al.*, 2016; Araújo *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2017; Freire *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019). Contudo, resultados com o extrato das flores do cajueiro contra bactérias se restringiram a ensaios pré-clínicos, *in vitro*, utilizando cepas padrão, considerando a avaliação dos halos de inibição até 2016 (Silva *et al.*, 2016). Em 2021, os resultados da nossa monografia de graduação mostraram que extrato hidroetanólico das flores do cajueiro era efetivo em inibir o crescimento de bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Também confirmamos que o extrato apresentava baixa toxicidade *in vivo*, em testes com larvas de *Tenebrio molitor* (Santos, 2021).

Com base nessas considerações, e visando dar continuidade ao nosso trabalho, a hipótese norteadora do presente estudo foi: O extrato das flores de *Anacardium occidentale* pode controlar infecções letais ocasionadas por bactérias do grupo ESKAPE devido sua atividade antibacteriana e antivirulência. Assim, o presente trabalho avaliou o potencial antimicrobiano e antivirulência do Extrato Etanólico das Flores de *Anacardium occidentale* (EAO) frente a bactérias do grupo ESKAPE, incluindo três linhagens de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) clínicas. Nos ensaios *in vivo*, avaliamos efeito protetor do extrato em larvas de *Tenebrio molitor*, infectados letalmente por *S. aureus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Infecções bacterianas

Durante o curso da história, as doenças infecciosas sempre se configuraram como um grande desafio à sobrevivência humana. Inúmeros são os relatos de pandemias que, ao longo dos séculos, dizimaram populações e colapsaram a economia, deixando um rasto de fome, desemprego e desesperança. Recentemente, vivenciamos de perto essa problemática ao passarmos pela pandemia da COVID-19, que mostrou a urgência de ações globais para o enfrentamento das doenças infecciosas (Xuan *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023).

Vários grupos de microrganismos podem ser agentes etiológicos das infecções, incluindo as bactérias, que podem ser exógenas ou pertencentes a microbiota do hospedeiro. Entretanto, fatores como resistência bacteriana, grau de virulência e susceptibilidade do hospedeiro são cruciais na ocorrência de quadros graves e óbitos (Morris; Cerceo, 2020; Coelho *et al.*, 2021).

As bactérias possuem muitos fatores de virulência, incluindo: adesão à matriz extracelular do hospedeiro; secreção de enzimas e citotoxinas incluindo hemolisina, nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase (Sharma *et al.*, 2017); capacidade de resistir à fagocitose (Rowe *et al.*, 2023) e formação de biofilme (Zhou *et al.*, 2020). Entre os fatores virulência microbiana, cabe destaque para a formação de biofilme, que gera um microambiente favorável ao desenvolvimento de mutações gênicas responsáveis pela evasão dos mecanismos imunológicos de controle da infecção e resistência aos antimicrobianos (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Os mecanismos de evasão, isoladamente, ou associados permitem que os microrganismos causem infecções locais ou sistêmicas. Além disso, contribuem para a resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado. O Relatório Global de Resistência Antimicrobiana e Sistema de Uso de Antimicrobiano da OMS mostra que, entre 2017 e 2022, ocorreu um aumento da resistência bacteriana, com taxas acima de 50%, considerando as bactérias frequentemente relacionadas à sepse hospitalar (Glass, 2022). As bactérias do grupo ESKAPE foram as bactérias mais constantemente isoladas em infecções hospitalares. Os dados mostram também que mais de 42% das cepas clínicas de *Escherichia coli*, isoladas em infecções gastrointestinais e urinárias, eram resistentes à ampicilina, cotrimoxazol e fluoroquinolonas (Díaz *et al.*, 2021; Glass, 2022).

Entre os membros do grupo ESKAPE, *S. aureus* se destaca como a bactéria mais onipresente e prevalente em infecções hospitalares. Por essa razão, está na lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, pois é muito frequente nas infecções multirresistentes, com taxa RAM de 35% (Glass, 2022; Miller; Arias, 2024). Segundo Mumcuoğlu *et al.*, 2022, nas IBS em pacientes com COVID-19, essa bactéria foi a segunda mais frequente, com taxa de isolamento de 15%.

S. aureus apresenta elevado potencial de adaptação aos tecidos humanos e uma variedade de mecanismos para desregular e escapar da resposta imune do hospedeiro (Howden *et al.*, 2023), incluindo a produção de duas proteínas homólogas, fibronectina ligantes A (*FnbA*) e B (*FnbB*), que desempenham um papel crucial na ligação às glicoproteínas do hospedeiro e no processo de adesão (Chand *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2024).

Um outro fator de virulência de *S. aureus* é a adesão, pois, quando bem-sucedida, permite a colonização. Nesse processo, às bactérias usam adesinas do fator de agrupamento A (*clfA*) e B (*clfB*), que se ligam ao fibrogênio, provocando a agregação às plaquetas. Além disso, a *clfA* também inibe a ativação do sistema complemento, dificultando a fagocitose e, por conseguinte, a eliminação eficaz das bactérias (Cussolim *et al.*, 2021).

O estudo epidemiológico desenvolvido por Andrade *et al.*, (2020) mostrou o aumento das notificações de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em todo território brasileiro entre os anos 2000 e 2010, considerando os ambientes hospitalares (Figura 1). Esse aumento foi principalmente atribuído à elevada adaptabilidade e ao perfil patogênico e resistente dos clones de MRSA.

Atualmente, a resistência microbiana está entre as principais ameaças à saúde global, requerendo a implementação de estratégias conjuntas entre os sistemas de saúde e governos. A resposta ao aumento da RAM demanda não apenas estimular o uso racional dos antimicrobianos utilizados na terapêutica, mas também incentivar a pesquisa de novos bioativos antimicrobianos que possam ser utilizados no desenvolvimento de medicamentos (Dadgostar, 2019; Morrison; Zembower, 2020).



Figura 1. Número de casos de MRSA relatados no território brasileiro entre os anos 2000 e 2010. Adaptado de Andrade *et al.*, 2020.

2.1.1 Mecanismos de patogenicidade de *Staphylococcus aureus*

a) Mecanismos de evasão físico-químicos

S. aureus apresenta capacidade de se adaptar rapidamente a ambientes com restrição de nutrientes e sujeitos a oscilações de pH, pressão osmótica e umidade. Entre os seus mecanismos de virulência, se destacam a produção de toxinas e a presença de estruturas antigênicas na sua parede celular (Silva *et al.*, 2022).

As infecções causadas por *S. aureus* variam desde infecções simples na epiderme e mucosas até as mais graves, como endocardite, pneumonia, síndrome do choque tóxico e sepse. A complexidade e morbi-mortalidade dessas infecções são influenciadas principalmente pela amplitude das estratégias fisiopatológicas de *S. aureus*, fundamentais para a evasão do sistema imune do hospedeiro, refletindo a longa interação desse microrganismo com a espécie humana (Howden *et al.*, 2023).

Na figura 2 mostra as principais etapas envolvidas no estabelecimento de uma infecção por *S. aureus*. Primeiramente, ocorre a adesão à superfície epitelial do hospedeiro, por meio da produção de adesinas e da enzima coagulase. Posteriormente, são produzidas toxinas, enterotoxinas estafilocócicas e polissacarídeos capsulares, que destroem o tecido conjuntivo e facilitam a penetração da bactéria nas células eucarióticas. Logo após a

invasão, ocorre a colonização e proliferação bacteriana resultando no estabelecimento da infecção e no consequente dano tecidual (Deusenbery *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

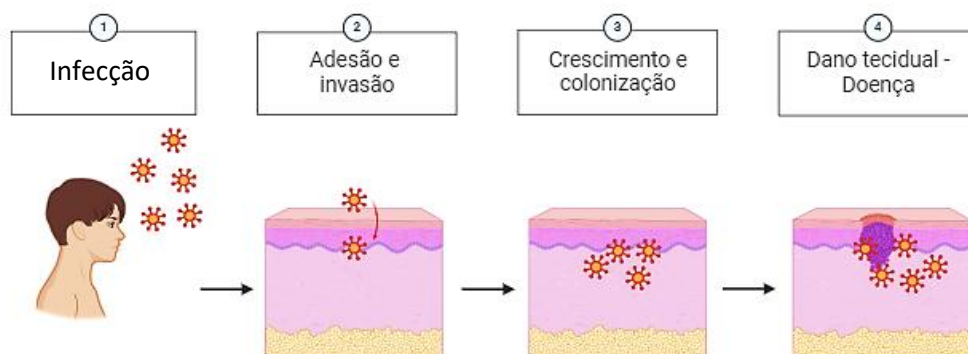


Figura 2. Principais etapas envolvidas no estabelecimento de uma infecção. Figura produzida com o programa Biorender.

A Figura 3 mostra que para viabilizar a infecção *S. aureus* dispõe de vários mecanismos de escape que incluem:

- ☞ Secreção da enterotoxina estafilocócica bifuncional (SEIX) que se liga aos receptores de superfície dos neutrófilos, impedindo a fagocitose.
- ☞ Produção de inibidores de peroxidase (SPIN) capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) e evitar a morte bacteriana no interior dos fagossomos de neutrófilos e macrófagos.
- ☞ Produção de nuclease estafilocócica (Nuc) e a adenosina sintase A (AdsA) capazes de neutralizar as redes extracelulares de neutrófilos (NETs)
- ☞ Secreção de desoxiadenosina (dAdsA) capaz de induzir apoptose de macrófagos.
- ☞ Expressão do superantígeno estafilocócico (SEIW) e liberação da toxina X, que estimulam a proliferação das células T e causam desregulação do sistema imunológico.

Toda essa plasticidade dos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro por *S. aureus* impactam diretamente sua patogenicidade e contribuem para infecções complexas e persistentes (Thammayonga *et al.*, 2015; Kretschmer *et al.*, 2021; Howden *et al.*, 2023).

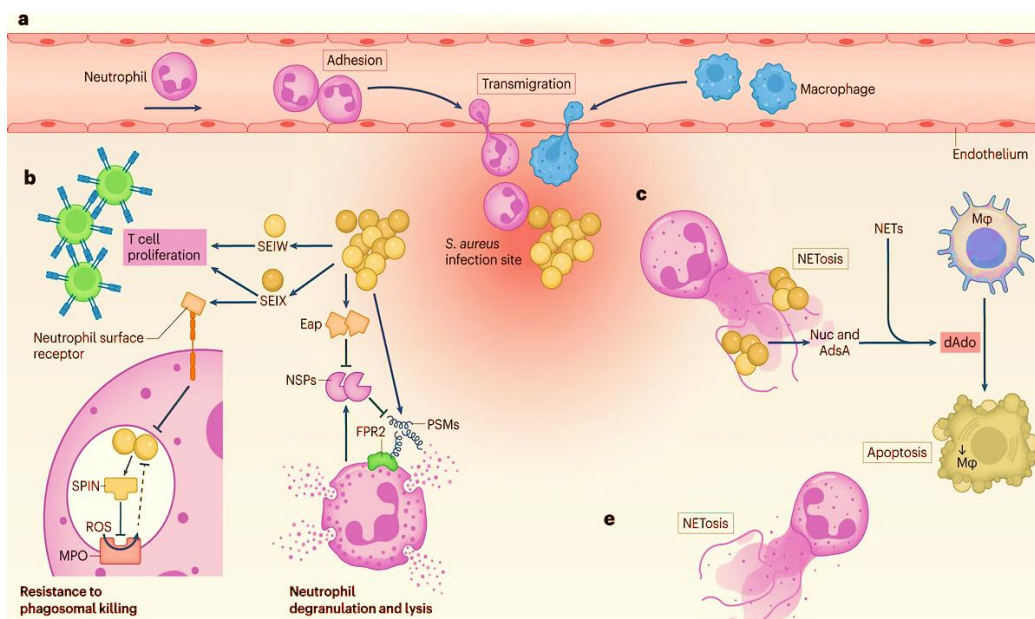


Figura 3. Mecanismos de evasão do sistema imune de *Staphylococcus aureus* (Howden *et al.*, 2023).

b) Adesão e formação de biofilme

A adesão de *S. aureus*, de forma planctônica, a uma determinada superfície é etapa fundamental para a formação do biofilme. A adesão é facilitada pela expressão de proteínas de ligação e adesão SasG, A e CWA. Nas superfícies bióticas, essa etapa é mediada por interações moleculares, mas, em superfícies abióticas, é intermediada por interações físico-químicas. O biofilme de *S. aureus* tem ação anti-inflamatória, o que favorece a persistência das bactérias em vez de sua eliminação (Heim *et al.*, 2014; Idrees *et al.*, 2021; Howden *et al.*, 2023).

O biofilme de *S. aureus*, assim como outros biofilmes bacterianos, é um conglomerado de bactérias envolvidas por uma matriz polimérica produzida pela própria comunidade, capaz de provocar hiper-inflamação e bloquear a ação antimicrobiana de moléculas e células do sistema imunológico (Bohrz *et al.*, 2021). Estima-se que este fator de virulência seja crucial para o desenvolvimento de infecções crônicas persistentes (ICPs). Segundo Jamal *et al.*, (2018) mais de 80% das ICPs ocorrem devido à formação de biofilmes bacterianos, sendo que *S. aureus* é a espécie mais frequente nas infecções ocasionadas por biofilme.

O lactato estafilocócico inibe a histona desacetilase 11 de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, alterando o fenótipo dessas células e induzindo o aumento da

produção de mediadores anti-inflamatórios como arginase 1 e IL-10. (Sastalla *et al.*, 2016; Yamada *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2023).

As bactérias aderidas se proliferam e sintetizam a substância polissacarídea extracelular (EPS), que forma uma matriz, utilizada como membrana protetora do conglomerado. A proteína Aap e o polissacarídeo adesina extracelular (PIA) estão associados a maturação do biofilme e a sua organização. Já as fibras amiloides contribuem para sua estabilidade, ao conservarem as microcolônias de *S. aureus* aderidas à matriz do biofilme (El-Tarabily *et al.*, 2021; Oliveira; Saenz, 2023).

Nos biofilmes maduros, as bactérias residentes produzem enzimas e substâncias químicas capazes de degradar a matriz polimérica extracelular, resultando na dispersão de pequenas porções desse biofilme maduro para outros substratos e sítios (Zhou *et al.*, 2020; Sauer *et al.*, 2022) (Figura 4).

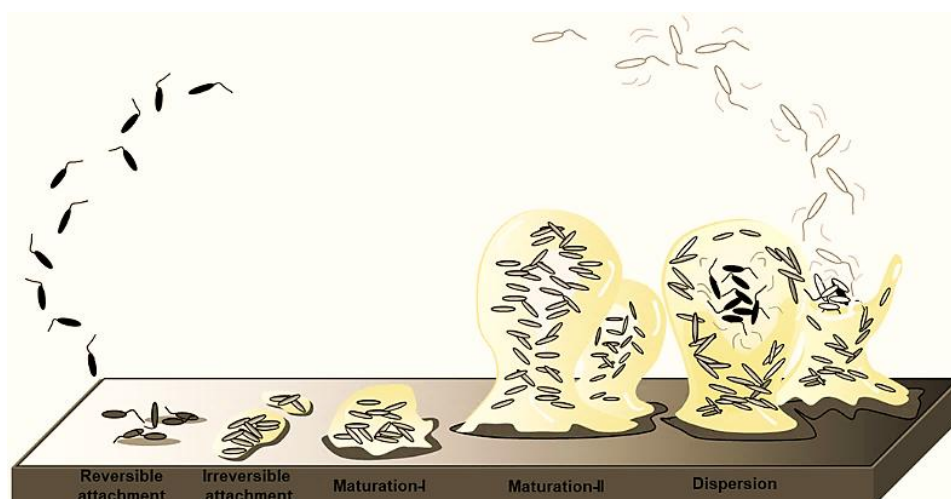


Figura 4. Etapas na formação de um biofilme (Sauer *et al.*, 2022).

2.2 Sistema imune e as infecções bacterianas

O sistema imune, com o passar do tempo, evoluiu para lidar com os vários grupos de microrganismos aos quais os seres humanos estão expostos. Nas infecções bacterianas, a resposta imunológica pode ser diferente frente às infecções ocasionadas por bactérias intracelulares ou extracelulares.

As células epiteliais da mucosa e os queratinócitos da pele constituem a primeira barreira às infecções e participam da resposta imune inata devido à produção de mediadores com ação bacteriostática e bactericida contra *S. aureus*, incluindo os chamados “peptídeos de defesa do hospedeiro” (HDPs), como o HBD2, HBD3 e as catelicidinas. Esses peptídeos

também atuam na quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (Miller e Choi, 2011; Liu *et al.*, 2018).

Os neutrófilos e macrófagos quando ativados, por quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , secretam uma diversidade de mediadores bioquímicos como o peróxido de hidrogênio, com ação bactericida (Miller *et al.*, 2020). Adicionalmente, os macrófagos e neutrófilos formam abscessos que encapsulam e isolam as bactérias no local da infecção por *S. aureus*, impedindo sua disseminação invasiva (Kobayashi *et al.*, 2015).

Outro mecanismo da resposta imune inata no controle das infecções por *S. aureus*, inclui a ativação das células NK, que além da ação microbicida, produzem IFN- γ , citocina responsável por ativar macrófagos e células dendríticas, que, por sua vez, apresentam antígenos às células T CD4⁺ e CD8⁺ e produzem citocinas pró-inflamatórias e (Janela *et al.*, 2019; Miller *et al.*, 2020).

A organização eficiente da resposta imune inata nas infecções bacterianas, e nas causadas por *S. aureus*, é facilitada pelos receptores de reconhecimento padrão (PRR), tais como o receptor Toll-like2 (TLR2) e o receptor nucleotídeo de ligação ao domínio de oligomerização 2 (NOD2), capazes de identificar padrões associados a patógenos (PAMPs) presentes em *S. aureus*. A ativação dos PRR desencadeia cascatas de sinalização, resultando na produção aumentada de espécies reativas intermediárias de nitrogênio, citocinas entre outros mediadores, contribuindo para a rápida mobilização da resposta imune (Askarian *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2022).

A resposta imune adaptativa surge em resposta às infecções persistentes, visando controlar a disseminação da infecção, em associação aos mecanismos inatos. Nesse caso, são ativados linfócitos além de macrófagos e células dendríticas (Gong *et al.*, 2022).

A resposta imune mediada por linfócitos T inclui a ativação da resposta Th1, resultando no aumento de IFN- γ e na ativação de macrófagos. Ocorre também ativação de linfócitos citotóxicos que quando ativados, liberam perforinas e granzimas. Essas enzimas desempenham um papel crucial na apoptose de células infectadas, limitando assim a disseminação bacteriana. Em conjunto, células e mediadores da imunidade adaptativa desempenham um papel sinérgico e essencial no controle da infecção e eliminação eficaz da bactéria, evitando o agravamento das infecções e óbitos do hospedeiro (Hillyer, 2016; Utay *et al.*, 2016; Uebele *et al.*, 2017; Wójcik-Bojek *et al.*, 2022) (Figura 5).

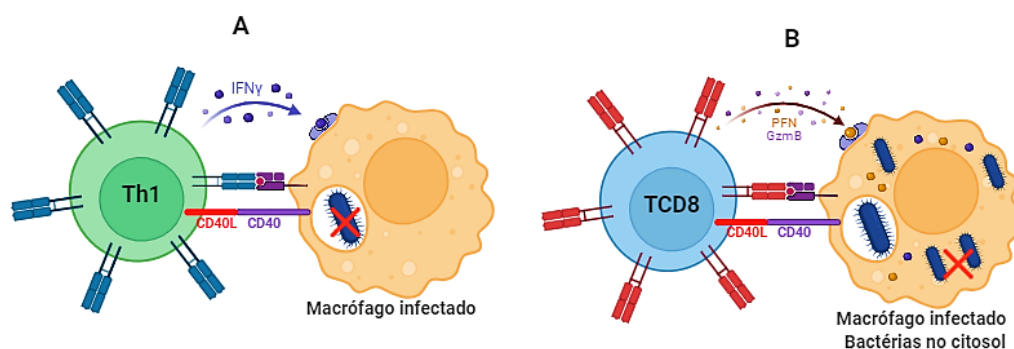


Figura 5. Resposta imune adaptativa contra patógenos no interior dos macrófagos. Resposta Th1 (A) e TCD8 (B). Figura produzida pelo programa Biorender

Em relação à resposta humoral, as células B sensibilizadas secretam anticorpos capazes de neutralizar as bactérias ao impedir a adesão e a formação de biofilme. Além disso, os anticorpos aumentam, significativamente, a eficiência da fagocitose, muitas vezes em até 1000 vezes, ao, recobrirem a superfície bacteriana, pois dessa forma, atuam na atração e ativação de macrófagos. Anticorpos também ativam o sistema complemento aumentando o potencial microbicida da resposta (Spaan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2021).

Tabela 1. Ativação do sistema imunológico frente aos fatores de virulência *S. aureus* durante a infecção.

Mecanismos de virulência de <i>S. aureus</i>	Efeitos sobre o Sistema Imune	
	Resposta imune inata	Resposta imune adaptativa
Produção das toxinas	Peptídeos antimicrobianos do hospedeiro	Resposta Th1 → ativação de macrófagos estimulados por IFN- γ secretado por células TCD4 ⁺
Inativação da fusão do lisossomo ao fagossomo	Fagocitose	Resposta TCD8 ⁺ → células T citotóxicas produzem enzimas que induzem o macrófago infectado a apoptose
Formação do biofilme	Ativação do sistema complemento	Resposta humoral → mediada por anticorpos que induz: Opsonização Neutralização Ativação do complemento

2.3 Desafios no tratamento de infecções e bioprospecção de novos compostos antimicrobianos

O uso de antimicrobianos no tratamento das doenças infecciosas possibilitou o aumento na qualidade e na expectativa de vida das pessoas. Entretanto, nas últimas décadas, a utilização indiscriminada dessas medicações tem gerado um ambiente propício ao processo de seleção natural de microrganismos resistentes (Veloso; Campelo, 2017; Costa *et al.*, 2020).

As infecções multirresistentes provocam, anualmente, cerca de 700 mil óbitos e segundo o relatório sobre resistência antimicrobiana, produzido pelo Grupo *Ad Hoc* de Coordenação das Interagências (IACG), a resistência microbiana é considerada uma das principais ameaças a saúde global e ao desenvolvimento humano. Dados desse relatório estimam que a resistência bacteriana foi associada a 1,27 milhões de mortes no mundo em 2019 (Iacg, 2019; Murray; Ikuta, 2022). Diante da gravidade dessa situação é necessário a adoção de ações conjuntas entre as organizações e instituições de saúde pública e privada, para que haja a promoção do uso racional dos antimicrobianos existentes, implantação de ferramentas que evitem a propagação das cepas resistentes, e erradicação do uso e prescrição inadequada das medicações convencionais (Willemsem *et al.*, 2022).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por gerenciar planos estratégicos e operacionais com o objetivo de enfrentar o aumento da resistência bacteriana (Anvisa, 2023). Dessa forma, a busca por novos compostos com propriedades antimicrobianas, que possam ser efetivos no controle das infecções ocasionadas por microrganismos resistentes vem se intensificando e, nesse contexto, as plantas emergem como uma importante fonte de prospecção de novos compostos (Cushnie *et al.*, 2020).

A utilização de espécies vegetais com propósitos terapêuticos é uma prática ancestral, que ocorre desde tempos remotos. Estudos relatam que mais de 80% da população global faz uso de plantas medicinais e seus derivados para a prevenção ou tratamento de uma variedade de doenças, incluindo as infecciosas (Almeida *et al.*, 2017; Cedillo-Cortezano *et al.*, 2024). No entanto, o uso indiscriminado dessas plantas, com base no senso comum de que tais substâncias não oferecem risco à saúde, traz um problema adicional, pois muitos desses produtos não são isentos de efeitos colaterais e podem causar intoxicações. Assim, é essencial a realização de estudos científicos sobre a toxicidade e

efetividade das plantas medicinais para garantir a biossegurança na produção e consumo desses produtos naturais (Moura *et al.*, 2020)

2.4 *Anacardium occidentale* L.

Anacardium occidentale L., também conhecida como cajueiro, caju manso e caju, é uma espécie vegetal nativa do Brasil, encontrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Os exemplares de *A. occidentale* são árvores de grande porte, caracterizadas por um tronco alto e reto (Gutiérrez-Paz *et al.*, 2024). Contudo, existem também exemplares com caule baixo e retorcido, como ilustrado na figura 6A, devido à competição e disponibilidade de recursos nutricionais. As folhas são simples e inteiras, apresentando filotaxia alternada (Figura 6D). O fruto, é uma castanha amplamente apreciada gastronomicamente, junto com o seu pedúnculo floral denominado popularmente de caju (Figura 6C) (Salehi *et al.*, 2019; Farias *et al.*, 2024).

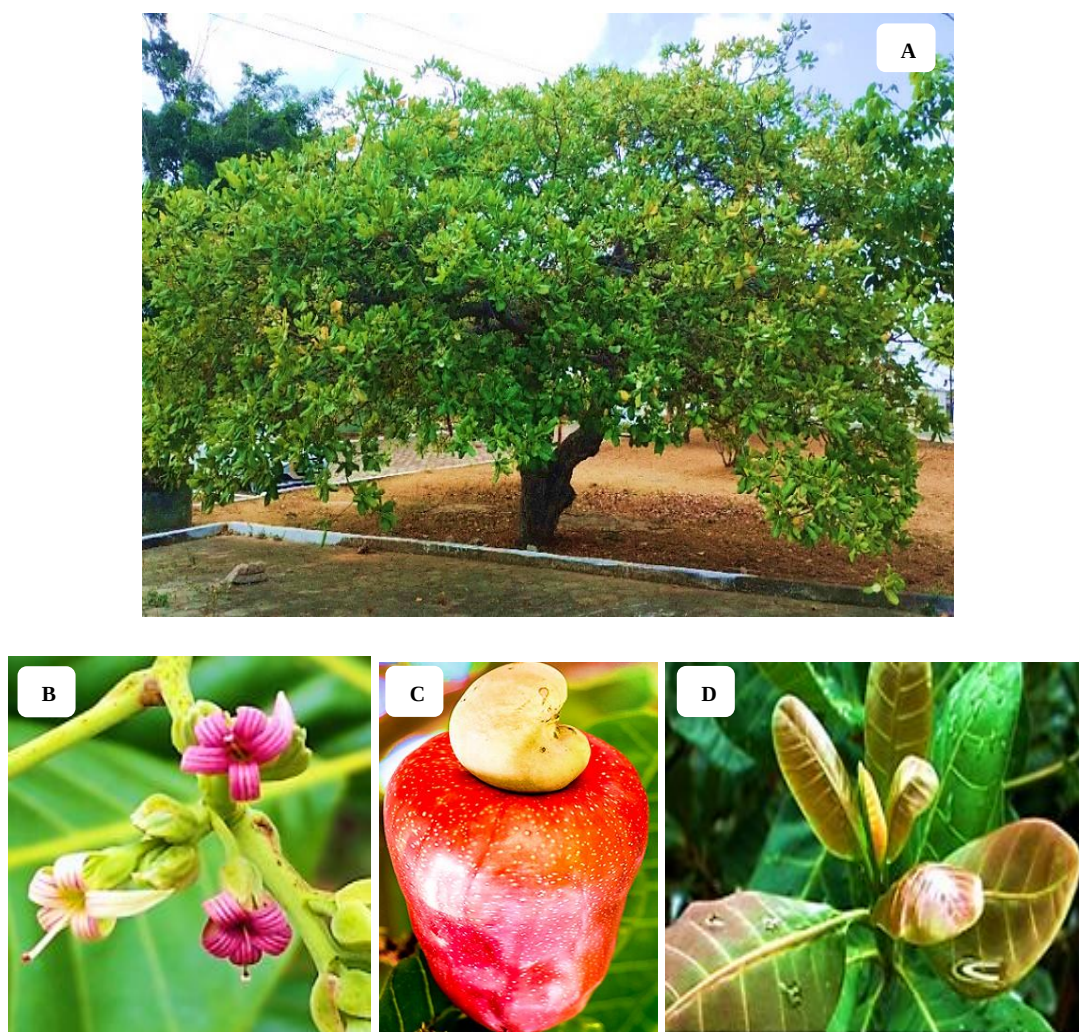


Figura 6. Aspecto geral da árvore de *Anacardium occidentale* L (A) e de suas estruturas botânicas (B) Flores; (C) Fruto e pseudofruto e (D) Folhas.

As flores são pequenas com coloração que varia do branco ao vermelho, com predominância da cor rosa; e quando recém-abertas são branco-esverdeadas (Figura 6B). Após as 24 horas, essa estrutura reprodutiva apresenta coloração avermelhada. Encontram-se dispostas em inflorescências do tipo panícula, que crescem na parte terminal dos ramos, apresentando cachos com ramificações que decrescem da base para o ápice (Oliveira *et al.*, 2019). Nas árvores é possível encontrar flores masculinas e hermafroditas, pentâmeras com 5 pétalas e sépalas (Figura 7A e 7B). As flores masculinas apresentam estames menores e um estame maior; enquanto as flores hermafroditas ou completas apresentam estames e pistilo (estrutura reprodutiva feminina), por essa razão, apenas estas quando fecundadas produzem fruto. A floração do cajueiro ocorre de junho a novembro (Sousa *et al.*, 2007; Soares-Pereira *et al.*, 2023).

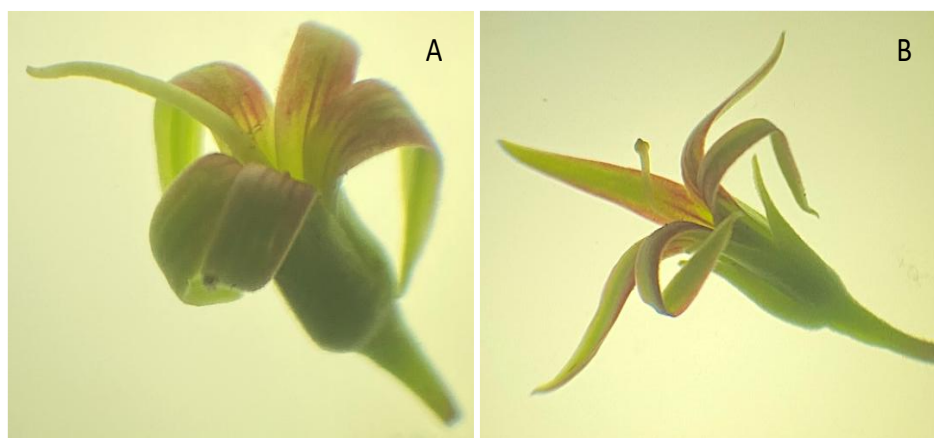


Figura 7. Flores de *Anacardium occidentale*. (A) pétalas na flor masculina e (B) pétalas distendidas e pistilo nas flores hermafroditas (Fotomicrografia Lupa Zeiss 20X).

A população utiliza diversas partes da *A. occidentale*, como folhas, cascas do caule, castanha, caju e flores, para diversos fins terapêuticos. Essas estruturas são frequentemente empregadas na elaboração de chás e banhos, visando auxiliar na cicatrização e assepsia de ferimentos, além do tratamento de gripe, inflamações de garganta, halitose e doenças gastrointestinais (Alexandre, 2015; Freire *et al.*, 2017).

Algumas atividades biológicas das partes aéreas de *A. occidentale*, especialmente das folhas, caule, caju e castanha, já foram documentadas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Em testes *in vitro*, foi detectado efeito antimicrobiano das folhas, cascas, goma, castanha e caju contra agentes etiológicos de grande relevância clínica, incluindo as bactérias

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos como *Candida albicans* (Silva *et al*, 2016; Junior *et al*, 2016; Ribeiro *et al*, 2017). Além disso, Araújo *et al*. (2017) identificaram propriedades antibióticas no extrato das cascas do caule contra espécies do gênero *Streptococcus*, destacando a baixa toxicidade e ausência de mutagenicidade do extrato para células eucarióticas.

No extrato etanólico das flores de *A. occidentale* foram, previamente, identificados diversos compostos, incluindo ácido gálico, ácido elágico, ácido chiquímico, ácido fosfórico, ácido benzoico e ácido anacárdico, conforme apontado por Silva *et al*. (2016) e Oliveira (2022). Alguns estudos detectaram ação antibacteriana para o ácido gálico, ácido elágico e ácido anacárdico, em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Sarjit *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2021).

Tabela 2. Alguns estudos etnofarmacológicos das estruturas de *Anacardium occidentale* no território brasileiro entre os anos de 2013 a 2023.

Estrutura vegetal	Uso medicinal	Forma de uso	Forma de aquisição	Município/Estado	Referências
Caule, Casca do fruto, Casca pseudofruto	Inflamação e sangramento gengival, halitose, infecção urinária, intestinal, anti- diabetes, hipolipemiente, cicatrizante, micose, gastrite, fraqueza, diurético	Chá, Decocção, maceração, infusão	Comercial, Doméstica e Florestal	Campina Grande- Parnaíba São Luís – Maranhão Itacoatira – Amazonas Aldeia do Cajueiro – Pará Barreiras -Bahia Ilha de Mosqueiro – Pará Belém – Pará Vale do Paraíba- São Paulo	Barbosa <i>et al.</i> , 2013; Souza <i>et al.</i> , 2013; Vieira <i>et al.</i> , 2014; Alvarenga <i>et al.</i> , 2017; Mesquita; Tavares- Martins, 2018; Azevedo <i>et al.</i> , 2020; Silva <i>et al.</i> , 2020; Silva <i>et al.</i> , 2021; Mota <i>et al.</i> , 2022
Entrecasca, Folhas, Fruto	Inflamação, ferimentos, fraqueza, diurético diarreia, anti-diabetes, cicatrizante, micose, gastrite	Chá, infusão, decocção, banho de assento, maceração	Doméstica e Florestal	São João do Tigre – Parnaíba Garanhus- Pernambuco Aldeia do Cajueiro – Pará Ilha de Mosqueiro – Pará Belém – Pará Vale do Paraíba- São Paulo	Neiva <i>et al.</i> , 2014; Alvarenga <i>et al.</i> , 2017; Silva <i>et al.</i> , 2020; Silva <i>et al.</i> , 2021

Tabela 3. Atividade biológica das estruturas de *Anacardium occidentale* descrita em alguns ensaios pré-clínicos entre os anos de 2013 e 2023.

Estrutura da Planta	Atividade biológica	Tipo de extrato	Ensaio	Referências
Folhas	Anti-Giardia Antioxidante Antimicrobiana Antimalária	Etanólico Metanólico	Microdiluição Cromatografia em coluna acelerada DPPH CIM e CBM Infecção em modelo animal	Vieira <i>et al.</i> , 2014; Ajileye <i>et al.</i> , 2015; Silva <i>et al.</i> , 2016; Tejumade <i>et al.</i> , 2023
Flores	Hipoglicimiente Anti- Leishmania Cicatrizante Antibacteriana Antifúngica Anti-inflamatória	Etanólico Hidroetanólico	Difusão em ágar por disco e poço CIM e CBM Indução de ferida e sepse em camundongos	Silva, 2015; Silva, 2016; Silva <i>et al.</i> , 2016; Oliveira <i>et al.</i> , 2019; Silva <i>et al.</i> , 2021; Santos, 2021; Oliveira, 2022
Casca	Antimicrobiana Antioxidante	Hidroetanólico Etanólico	CIM e CBM Difusão em ágar	Vieira <i>et al.</i> , 2014; Costa <i>et al.</i> , 2021

2.5 Modelos experimentais de infecção em invertebrados: *Tenebrio molitor*

Nos últimos anos, há um aumento significativo na utilização de modelos invertebrados em pesquisas. Entre os animais mais usados destacam-se *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, *Artemia salina* e *Tenebrio molitor* (Souza *et al.*, 2018; Filho *et al.*, 2020; Rahamouz-Haghighi *et al.*, 2021).

T. molitor é um inseto holometabólico, que possui quatro estágios distintos de vida: ovo, larva, pupa e imago (besouro) (Figura 8). São conhecidos, popularmente, como verme amarelo, tenebrião ou larva da farinha (Milanóvic *et al.*, 2021). Esses insetos possuem distribuição nas zonas tropicais e subtropicais, sendo frequentemente encontrado na natureza em cavidades de árvores e ninhos de pássaros. Habitam em ambientes pouco iluminados e se alimentam de restos e fezes de animais e costumam ser pragas nas plantações de trigo. Em cativeiro, podem ser alimentados com uma mistura de flocos de milho, farinha de rosca e farelos de trigo triturados (Menezes *et al.*, 2014; Errico *et al.*, 2021). A classificação taxonômica de *T. molitor* está resumida na tabela 4.

Tabela 4. Classificação taxonômica de *T. molitor*

Classificação taxonômica de <i>Tenebrio molitor</i>	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Coleoptera
Família	Tenebrionidae
Gênero	<i>Tenebrio</i>
Espécie	<i>Tenebrio molitor</i>

Na fase larval, sua anatomia apresenta cabeça com boca e olhos pouco desenvolvidos; tórax com três pares de pernas; abdômen dividido em metâmeros e ânus (Figura 8).

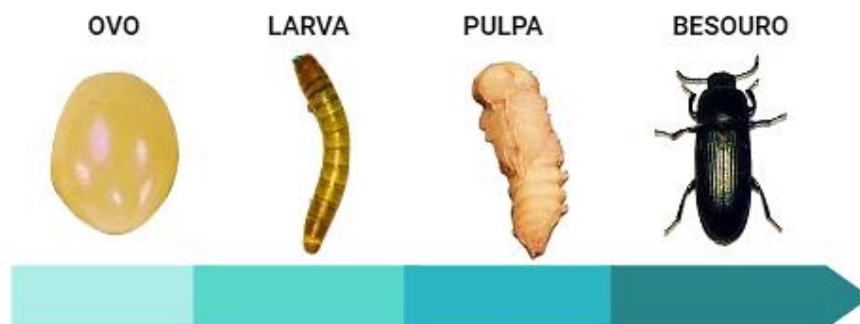


Figura 8. Ciclo de vida de *Tenebrio molitor*. Ovo; Larva; Pupa e Besouro

Como em outras espécies da classe Insecta, *T. molitor* exibe sistema imune com componentes inatos, incluindo barreiras físicas, químicas além de componentes imunológicos humorais e celulares, como detalhado a seguir:

- ✂ Barreiras físicas: tegumento e epitélio intestinal;
- ✂ Mediadores humorais: cascatas que modulam a síntese de reativos de oxigênio e nitrogênio, peptídeos antimicrobianos, e a melanização da hemolinfa;
- ✂ Células associadas a resposta imune: hemócitos que realizam a fagocitose, encapsulação e nodulação (essas células se juntam para eliminar da circulação os patógenos que estão em alta quantidade no corpo do inseto). (Lavine; Strand, 2002; Urbanski *et al.*, 2018; Vommaro, Giglio; 2021):

Nos estudos que envolvem produtos naturais e fazem uso de extratos, a forma larval é a mais frequentemente utilizada e o tratamento é injetado na cavidade intracelômica, na região do quarto metâmero na porção ventral da larva. O uso da forma larval encontra respaldo em sua rápida reprodutividade, fácil manuseio e manutenção. Além disso, exibe um sistema imunológico inato semelhante ao dos vertebrados, desenvolvendo infecções causadas pelos mesmos patógenos que afetam os humanos. Essa semelhança fundamenta e justifica seu uso como modelo de infecção (Silva *et al.*, 2022; Braga *et al.*, 2024).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antibacteriano do extrato das flores de *Anacardium occidentale* (EAO) em bactérias do grupo ESKAPE *in vitro* e na infecção letal ocasionada por *Staphylococcus aureus* *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- œ Caracterizar a química do extrato das flores de *A. occidentale*
- œ Investigar o efeito antibacteriano do extrato sobre bactérias do grupo ESKAPE;
- œ Investigar a ação antivirulência do extrato sobre *S. aureus*, MRSA e *E. coli*;
- œ Avaliar o efeito do extrato na sobrevivência de larvas de *T. molitor* infectadas letalmente por *S. aureus*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato das flores de *Anacardium occidentale* (EAO)

As flores de *A. occidentale* foram coletadas no mês de outubro de 2022, no período matutino, na Universidade Federal do Maranhão, campus São Luís, nas seguintes coordenadas geográficas 2°55'34''S e 44°30'58''O. O material botânico foi identificado no Herbário do Maranhão, onde a exsicata está depositada sob o número o n° 14.709 (Anexo 1). O projeto está cadastrado no SisGen AAA8E4B (Anexo 2).

As flores foram secas em temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), por 7 dias, ao abrigo da luz. O material seco foi triturado em moinho de facas e o pó resultante foi utilizado para a obtenção do extrato etanólico, pelo método de maceração exaustiva em etanol absoluto P.A, repetindo o processo a cada 7 dias, por 3 semanas (Oliveira *et al.*, 2019).

O extrato etanólico das flores de *A. occidentale* (EAO) foi submetido a rotaevaporação, seco a jato frio, resultado em 65,21g com rendimento médio de 36,31%. Ao final o extrato foi armazenado em frascos estéreis e escuros, a 4°C, até a utilização nos experimentos.

4.2 Prospecção química do extrato

4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplado ao detector PDA

Os compostos foram eluidos dos cartuchos usando 1 mL da mistura metanol/água (MeOH: H₂O -1: 1, v/v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas em um filtro PTFE de 0,22 µm e secas. O extrato seco foi diluído na concentração de 10 mg/mL em solvente de HPLC. Aliquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no equipamento (HPLC-PDA - Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) e as leituras realizadas a 270 nm e 365 nm.

Foi usado um sistema HPLC modelo Shimadzu que consiste em um módulo de fornecimento de solvente com uma bomba recíproca de êmbolo duplo e um detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna usada foi a Luna 5µm C18 100 A (150 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição usados foram A (2% de ácido acético em água) e B (metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 5% a 60% de B em 60 minutos. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção

da amostra foi de 20 µL. Os dados foram coletados e processados com o software LC Solution (Shimadzu) (Lopes *et al.*, 2024).

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas-LC-ESI-IT/MS.

A caracterização química foi realizada por LC-ESI-IT-MS com um espectrômetro (amaZon SL Bruker Daltonics®, Massachusetts, EUA). A análise cromatográfica foi conduzida em uma coluna Luna 5 µm C18 100 Å (250 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, EUA), com um HPLC Prominence Shimadzu®. A fase móvel em gradiente binário consistiu de ácido fórmico (0,1% - Sigma-Aldrich, St. Louis, LO, EUA) em água (solvente A) e de ácido fórmico em metanol (0,1% - Sigma-Aldrich, St. Louis, LO, EUA) (solvente B). As amostras (1 mg mL⁻¹) foram eluídas da coluna analítica com gradiente variando de 5 a 100% do solvente B, com uma taxa de fluxo constante de 1 mL min⁻¹, durante 40 minutos. O volume de injeção foi de 2 µL.

A temperatura do compartimento da coluna foi ajustada para 40 °C. A aquisição de dados foi realizada no modo de ionização negativa, com fragmentação em múltiplos estágios (MS2 e MS3), de acordo com os seguintes parâmetros: pressão do gás de nebulização de 50,0 psi; temperatura do capilar de 300 °C; voltagem de entrada do capilar de transferência de 4500 V; gás de desolvatação, nitrogênio (N₂), fluxo de 10 L min⁻¹; gás de colisão, hélio (He); faixa de aquisição, m/z 50-1200. Os dados brutos foram analisados utilizando o software Data Analysis 4.3 (Bruker, Massachusetts, EUA).

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do EAO

4.3.1 Microrganismos

Cepas padrão de bactérias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC25923); Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603) foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. Enquanto as linhagens clínicas multirresistentes: MRSA, MRSA (240016969962) e MRSA (240016969961) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Valerio Monteiro Neto no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA). Para utilização as bactérias foram reativadas em caldo Mueller-Hinton a 37 °C, por 24 horas, para utilização nos testes de avaliação antimicrobiana.

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio antimicrobiano foi realizado pelo método de microdiluição, em microplacas estéreis de 96 poços de fundo plano, segundo a norma M7-A6 descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

As cepas padrão de *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*; e as cepas clínicas de MRSA foram reativadas em caldo Mueller-Hinton, semeadas em ágar Muller-Hinton, (Merck, Brasil) e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após este período as bactérias foram ressuspensas em solução salina e inicialmente o inóculo foi ajustado visualmente para 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A suspensão resultante foi homogeneizada (Vortex®) durante 15 segundos e a densidade celular ajustada com auxílio de um espectrofotômetro, medindo-se a absorbância a 600nm, resultando na obtenção de suspensão correspondente a 0,5 da escala de McFarland, conforme comparação com solução padrão, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Monteiro-Neto *et al.*, 2020).

Para a determinação do CIM os isolados bacterianos em caldo Muller-Hinton (10µL) foram adicionados aos poços contendo diferentes concentrações do EAO (200 – 0,390625 mg/mL). O antibiótico Ciprofloxacina (CFX) foi utilizado como controle positivo (200 – 0,390625 µg/mL) e o DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich; 2% em solução salina), usado para aumentar a solubilidade do extrato bruto, foi considerado como controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Decorrido o tempo a leitura foi realizada a absorbância de 600 nm e as placas coradas com resazurina. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. O ensaio foi realizado com amostras individuais testadas em sextuplicada (Algaffar *et al.*, 2023). A razão CBM/CIM foi calculada para determinar se o EAO apresenta atividade bactericida (CBM/CIM <4) e bacteriostática (CBM/CIM >4) (Siddiqui *et al.*, 2013).

4.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada a partir dos resultados da CIM, em placas de Petri contendo (Ágar Mueller-Hinton) AMH se transferiu 10 µL de cada poço partindo do poço de CIM para a maior concentração; após as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Foi realizada a leitura da CBM, observando as concentrações em que se apresentou ausência de crescimento bacteriano, classificando-se como capazes de reduzir por completo o

crescimento dos microrganismos e quando observado a formação de mais de três Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram consideradas não inibitórias ao crescimento (Xavier *et al.*, 2023).

4.3.4 Erradicação da adesão e biofilmes pré-formado e formado

Para a avaliação da atividade de antivirulência do EAO escolhemos a partir do melhor resultado de CIM as seguintes linhagens bacterianas *S. aureus* (ATCC25923), MRSA (240016969662) e *E. coli* (ATCC25922). A erradicação da adesão e biofilmes pré-formados e formados de *S. aureus*, MRSA e *E. coli* foram avaliadas conforme descrito por Monteiro-Neto *et al.*, 2020. Além da quantificação da biomassa de biofilme baseada em cristal violeta (CV), a viabilidade celular dos biofilmes foi determinada utilizando MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio).

No ensaio de adesão e biofilme pré-formado, foram adicionados caldo Muller Hinton (CMH) aos poços de uma placa de cultura, fundo chato, 96 poços, em seguida os isolados bacterianos (10µL) e o tratamento com as concentrações subinibitórias de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e da ciprofloxacina, usada como controle positivo (CFX). Logo após, as placas foram incubadas, respectivamente, por 90 minutos e 24 horas a 37°C.

Para a avaliação do biofilme formado, primeiramente se adicionou CMH, os isolados bacterianos, e as placas foram incubadas durante 24 horas. Após esse período, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e tratadas com concentrações suprainibitórias do extrato e da CFX correspondentes aos valores de $2\times$ e $4\times$ da CIM. Em seguida as placas foram novamente incubadas por 24 horas a 37°C.

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi removido e o material remanescente foi lavado duas vezes com PBS. Nas placas reservadas para o MTT, após a lavagem, foram adicionados 100 µL do AMH em cada poço e 50 µL de MTT/poço e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C.

Nas placas coradas com cristal violeta (CV), após a etapa de lavagem, foram adicionados 200 µL de metanol, durante 15 minutos, para fixar. O metanol foi removido, as placas foram mantidas invertidas para secarem, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados aos poços 100 µL de CV (5%), por 10 minutos, logo após,

o CV dos poços foi descartado e os cristais foram dissolvidos em 200 µL de metanol. A absorbância foi mensurada a 570 nm e a 600nm.

4.4 Ensaios *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*

4.4.1 Avaliação da toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito por Silva *et al.* (2020) e Brai *et al.* (2023) com adaptações. Para o ensaio foram utilizadas larvas de *T. molitor* (n=10 larvas/ grupo). Foram selecionadas larvas com tamanho entre 1,5 a 2,0 cm. As larvas foram tratadas com o extrato em concentrações correspondentes a ½ CIM (3,125 mg/mL); CIM (6,25 mg/mL); 2× CIM (12,50 mg/mL); 4× CIM (25mg/mL); 8×CIM (50mg/mL) e 16× CIM (100mg/mL). A descrição dos grupos experimentais está detalhada a seguir:

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTO
Limpo	-
DMSO	DMSO 2%
PBS	PBS
EA01/2	EA0 - 3,125 mg/ML
EA0C	EA0 - 6,25 mg/mL
EA02	EA0 - 12,5 mg/mL
EA04	EA0 - 25 mg/mL
EA08	EA0 - 50 mg/mL
EA016	EA0 - 100 mg/mL

O monitoramento de sobrevivência foi feito diariamente, a cada 24h, até 168h. A morte das larvas foi avaliada macroscopicamente, considerando a ausência de resposta ao toque, falta de motilidade e a presença de melanização (Souza *et al.*, 2015).

4.4.2 Padronização de inóculo letal de *S. aureus*

Para a preparação dos inóculos, as bactérias foram cultivadas em AMH, 24 horas antes do experimento. O ensaio de sensibilidade das larvas de *T. molitor* foi conduzido com adaptações, utilizando inóculos que variaram de 10¹ a 10⁷ UFC/µL, (Mcgonigle *et al.*, 2016). As larvas foram então infectadas (5µL) e monitoradas quanto a sobrevivência por 3 dias. Foram utilizadas 5 larvas por grupo. Os testes foram realizados em triplicata utilizando os

seguintes grupos conforme as concentrações do inóculo para infecção por *S. aureus* variando de 10^1 a 10^7 , além de um grupo controle que recebeu PBS ic (5 µL).

4.4.3 Infecção Letal

Para avaliar efeito do EAO na infecção letal as larvas foram distribuídas nos seguintes grupos, considerando a concentração do extrato com base nos valores de CIM:

GRUPOS	TRATAMENTO (5µL/ic)
Controle negativo (C-)	PBS
CiPro	ciprofloxacina (1,56 µg/mL)
EAO1/2	extrato (3,12 mg/mL)
EAO CIM	extrato (6,25 mg/mL)
EAO2	extrato (12,5 mg/mL)

As larvas foram paralisadas, por resfriamento com gelo, e receberam 5 µL do inóculo ($1,5 \times 10^5$ UFC/µL) *S. aureus*, via intracelômica (ic). O tratamento com EAO ocorreu logo em seguida, utilizando a mesma via, no quarto metâmero, na porção ventral.

Após o tratamento as larvas foram transferidas para placas de Petri, contendo ração padronizada e ao abrigo da luz. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 3 dias, para avaliação da sobrevida das larvas (item 4.3.1).

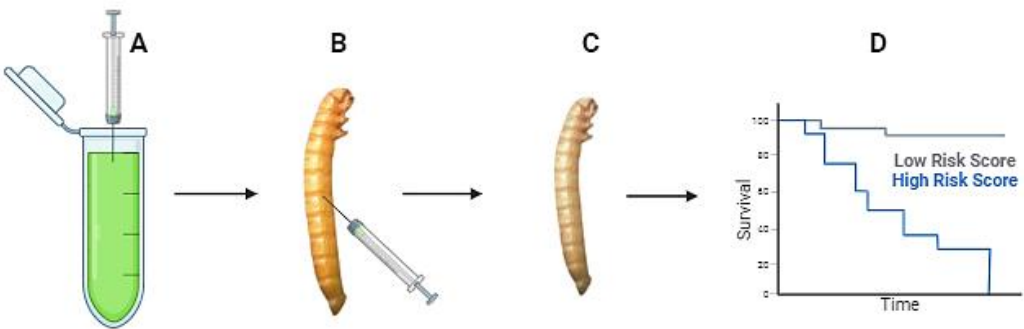


Figura 9. Resumo ilustrativo da infecção aguda. (A) substância teste; (B) infecção usando seringa analítica; (C) larva com tratamento; (D) avaliação de morte e aplicação do teste estatístico.

4.4.4 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em larvas de *T. molitor* infectadas letalmente por *S. aureus*

A quantificação da carga bacteriana de UFC em larvas de *T. molitor* foi realizada conforme descrito anteriormente, com algumas adaptações de Oliveira, (2022) e Mcgonigle *et al.*, (2016). As larvas (n=10 larvas/ grupo) foram infectadas com 5µL/ic do inóculo de *S. aureus* na concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL e foram eutanasiadas no tempo de 6h. O ensaio foi realizado em quaduplicada. A contagem da UFC foi realizada após a eutanásia. Para a avaliação as larvas foram trituradas em 5 ml de PBS estéril e a suspensão resultante foi diluída (10^1 a 10^4). Em seguida, foram transferidos 100 µL das suspensões com menor diluição (10^4) para placas de Petri contendo meio Mannitol Salt Ágar (Kasvi, São Paulo, Brasil). Após, as placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C e as UFC foram quantificadas ao final do período de incubação.

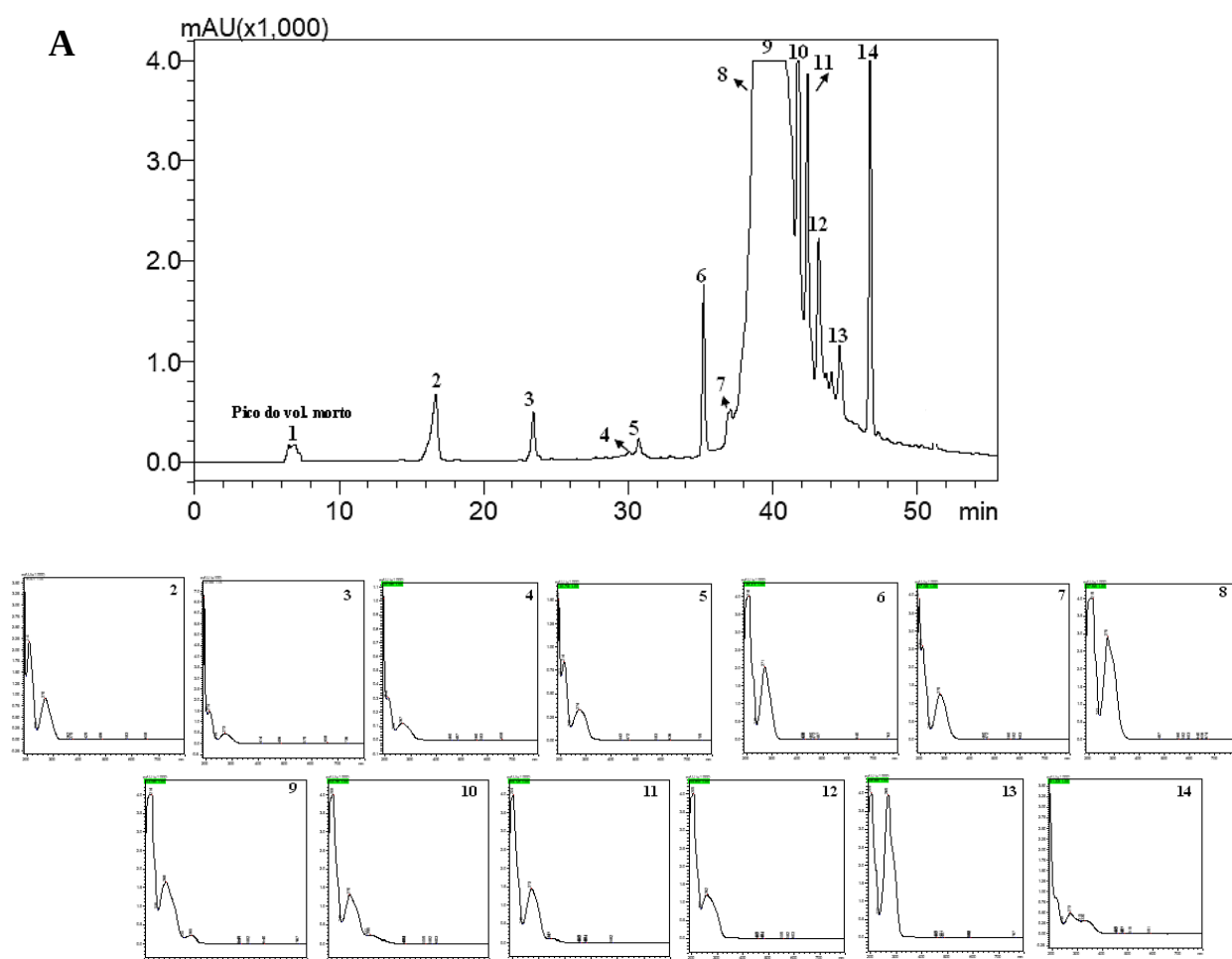
4.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e em seguida avaliados pelo teste t de *Student*, na comparação de dois grupos, ou por análise de variância (ANOVA), na comparação de vários grupos, seguida do teste de comparações múltiplas (Newman-Keuls) (Sokal; Rohlf, 1996). Para avaliação da sobrevida foi utilizada a Curva Kaplan-Meier, seguida de teste de Log-Rank. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 10.0. Todos os dados foram expressos em gráficos utilizando os valores da média $\pm$ desvio padrão considerando como significância $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise química e identificação das substâncias presentes no EAO

O extrato apresentou tempos de retenção entre 16 e 55 minutos, correspondentes à 14 compostos, com perfis de comprimentos de ondas diferentes, variando entre 270 nm e 365 nm (Figura 10A). Os comprimentos de onda na figura 10A indicam a presença de ácidos, compostos presentes no gênero *Anacardium*. Usando LC-MS foram identificados no extrato os seguintes compostos: ácido chiquímico, ácido gálico, quercetina, isoquercetina, galoil glucose, digaloilglucose, isômero 1 e isômero 2 de tetragaloilglucose (Figura 10B e 10C).



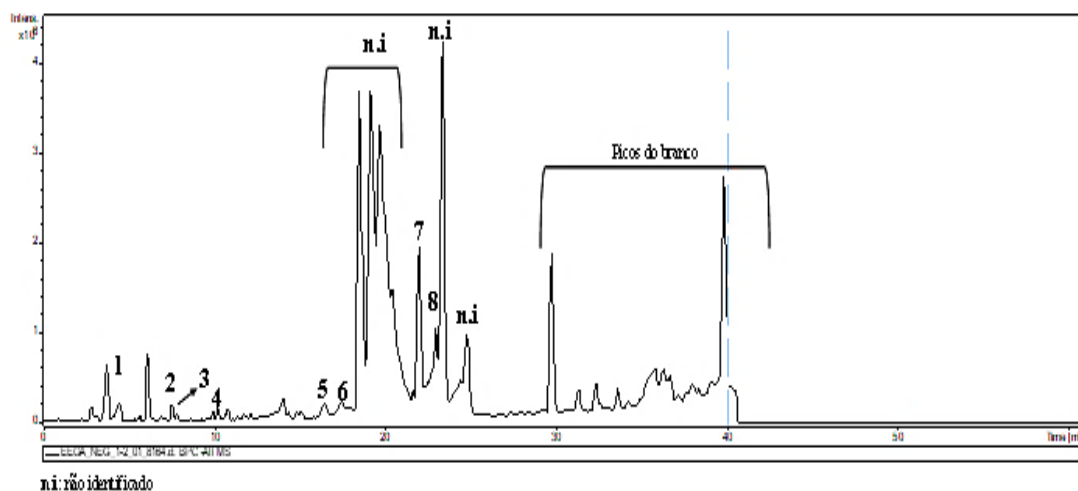
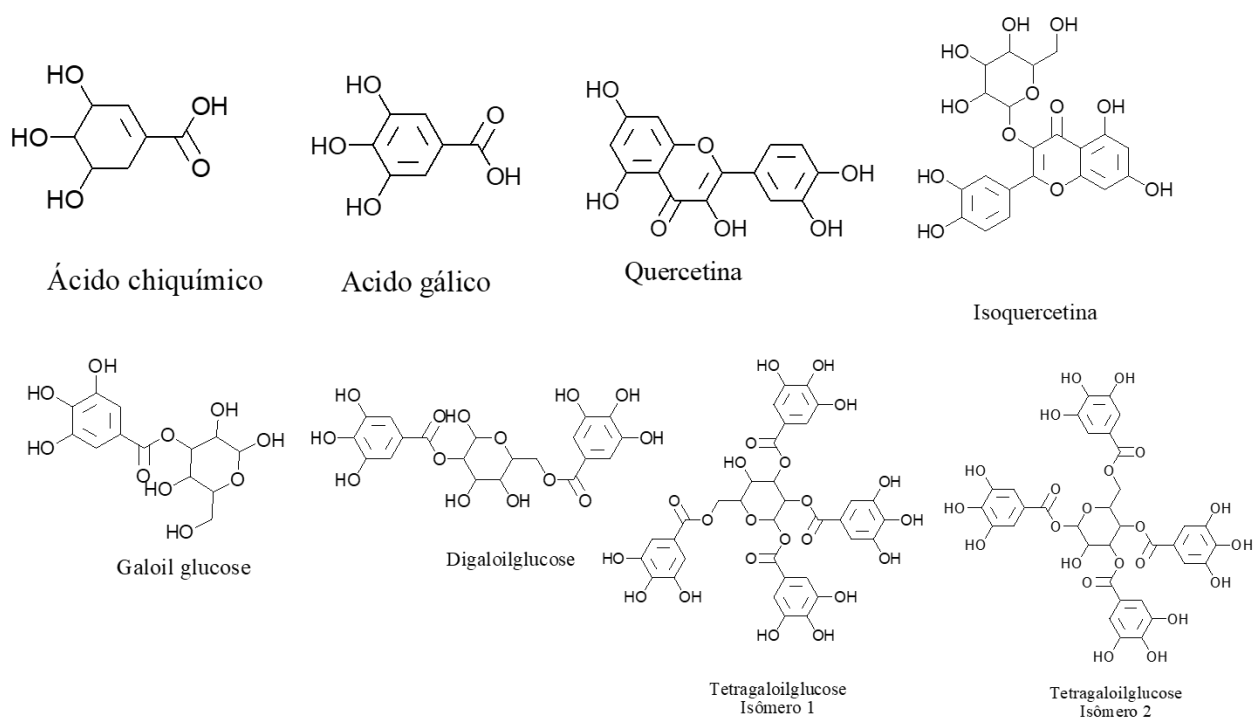
B**C**

Figura 10: Avaliação química do extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale* L (A) Cromatograma de UV-Vis em 254nm, (B) Cromatograma de íons totais (LC-ESI-IT/MS), e (C) Compostos identificados.

Tabela 5. Compostos obtidos após a caracterização química do extrato etanólico de *Anacardium occidentale* por LC-ESI-IT/MS.

Número	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Composto
1	173	155;137; 111; 93	Ácido chiquímico
2	331	273; 169	Galoil glucose
3	169	125	Ácido gálico
4	483	405; 437; 383	Digaloilglucose
5	787	617; 573; 467; 405	Tetragaloilglucose (Isômero 1)
6	787	617; 467; 291; 261	Tetragaloilglucose (Isômero 2)
7	483	303	Isoquercetina
8	301	-	Quercetina

5.2. Atividade antimicrobiana do EAO frente a bactérias do grupo ESKAPE

A Tabela 5 mostra que o EAO apresentou ação antibacteriana *in vitro* contra todos os microrganismos testados, sendo que a melhor atividade foi para *Staphylococcus aureus* com menores valores de CIM = 6,25 mg/mL e de CBM = 12,5 mg/mL. O extrato também exibiu ação antimicrobiana para *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, com valores similares de CIM = 12,5 mg/mL e CBM = 25 mg/mL. Entretanto, o EAO foi pouco efetivo para *Klebsiella pneumoniae* (CIM = 50 mg/mL e CBM = 100 mg/mL). No que se refere as cepas de MRSA, o extrato foi igualmente eficaz contra todas as amostras testadas de acordo com os valores de CIM (12,5 mg/mL) e CBM (25 mg/mL). O tratamento ciprofloxacina foi efetivo para todas as amostras. Em todas as amostras bacterianas tratadas com EAO a razão entre CBM/CIM, foi igual a 2, por isso o extrato pode ser classificado como bactericida conforme Siddiqui *et al.*, 2013.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale* (EAO) em culturas de bactérias Gram-positivas; Gram-negativas do grupo ESKAPE.

Bactérias (10 ⁸ UFC/mL)	EAO ^a (mg/mL)		CBM/ CIM	Ciprofloxacina (µg/mL)	
	CIM ^b	CBM ^c		CIM	CBM
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	6,25 ^d	12,50	2,0	1,56	3,12
MRSA	12,50	25,00	2,0	200,00	200,00
MRSA (240016969961)	12,50	25,00	2,0	12,50	12,5
MRSA (240016969962)	12,50	25,00	2,0	1,56	12,50
<i>E. faecalis</i> (ATCC29212)	12,50	25,00	2,0	2,60	5,20
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	12,50	25,00	2,0	3,12	6,25
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC700603)	50,00	100,00	2,0	2,08	4,16

(a) EAO: Extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale*.;

(b) CIM: Concentração Inibitória Mínima.;

(c) CBM: Concentração Bactericida Mínima.

(d) Os valores expressos correspondem a média de amostras testadas em triplicata.

5.3 O tratamento com o EAO reduziu a adesão e os biofilmes de *S. aureus*, MRSA e *E. coli*

O tratamento com o EAO nas concentrações subinibitórias e inibitórias reduziu a adesão (Figuras 11) e os biofilmes bacterianos (Figura 12 e 13). O extrato quando utilizado em concentrações sub-inibitórias (1/2CIM e 1/4CIM) foi mais efetivo em inibir a adesão, de *S. aureus* (Figura 11A) MRSA (Figura 11C), do que para *E. coli* (Figura 11B) quando avaliamos a biomassa. Resultados semelhantes foram observados quando avaliamos a viabilidade (Figuras 11D; E; e F), sendo que em relação a viabilidade as culturas de MRSA tratadas com a maior concentração apresentaram menor adesão do que o observado nos demais grupos, mesmo sendo diferentes do controle não tratado.

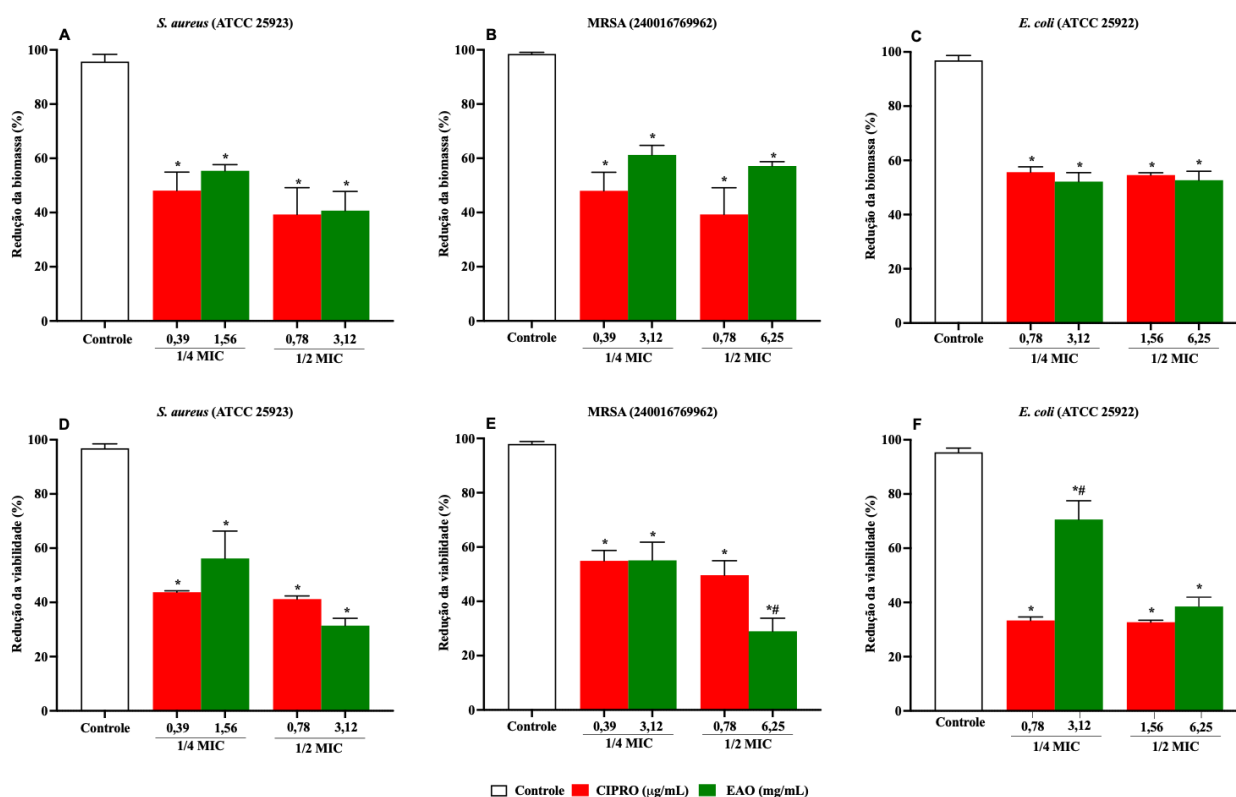


Figura 11. O extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale* (EAO) inibiu a adesão de *S. aureus* (A; D), MRSA (B; E) e *E. coli* (C; F), considerando a redução da biomassa (A; B; C) e a viabilidade (D; E; F). A inibição da adesão foi determinada em culturas bacterianas tratadas com concentrações sub-inibitórias correspondentes a 1/4 e 1/2 do valor de CIM do extrato (EAO) e da Ciprofloxacina (CIPRO) para cada uma das culturas e comparadas as culturas não tratadas (Controle). As amostras foram avaliadas considerando a densidade óptica (570 nm). Os dados correspondem a média-desvio padrão de amostras testadas em quintuplicata. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle não tratado e (#) em relação ao grupo CIPRO.

O tratamento com EAO inibiu os biofilmes pré-formados (Figura12) de todas as culturas bacterianas testadas, quando foi avaliada a biomassa (Figuras 12A; B; C) ou a viabilidade (Figuras 12D; E; F).

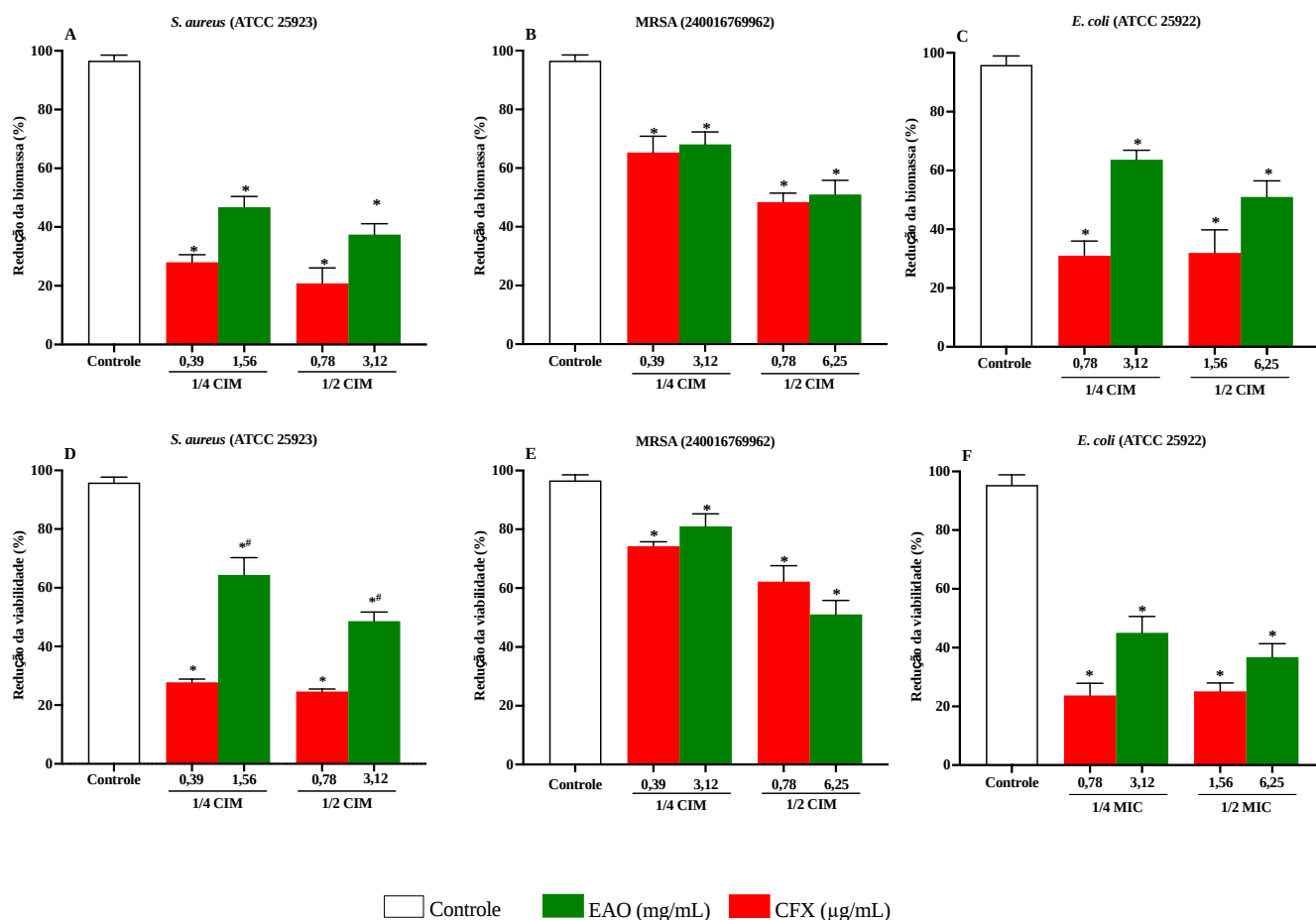


Figura 12. O extrato etanólico de *Anacardium occidentale* (EAO) inibiu a evolução do biofilme pré-formado de *S. aureus* (A; D), MRSA (B; E) e *E. coli* (C; F), considerando os efeitos sobre a biomassa (A; B; C) e sobre a viabilidade das culturas bacterianas tratadas com concentrações subinibitórias correspondentes a 1/4 e 1/2 CIM do extrato (EAO) e da Ciprofloxacina (CIPRO). Os resultados obtidos por densidade ótica (570 nm) correspondem a média-desvio padrão de amostras testadas em quintuplicata. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle e (#) em relação ao grupo CIPRO.

O tratamento com as concentrações inibitórias do extrato correspondentes a 2× CIM e 4×CIM também inibiu o crescimento do biofilme formado para todas as três culturas de bactérias testadas, quando em comparação ao controle não tratado, considerando os efeitos sobre a biomassa (Figuras 13 A; B e C) e a viabilidade (Figuras 13 D; E; F). Os melhores resultados foram para *S. aureus* (Figura 13A). Efeitos semelhantes do EAO em relação a

biomassa foram observados para MRSA (Figura 13B) e *E. coli* (Figura 13C). O tratamento com EAO inibiu a viabilidade do biofilme formado de todas as amostras testadas, com maior eficiência nas amostras de *S. aureus* (Figura 13D) e MRSA (Figura 13 E), embora também tenha sido efetivo para *E. coli* (Figura 13F).

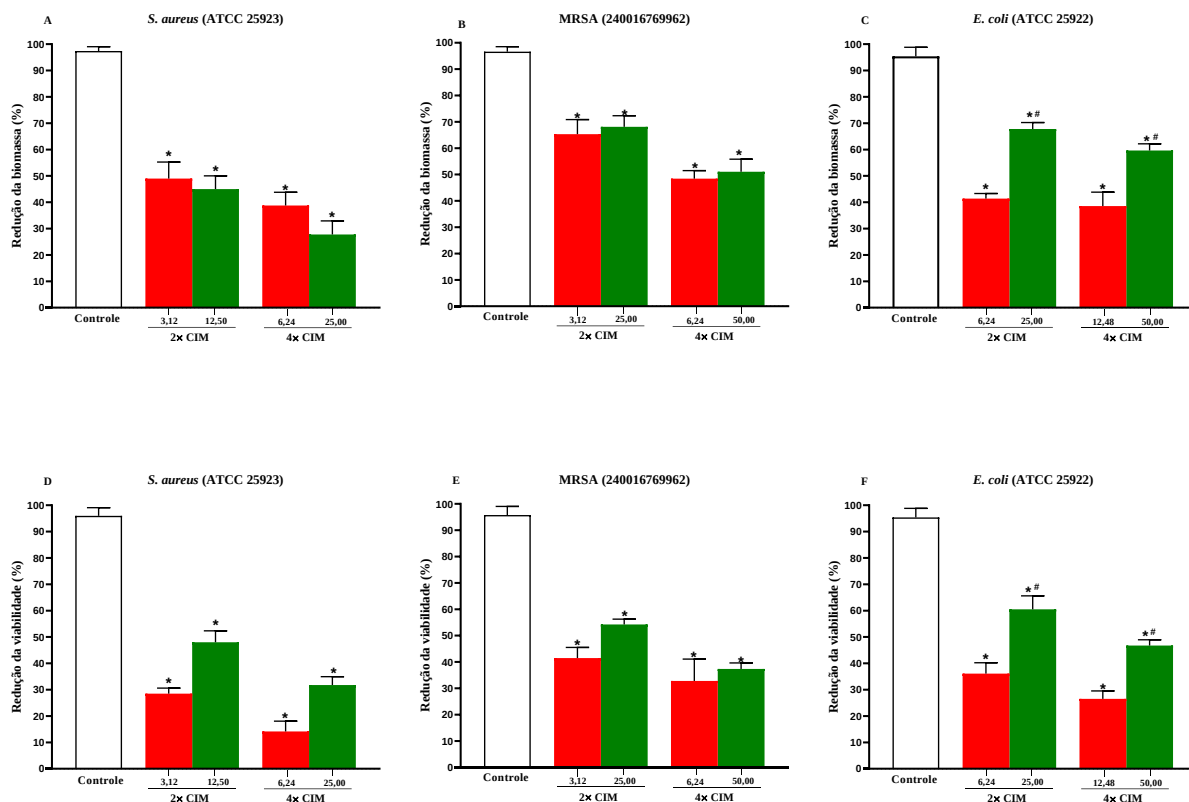


Figura 13: O extrato etanólico de *Anacardium occidentale* (EAO) inibiu o biofilme formado de *S. aureus* (A; D), MRSA (B; E) e *E. coli* (C; F), considerando os efeitos sobre a biomassa (A; B; C) e sobre a viabilidade (D; E; F) das culturas bacterianas tratadas com concentrações supra inibitórias do extrato (EAO) e da Ciprofloxacina (CIPRO), correspondentes a 2x e 4x CIM. Os resultados obtidos por densidade ótica (570 nm) correspondem a média-desvio padrão de amostras testadas em quintuplicata. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle e (#) em relação ao grupo CIPRO.

5.4 O EAO apresenta baixa toxicidade para larvas de *T. molitor*

O extrato bruto nas concentrações de CIM (6,25 mg/mL), 2×CIM (12,5 mg/mL) e 4×CIM (25 mg/mL) não apresentou toxicidade para as larvas, pois a viabilidade ao final da avaliação foi de 100% de sobrevivência. Entretanto, ocorreu redução da sobrevivência de 20% na concentração correspondente a 8×CIM (50 mg/mL) e de 50% na maior concentração (16×CIM = 100 mg/mL), indicando que essa pode ser a IC50 para as larvas de *T. molitor*.

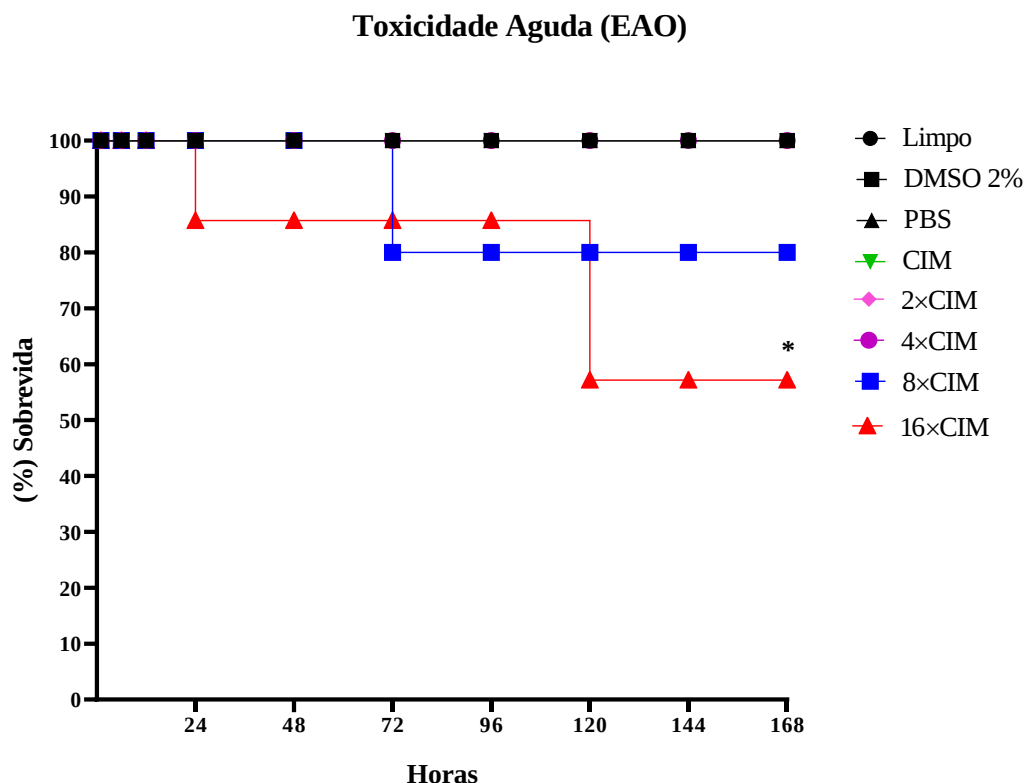


Figura 14. Toxicidade do Extrato Etanólico das flores de *Anacardium occidentale* (EAO) em larvas de *Tenebrio molitor*. As larvas foram tratadas com EAO, por injeção intracelômica, em concentrações correspondentes ao valor de CIM, 2xCIM; 4x; 8x e 16x CIM. O monitoramento foi realizado, a cada 24h, durante 7 dias (168h). Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três ensaios independentes com cada concentração do extrato, agrupados totalizando 30 larvas/grupo. A mortalidade foi avaliada usando curvas de Kaplan-Meier, seguida de teste estatístico de Log-Rank. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao grupo tratado com PBS.

5.5 Determinação do inóculo letal de *S. aureus* na infecção das larvas de *T. molitor*

Para continuar aos testes, escolhemos a bactéria *S. aureus* ATCC 25923, pois, de acordo com o valor de CIM o extrato foi mais efetivo contra essa cepa. A fim de avaliar a susceptibilidade das larvas à infecção por *S. aureus* os animais foram infectados com diferentes concentrações das suspensões bacterianas, variando de 10^7 a 10^1 CFU/mL. Os resultados mostram que os inóculos entre 10^5 e 10^7 UFC/ μ L, apresentaram resultados semelhantes com a morte de 100% das larvas ocorrendo em até 24 horas após a infecção. No grupo infectado com 10^4 UFC/ μ L a morte de 100% das larvas ocorreu somente após 72 horas, portanto mais tardiamente. Enquanto os inóculos bacterianos menores, variando

de 10^1 a 10^3 ; UFC/ μ L, apresentaram baixa letalidade com sobrevivência de 40% das larvas até o final da avaliação (Figura 15). Assim, considerando que os resultados com as maiores concentrações foram semelhantes, escolhemos o inóculo de 10^5 UFC/ μ L de *S. aureus* para os demais ensaios.

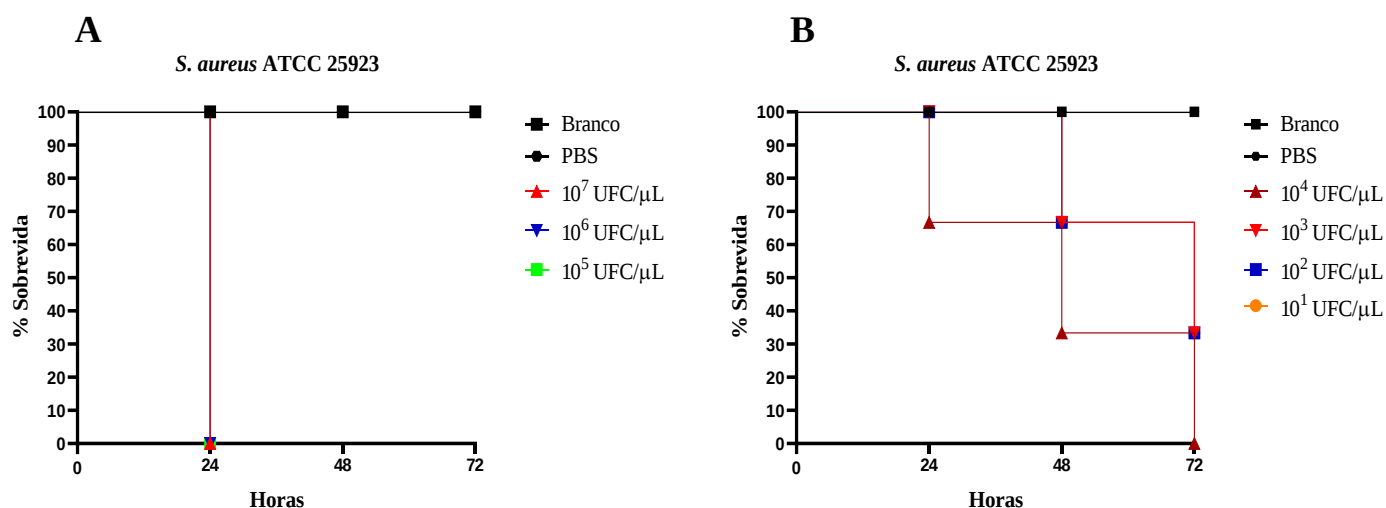


Figura 15. Determinação do inóculo de *S. aureus* capaz de ocasionar infecção letal em larvas de *Tenebrio molitor*. Foram utilizadas concentrações bacterianas crescentes (10^1 a 10^7 UFC/ μ L) para a infecção. O monitoramento foi realizado durante 3 dias. Os dados se referem a média $\pm$ desvio padrão de três ensaios independentes agrupados totalizando 30 larvas/grupo. As análises utilizaram curvas de Kaplan-Meier, seguida de teste estatístico de Log-Rank. (*) $p \leq 0,05$ na comparação aos animais não tratados.

5.6 Confirmação da infecção de *T. molitor* por *S. aureus*

O gráfico 16A demonstra aumento no número de UFC de *S. aureus* 6 horas depois da infecção em larvas de *T. molitor*. A carga bacteriana é bastante elevada, quando comparadas com as culturas de larvas não infectadas, indicando o sucesso na indução da infecção.

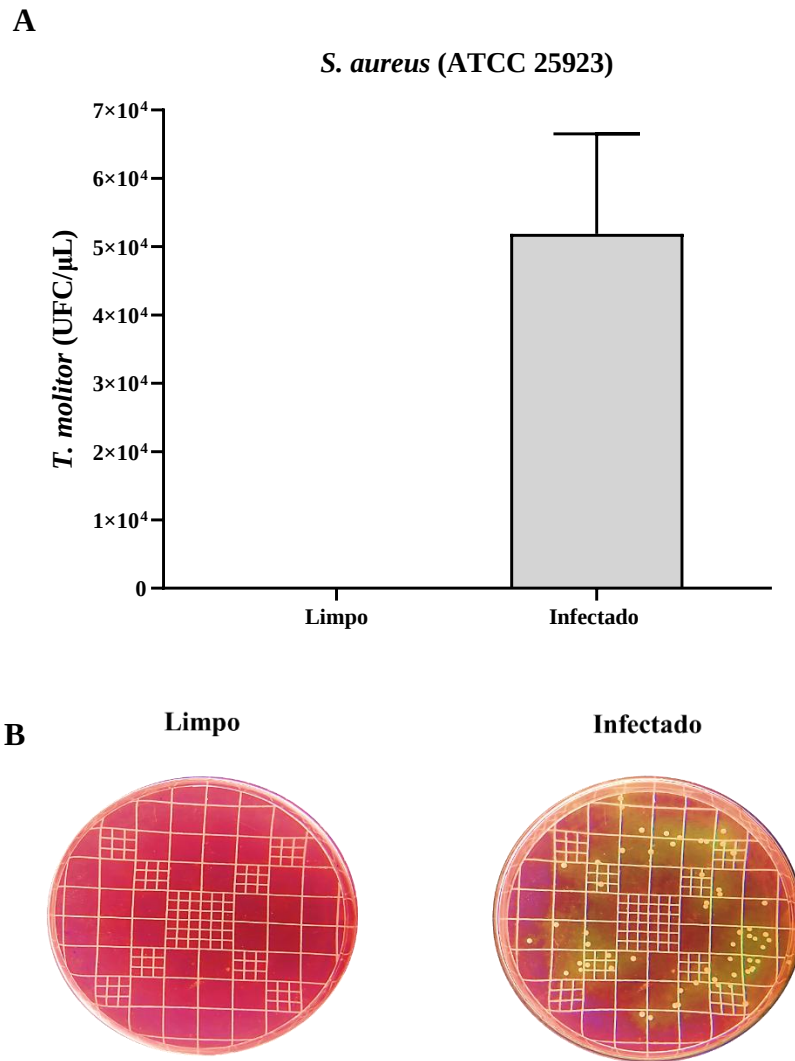


Figura 16. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em larvas de *T. molitor* infectadas com *S. aureus* (ATCC25923) (A). Grupos com 10 larvas foram infectadas com *S. aureus* ($1,5 \times 10^5$ UFC/μL) e eutanasiadas após 6h. Em B, fotomicrografias das placas de culturas. Os dados foram analisados em relação ao controle não infectado, por teste *t* de Student, de amostras individuais testadas em quadriplicata com (*) $p \leq 0,05$.

5.7 O tratamento com EAO prolonga a sobrevida das larvas de *T. molitor* infectadas letalmente com *S. aureus*

A figura 17A mostra que o tratamento EAO assegurou a sobrevivência das larvas infectadas letalmente com *S. aureus*, sendo que a concentração de $2 \times$ CIM foi a mais eficaz, pois assegurou a sobrevivência de 70% das larvas. Nos grupos tratados com EAO na concentração de CIM, a sobrevivência foi de 50%. Já o tratamento com doses subinibitórias foram pouco efetivos em assegurar a sobrevida (20%).

A Figura 17B mostra os dados relativos à expectativa de vida. É possível observar uma taxa de 90% de expectativa de vida nos animais do grupo 2× CIM, de 70% no grupo CIM e de 60% no grupo ½ CIM, ainda assim superior a observada no controle infectado e não tratado.

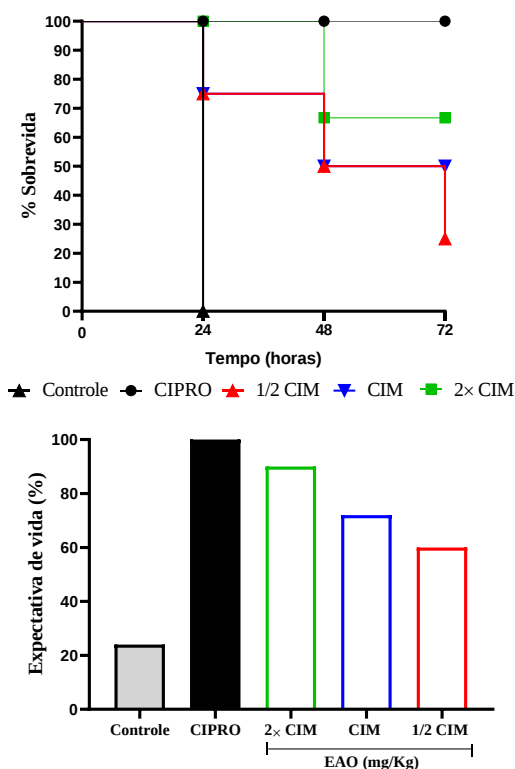


Figura 17. O tratamento com o extrato etanólico das flores de *Anacardium occidentale* (EAO) aumenta a sobrevida (A) e a expectativa de vida (B) de larvas de *T. molitor* infectadas com *S. aureus* (ATCC25923). Grupos com 10 larvas foram infectadas com *S. aureus* ($1,5 \times 10^5$ UFC/ μ L) e tratadas com diferentes concentrações do EAO, por via intracelômica em valores correspondentes a 2× CIM, CIM e ½ CIM. A sobrevida foi acompanhada durante 3 dias, considerando n= 10 larvas/grupo. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle infectado e não tratado.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do EAO frente a culturas bacterianas do grupo ESKAPE incluindo *S. aureus* metilina resistente (MRSA). *A. occidentale* e seus metabolitos secundários têm sido amplamente investigados como alvos promissores nos estudos de bioprospecção de compostos antimicrobianos (Cunha; David, 2024). Ainda assim, estudos quanto ao potencial do extrato etanólico das flores de *A.*

occidentale (EAO) sobre os membros do grupo ESKAPE e seus fatores de virulência são escassos.

A caracterização química do extrato identificou 14 picos correspondentes ao ácido chiquímico, ácido gálico, quercetina, isoquercetina, galoil glucose, digaloilglucose, isômero 1 e isômero 2. Compostos semelhantes foram descritos por Silva *et al.*, (2016), incluindo ácido gálico e ácido chiquímico. Entretanto, nas nossas análises não identificamos a presença do ácido anacárdico, descrito anteriormente por Oliveira (2022), ao analisarem extrato por espectrometria de massa, possivelmente, devido a técnica de análise utilizada, ou ao período da coleta do material vegetal, pois há evidências que as condições ambientais influenciam significativamente a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários em plantas medicinais (Mohammadi *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2024). No entanto, não temos evidências quanto as variações de temperatura, pluviosidade e outros dados ambientais sobre a composição dos metabólitos secundários das flores de *A. occidentale*, o que abre uma nova possibilidade de investigação futura visando estabelecer a relação entre a qualidade da planta medicinal e os fatores ecológicos.

Importante mencionar que está é a primeira vez que são identificadas no extrato das flores do cajueiro a quercetina e isoquercetina na forma glicosilada. Embora esses compostos já tenham sido identificados em extratos oriundos de outras partes de *A. occidentale* ou em outras espécies do gênero *Anacardium* (Chaves *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2022). A quercetina é um flavonoide amplamente investigado devido às suas várias propriedades biológicas, que incluem a ação antimicrobiana contra bactérias, como *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) entre outras (Li *et al.*, 2012; Nguyen; Bhattacharya, 2022).

Há evidências de que os flavonoides, como a quercetina e a apigenina, podem modificar a permeabilidade da parede celular e a membrana das bactérias, devido a sua afinidade com essas estruturas, resultando em disfunção metabólica (Eumkeb *et al.*, 2013 Hooda *et al.*, 2020). Adicionalmente, há relatos que os polifenóis podem impedir a expressão da molécula *quorum sensing*, sinalizadora essencial para o aumento da densidade e maturação do biofilme (Roy *et al.*, 2018).

Os demais compostos identificados no extrato como os ácidos gálico e chiquímico são amplamente estudados quanto as suas atividades biológicas. O ácido gálico atua na lise das membranas bacterianas; enquanto o ácido chiquímico, tem sido investigado quanto ao seu potencial coadjuvante com os beta-lactâmicos contra bactérias multirresistentes, incluindo MRSA (Hadidi *et al.*, 2024; Hou *et al.*, 2024). Importante destacar que o ácido chiquímico é precursor intermediário na via do chiquimato, rota importante de síntese de vários metabólitos secundários, incluindo o ácido gálico, que estão envolvidos na defesa da planta. Assim, a identificação do precursor intermediário (ácido chiquímico) e do produto final (ácido gálico) evidencia a capacidade biossintética das flores de *A. occidentale* na produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas (Movahedi *et al.*, 2021).

Um aspecto interessante da nossa avaliação química foi a detecção de isoquercetina glicosilada e a modificação estrutural de flavonoides e taninos hidrolisáveis, como a observada para galoil glucose e suas variações. Essas alterações químicas são importantes pois alteram a biodisponibilidade dos compostos e podem influenciar a afinidade dessas substâncias com os alvos moleculares, impactando na atividade biológica desses compostos (Kováč *et al.*, 2022).

Os ensaios microbiológicos *in vitro*, mostraram que o extrato inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*-ATCC29212 e *Staphylococcus aureus*-ATCC25923) e Gram-negativas (*Escherichia coli*-ATCC25922), resultados semelhantes aos descritos anteriormente por Silva *et al.*, (2016) usando o método de disco- difusão. Os dados mostraram também que *Klebsiella pneumoniae* foi a menos sensível ao EAO, diferentemente do relatado anteriormente por SILVA *et al.*, (2016), indicando que apesar dos extratos utilizados serem oriundo das flores, alterações na composição química podem ter impactado esse resultado. Merece atenção a eficácia do EAO contra as diferentes linhagens clínicas de MRSA aqui testadas, sobretudo se considerarmos o elevado potencial de resistência dessas bactérias aos antimicrobianos convencionais.

Resultados anteriores mostraram a atividade antibiótica do extrato hidroetanólico das cascas do caule e folhas de *Anacardium occidentale* contra cepas padrão de *S. aureus* e MRSA, pelo método de disco de difusão e microdiluição em caldo; relacionando a atividade biológica a presença de taninos, flavonoides, catequinas e alcaloides (Silva *et al.*, 2016; Nisa *et al.*, 2024; Maganda *et al.*, 2024). Entretanto, ao que tudo indica, esse parece

ser o primeiro relato da ação do extrato das flores de *A. occidentale* frente a amostras clínicas de MRSA incluindo efeitos do extrato sobre fatores de virulência como adesão e formação de biofilme.

No presente estudo os resultados mostram que o EAO foi mais eficaz frente as bactérias Gram-positivas sugerindo maior afinidade dos compostos do extrato com as membrana e fatores de virulência desse grupo de bactérias. Relevante lembrar que as bactérias Gram-positivas possuem parede celular mais simples, composta quase que completamente por peptidoglicano, associados à integridade e rigidez bacteriana, além de exotoxinas, compostas pelo ácido lipoteicoico, composto envolvido na adesão dessas bactérias às células animais, como macrófagos e linfócitos. Já as bactérias Gram-negativas apresentam na parede celular bacteriana os lipopolissacarídeos, que funcionam como fator de resistência física e de virulência, além de estarem associados a amplificação das reações inflamatórias e na redução da permeabilidade aos agentes antimicrobianos (Tavares *et al.*, 2020). Mesmo quantidades pequenas de endotoxinas são capazes de induzir a resposta inflamatória, o que contribui para os elevados índices de mortalidade nas infecções bacterianas. Assim, é razoável propor que a atividade antimicrobiana observada para o EAO pode estar associada às características morfológicas dos microrganismos incluindo a afinidade dos compostos presentes no extrato à membrana dessas bactérias.

A partir dos resultados de CIM e CBM, foram selecionadas as amostras padrão de *S. aureus*, *E. coli*, e uma amostra clínica de MRSA para continuar os ensaios *in vitro* na avaliação dos efeitos do extrato sobre a adesão e os biofilmes pré-formados e formados. Os resultados mostraram que o extrato, em todas as concentrações testadas, inibiu tanto a adesão, como os biofilmes quando avaliamos a biomassa e a viabilidade desses fatores de virulência. Tanto a redução da biomassa como a redução da viabilidade bacteriana indicam que o EAO tem ação bactericida, o que se confirma pelos dados relativos à razão CIM/CBM que foi de 2 para as amostras avaliadas, pois de acordo com Siddiqui *et al.*, 2013, esse valor indica que a substância testada é bactericida.

O extrato foi efetivo contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e MRSA na forma planctônica e apresentou atividade quanto a inibição da adesão e formação de biofilmes para essas mesmas bactérias.

A adesão é um dos pontos primordiais no estabelecimento da infecção, por isso há, cada vez mais, estudos sobre a adesão bacteriana visando interromper essa etapa da

infecção. Já existem relatos quanto a atividade do ácido gálico na inibição da adesão de MRSA, considerando tanto a redução da viabilidade como da biomassa (Sang *et al.*, 2024), ou da quercetina em relação a adesão de *Streptococcus mutans*. Entretanto, ao que tudo indica, ainda são escassos os dados sobre o potencial inibitório do extrato das flores sobre esse fator de virulência.

O EAO inibiu a biomassa e a viabilidade de biofilmes pré-formados e formados de todas as espécies bacterianas testadas. A formação de biofilme é um dos maiores desafios na epidemiologia das infecções associadas aos dispositivos médicos, pois essas estruturas contribuem para a disseminação e permanência das infecções, já que se organizam em colônias que impedem a ação do sistema imune dos hospedeiros e dificultam o acesso dos antibióticos (Jamal *et al.*, 2018). Estima-se que mais de 150 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente por infecções do trato urinário associadas ao uso de cateteres, doença mais frequente provocada por biofilme em equipamentos médicos (Mishra *et al.*, 2024; Kosmeri *et al.*, 2024). Nas infecções por biofilme, *E. coli*, *S. aureus* e MRSA são associadas a, respectivamente, 100%, 90% e 60,8% dos casos (Cangui-Pachi *et al.*, 2022), uma das razões que nos motivaram a investigar os efeitos do EAO sobre essas bactérias, já que elas também fazem parte do grupo ESKAPE.

Como observado anteriormente para adesão, também não encontramos dados relativos aos efeitos de extratos das flores de *A. occidentale* sobre a formação de biofilmes. Entretanto, atividade anti-biofilme de extrato da casca da castanha do caju inibiu os biofilmes de espécies do gênero *Streptococcus* e para *Enterococcus faecalis* (Souza *et al.*, 2022). Souza *et al.*, (2022) relataram a ação de redução da biomassa de biofilmes quando tratados com líquidos da casca do caju, atividade semelhante foi descrita por Furtado *et al.*, (2014) ao utilizarem o extrato do bagaço do pedúnculo do cajueiro contra *Streptococcus mutans*. Em relação aos compostos isolados já foi descrita o efeito anti-biofilme de micropartículas de ácido anacárdico para *S. mutans* (Lima *et al.*, 2020) e *E. faecalis* (Borges *et al.*, 2020).

Nas avaliações *in vivo* utilizando as larvas de *T. molitor* observamos que extrato apresentou baixa toxicidade, pois doses de até 50 mg/mL asseguraram a sobrevivência de mais de 80% dos animais. Também observamos que o inóculo de *S. aureus* só foi letal para larvas com concentrações entre 10^5 e 10^7 UFC/ μ L. Em relação aos demais inóculos testados (10^4 até 10^1 UFC/ μ L) foi possível observar uma melhor sobrevivência, com evolução

mais lenta da morte das larvas, indicando que esses inóculos não devem ser utilizados em ensaios que visam avaliar a eficácia de extratos vegetais e outros produtos na sobrevivência das larvas submetidas a infecção letal por *S. aureus*.

O inóculo letal de 10^5 UFC/ μ L foi o selecionado para prosseguir os ensaios *in vivo*, pois ocasionou morte de todas as larvas em até 24 horas. A quantificação de UFC das larvas infectadas mostrou crescimento bacteriano exponencial quando as larvas foram avaliadas 6 horas após a infecção. Esses resultados se correlacionam com o observado na prática clínica, em que a mortalidade de pacientes, especialmente imunossuprimidos ou em uso de dispositivos médicos, com bacteremias severas em UTIs, geralmente ocorre de 24 à 72 horas (Oliveira *et al.*, 2012).

A partir dos dados de toxicidade e padronização de inóculo para *T. molitor*, avaliamos os efeitos do extrato na infecção letal por *S. aureus*. Os resultados mostraram que o tratamento com as três concentrações utilizadas do EAO prolongou a sobrevivência e aumentou a expectativa de vida das larvas, de forma dose dependente. A maior concentração do EAO ($2 \times$ CIM) foi a mais eficaz, seguido do tratamento com CIM e $\frac{1}{2}$ CIM.

A resposta imune de insetos durante as infecções bacterianas é, principalmente, mediada pelos hemócitos, células fagocíticas presentes na hemolinfa, que apresentam receptores capazes de se ligar a moléculas bacterianas classificadas como PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos) (Urbanaski *et al.*, 2018). *T. molitor* apresenta também peptídeos antimicrobianos (AMPs). Dentre os quais podemos citar a Tenecina 1, efetiva no controle de bactérias Gram-positivas (Dorling *et al.*, 2015). Assim sendo, é razoável propor, ainda que sem evidências diretas, que além da ação bactericida do extrato, pode também ter ocorrido ativação do sistema imune das larvas. Reforçam nossas proposições os dados descritos por Dorling *et al.*, 2015, ao descreverem que os ácidos teicóicos presentes na parede celular de *S. aureus*, podem restringir o acesso dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes nas células de *T. molitor*. Essa ação é potenciada quando o aminoácido D-alanina é agregado às subunidades dos ácidos teicóicos. Indicando que esses fatores são importantes no controle da infecção de *S. aureus* em *T. molitor*.

Sugere-se que a ação do EAO na infecção letal das larvas de *T. molitor* esteja relacionada a ação antibacteriana do extrato e aos efeitos na ativação de mecanismos de

neutralização de infecção presentes nas larvas, resultando em maior lise bacteriana (Eumkeb *et al.*, 2013; Rahimifard *et al.*, 2017). Entretanto, até o presente momento só temos dados relativos à ação do extrato sobre as bactérias, permanece como desafio a investigação dos efeitos do extrato no sistema imune das larvas.

Apesar das larvas de *T. molitor* serem amplamente utilizadas como modelo de infecção nos estudos de bioprospecção de produtos naturais (Mcgonigle *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2018; Oliveira, 2022), não foram encontradas publicações que relatassem a avaliação do potencial antibiótico do EAO na infecção letal por *S. aureus* em *T. molitor*.

O resultado do ensaio de infecção *in vivo* além pioneiro é extremamente relevante, dada a associação de *S. aureus*, com uma variedade de infecções locais e sistêmicas. Ademais, reafirma a importância da espécie vegetal *Anacardium occidentale* como uma fonte rica de compostos bioativos, que podem ser utilizados isoladamente no desenvolvimento de novos fitoterápicos ou como coadjuvante terapêutico (Silva, 2015; Silva *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021; Santos, 2021; Oliveira, 2022).

7. CONCLUSÕES

O extrato etanólico das flores de *A. occidentale* apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, MRSA, *E. faecalis* e *E. coli*. Adicionalmente, o tratamento com o extrato inibiu tanto a adesão como o biofilme de *S. aureus*, MRSA e *E. coli*, o que deve ter contribuído para prolongar a sobrevivência e aumentar a expectativa de vida das larvas de *T. molitor* letalmente infectadas por *S. aureus*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O extrato etanólico das flores de *A. occidentale* exibiu atividade antimicrobiana e antivirulência promissora *in vitro*. Ademais apresentou baixa toxicidade *in vivo* e foi capaz de prolongar a sobrevivência de larvas infectadas letalmente por *S. aureus*, pelo menos nas doses testadas na pesquisa. Os resultados, em conjunto, trazem novos questionamentos como se: o extrato bruto seria capaz de controlar processos infecciosos *in vivo* em modelo vertebrado em infecção letal ocasionada por *S. aureus*. Essa proposição será investigada em testes futuros, assim como também será avaliada a atividade sinérgica entre o extrato e a ciprofloxacina e as suas principais ações no sistema imune das larvas de *T. molitor* e de camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajileye, O. O.; Obuotor, E. M.; Akinkunmi, E. O.; Aderogba, M. A. Isolation and characterization of antioxidante and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. v.27, n. 3, p. 244-252, 2015.
- Alexandre, F. O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): do símbolo da cultura nordestina à árvore testemunha da mundialização da economia e dos modos de vida. Revista Instituto Arqueológico, Histórico, Geográfico Pernambucano, v. 2013, p. 13-42, 2015.
- Algaffar, S. O. A., Verbon, A., Khalid, S. A., Van De Sande, W. W. Development and validation of a resazurin assay for *in vitro* susceptibility testing of *Actinomyces madurae* a common causative agent of actinomycetoma. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.78, n.1, p. 155-160, 2023.
- Almeida, M.R.; Martinez, S. T.; Pinto, A. C. Química de produtos naturais: Plantas que testemunham histórias. Revista Virtual de Química, v.9, n.3, p.1117-1153, 2017.
- Alvarenga, C. F., Lima. K. M.N., Mollica, L. R., Azevedo, L. O., Carvalho, C. Uso de plantas medicinais para o tratamento do diabetes mellitus no vale do paraíba -SP. Revista Ciências da Saúde. v.2, n.2, p.36-44, 2017.
- Andrade, M. M.; Luiz, W. B.; Souza, R, S, O.; Amorim, J. H. The history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. v.2020, p.1-18, 2020.
- Anjum, M.M.; Patel, K. K.; Dehari, D.; Pandey, N.; Tilak, R.; Agrawal, A. K.; Singh, S. Anacardic acid encapsulated solid lipid nanoparticles for *Staphylococcus aureus* biofilm therapy: chitosan and DNase coating improves antimicrobial activity. Drug Delivery and Translation Research. v.11, p.305-317, 2020.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. p.1-75, 2023.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Pan-Serviços de Saúde- Plano nacional para prevenção e controle de resistência aos antimicrobianos em serviços de saúde 2023-2027. Dezembro 2023.
- Araújo, J. S. C.; Castilho, A. R. F.; Lira, A. B.; Pereira, A. V.; Azevedo, T. K. B.; Costa, E. M. M. B.; Pereira, M. S. V.; Pessôa, H. L. F; Pereira, J. V. Antibacterial activity against cariogenic bactéria and cytotoxic and genotoxic potencial of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan extracts. Archives of Oral Biology, v. 85, p.113-119, 2017.
- Araújo, J. S. C.; Castilho, A. R. F.; Lira, A. B.; Pereira, A. V.; Azevedo, T. K. B.; Costa, E. M. M. B.; Pereira, M. S. V.; Pessôa, H. L. F; Pereira, J. V. Antibacterial activity against cariogenic bactéria and cytotoxic and genotoxic potencial of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan extracts. Archives of Oral Biology, v. 85, p.113-119, 2017.
- Araújo, S; Sousa, I; Gonçalves, R; França, A; Negreiros, P; Brito, A; Oliveira, A; Lima, E. Aplicações farmacológicas e tecnológicas da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.- um produto obtido da flora brasileira. Revista GEINTEC, v.18, n.1, p. 4292-43045, 2018.

Askarian, F.; Wagner, T.; Johannessen, M.; Nizert, V. *Staphylococcus aureus* modulation of innate immune responses through Toll-like (TLR), (NOD)-like and C-type lectin (CLR) receptors. *FEMS Microbiology Reviews*. v.42, n. 5, p.656-671, 2018.

Azevedo, S. S.; Mesquita, G. P.; Mendes, Y. C.; Costa, G. D. E.; Silva, L. C. N.; Zagmignan, A. Avaliação da atividade antioxidante de chás comercializados em feiras livres e de chás industrializados em São Luís- MA, Brasil. *Research Society and Development*, v.9; n.8, p.1-17, 2020.

Barbosa, A. S., Leal, E. L. V., Martins, I. M., Stefanello, S. T., Dobrachinski, L. Uso de plantas medicinais nativas do cerrado pela população idosa da região oeste do estado da Bahia: Um estudo etnofarmacológico. *Acervo Saúde*. v.23, n. 4, p.1-14, 2013.

Bohrz, D. A. S.; Webber, B.; Pereira, A. S.; Pilotto, F.; Santos, L. R.; Rodrigues, L. B. Biofilm forming antimicrobial-multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Veterinaria Brasilica*. v.15, n.1, p.46-53, 2021.

Borges, I. G.; Cavalcante, J. T.; De Araújo, T. C.; De Sousa, F. O. Bactericidal and antibiofilm activity of anacardic acid loaded-sein nanoparticles against *Enterococcus faecalis* *ex vivo*. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*. v.17, n. 7, p.2918-2925, 2020.

Braga, L. L. V. M.; Simão, G.; Schiebel, C. S.; Oliveira, Y. F.; Rosa, L. B.; Gois, M. B.; Fernandes, E. S.; Maria-Ferreira, D. *Tenebrio molitor* as a new alternative model for the investigation of chemotherapy-induced intestinal toxicity. *Pharmacological Research-Reports*. v.2, p.1-14, 2024.

Brai, A., Poggialini, F., Vagaggini, C., Pasqualini, C., Simoni, S., Francardi, V., Dreassi, E. *Tenebrio molitor* as a simple and cheap preclinical pharmacokinetic and toxicity model. *International Journal of Molecular Sciences*. v.24, n.3, p. 1-11, 2023.

Cangui-Pachi, S. P.; Ñacato-Toapanta, A. L.; Enríquez-Martinez, L. J.; Reyes, J.; Garzon-Chavez, A. Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review. *Current Research Microbial Sciences*. v.3, p. 1-12, 2022.

Cedillo-Cortezano, M.; Martinez-Cuevas, L. R.; López, J. A. M.; Barrera López, I. L.; Escutia-Perez, S.; Petricevich, V. L. Use of Medicinal Plants in the Process of Wound Healing: A Literature Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. v.17, n.3, p.1-27, 2024.

Chand, U.; Priyambada, P.; Kushawaha, P. K. *Staphylococcus aureus* vaccine strategy: Promise and challenges. *Microbiological Research*. v.271, p. 1-22, 2023.

Chaves, I. L. S.; Gonçalves, F. G.; Brito, A. S.; Paes, R. C. C.; Lopez, Y, M. Dambroz, G. B. V.; Neto, H. F. Taninos vegetais: qualidade e rendimento são influenciados pelo ambiente? *Sistemas integrados de produção; pesquisa e desenvolvimento de tecnologias*. v.1, p. 33-52, 2021.

Chen, X.; Scheneewind, O.; Missiaks, D. Engineered human antibodies for the opsonization and killing of *Staphylococcus aureus*. *Journal PNAS*. v.119, n.4, p. 1-10, 2021.

Coelho, T. L. F.; Jericó, R. C.; Pereira, T. J.; Silva, C. F.; Naue, C. R. Perfil bacteriano das infecções hospitalares de pacientes cirúrgicos em um hospital terciário. *HURevista*. v.4, n.33652, p. 47:1-7, 2021.

Costa, A.L.P.; Neto, O. A. R.; Souza, A. C. F. Modelagem matemática de infecções bacterianas causadas por patógenos resistentes: uma revisão sistemática da dinâmica de transmissão e seus determinantes em populações humanas. *Revista Artigos Científicos (IMMES)*, v.3, n.1, p.35-44, 2020.

Costa, A.R.; Almeida-Bezerra, J. W.; Silva, T. G.; Pereira, P.S.; Borba, A. L.; Barros, L. M. Phytochemical profile and anti- *Candida* and cytotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.37, n. 102192, p. 1- 13, 2021

Cunha, A. B; David, J. M. Chemical composition, biological activities and use *Anacardiaceae* species: An updated review. *Química Nova*. v.47, n.2, p.1-21, 2024.

Cushnie, T. P. T.; Cushine, B.; Echeverría, J.; Fowsanter, W.; Thammawat, S.; Dodgson, J. L. A.; Law, S.; Clow, S. M. Bioprospecting for Antibacterial Drugs: a Multidisciplinary Perspective on Natural Product Source Material, Bioassay Selection and Avoidable Pitfalls. *Pharmaceutical Research*. v.37, n.125, p.1-24, 2020.

Cussolim, P.A.; Júnior, A.S.; Melo, A.L.; Melo, A. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. *Revista Faculdade do Saber*, v.6, n.12, p.831-843, 2021.

Dadgostar, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and Drug Resistance*. v.12, p.3903-3910, 2019.

Deusenbery, C.; Wang, Y.; Shukla, A. Recent innovations in bacterial infection detection and treatment. *ACS Infectious Diseases*. v.7, p.695-720, 2021.

Díaz, J. A. G.; Maldonado, M. R.; Padilla, D. E. V.; Díaz, R. M.; Palomares, I. R. M. Bacterial resistance: organisms of the ESKAPE group. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. v.41, n.3, p.111-117, 2021.

Dong, P., Wang, L., Qiu, D., Liang, W.; Cheng, J.; Wang, H.; Guo, F.; Chen Y. Evaluation of the environmental factors influencing the quality of *Astragalus membranaceus mongholicus* based on HPLC and the Maxent model. *BMC Plant Biology*, v. 24, p.697, 2024.

Dorling, J.; Moraes, C.; Rolff, J. Recognitin, and persistence of *Staphylococcus aureus* in the model host *Tenebrio molitor*. *Developmental e Comparative Immunology*, v.48, p.284-290, 2015.

El-Tarabily, K. A.; El-Saadony, M.; Alagawany, M.; Arif, M.; Batilha, G.; Khafaga, A. F.; Elwan, H. A. M.; Elners, S. S.; El-Hack, M. E. A. Using essetial oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*. n.28, p.5145-5156, 2021.

Errico, S.; Spagnoletta, A.; Verardi, A.; Moliterni, S.; Dimatteo, S.; Sangiorgio, P. *Tenebrio molitor* as a source of interesting natural compunds their recovery process, biological effects, and safety aspects. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, v.21, p. 148-197, 2021.

Eumkeb. G, Chukrathok, S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine*, v.20, n.3-4, p.262-269.

Farias, J. C.; Mayo, S. J.; Vieira, I. R.; Andrade, I. M. Using morphometrics to distinguish the restinga and cerrado ecotypes of wild *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae): a

preliminary study in northeastern Brazil. *Plants Systematics and Evolution*. v.310, n.3, p.1-23, 2024.

Filho, C. M. B.; Da Silva, L. C. N.; Da Silva, M. V.; Lebner-Olesen, A.; Struve, C.; Krogfelt, K. A.; Correia, M. T. S.; Oliva, M. L. V. Antimicrobial and Antivirulence

Freire, J. C. P.; Junior, J. K. O.; Santiago, C. P. L.; Freire, S. C. P.; Lima, E. O. Estudo etnobotânico do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): uma árvore natural do Brasil. *Revista UNINGÁ Review*. v.29, n.3, p.123-126, 2017.

Freitas, M.A., da Cruz, R.P., Dos Santos, A.T.L., Almeida-Bezerra, J.W., Machado, A.J.T., Dos Santos, J.F.S., Rocha, J.E., Boligon, A.A., Bezerra, C.F., de Freitas, T.S. HPLC–DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). *3 Biotech*. v.12, n.61, p.1–15, 2022.

Furtado, M. A. M.; Alves, F. C. S.; Martins, J. L.; Vaconcelos, M. A.; Ramos, V. S. C.; Sousa, G. S.; Silva, A. L. C.; Farias, W. R. L.; Teixeira, E. H.; Cavada, B. S.; Santos, R. P. Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *Revista Brasileira de Biociências*. v.2, n.1, p.9-13, 2014.

Gong, Z.; Zhang, J.; Zhang, S.; Cao, J.; Fu, Y.; Hu, X.; Zhao, J.; Gu, B.; Li, Q.; Zhang, K.; Ren, P.; Liu, B.; Mao, W. TLR2, TLR4, and NLRP3 mediated the balance between host immune-driven resistance and tolerance in *Staphylococcus aureus* infected mice. *Microbial Pathogenesis*. v.169, n.15656, p.1-25, 2022.

Gutiérrez-Paz, C.; Rodríguez-Moreno, M. C.; Hernández-Gómez M. S.; Trujillo, J. P. F. The CashewPseudofruit (*Anacardium occidentale*): Composition, Processing Effects on Bioactive Compounds and Potential Benefits for Human Health. *Foods*. v.13, n.2357, p.1-19, 2024.

Hadidi, M.; Liñán-Atero, R.; Tarahi, M.; Christodoulou, M. C.; Aghababaei, F. The Potential Health Benefits of Gallic Acid: Therapeutic and Food Applications. v.13, n.8, p.1-59, 2024.

Heim, C. E.; Vidlak, D.; Scherr, T. D.; Kozel, J. A.; Holzapfel, M.; Muirhead, D. E.; Kielian, T. Myeloid-Derived Suppressor contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *Journal of Immunology*. v.192, n.8, p.3778-3792, 2014

Hillyer, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental e Comparative Immunology*, v.58, p.102-118, 2016.

Hooda, H.; Singh, P.; Bajpai, S. Effect of quercetin impregnated silver nanoparticle on growth of some clinical pathogens. *Materials Today: Proceedings*. v.31, n.4, p.625-630, 2020.

Hou, L.; Ye, M.; Wang, X.; Zhu, Y.; Sun, X.; Gu, R.; Chen, L.; Fang, B. Synergism with Shikimic Acid Restores β -Lactam Antibiotic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. v.29, n.7, p. 1-15, 2024.

Howden, B. p.; Giulieri, S. G.; Lung, T. W. F.; Baines, S. L.; Sharkey, L. K.; Lee, J. Y. H.; Hachani, A.; Monk, I. R.; Stinear, T. P. *Staphococcus aureus* host interactions and adaptation. *Natural Reviews Microbiology*. v.21, p.380-395, 2023.

Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. v.51, p. 72-80, 2019.

IACG (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance). Não há tempo a perder: acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos. Relatório para o Secretário das Nações Unidas. Abril 2019.

Idress, M.; Sawant, S.; Karodia, N.; Rahman, A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *Internacional Journal of environmental research and public health*. v.18, n.14, p.1-20, 2021.

Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M. A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the chinise medical associations*. v.81, n.1, p.7-18, 2018.

Janela, B.; Patel, A. A.; Lau, M. C.; Goh, C. C.; Msallam, R.; Kong, W. T.; Fehlings, M., Hubert, S.; Lum, J.; Simoni, Y.; Malleret, B.; Zolezzi, F.; Chen, J.; Poidinger, M.; Satpathy, A. T.; Briseno, C.; Wohn, C.; Malissen, B.; Murphy, K. M.; Maini, A. A.; Vanhoutte, L.; Williams, M.; Vial, E.; Hennequin, L.; Newell, E.; Ng, L. G.; Musette, P.; Yona, S.; Hacini-Rachinel, F.; Ginhoux, F. A subset of type I conventional dendritic cells controls cutaneous bacterial infections through VEGF α -mediated recruitment of neutrophils. *Immunity*. v.50, n.4, .1069-1083, 2019.

Junior, F. P. A.; Alves, T. W. B.; Lima, B. T. M. L.; Nn, T. P.; Medeiros, F. D. *Anacardium occidentale* (CAJUEIRO) e seu potencial antimicrobiano: uma revisão. *Editora Realize*. v.29, n.3, p.2178-2571, 2016.

Karnwal, A.; Kumar, G.; Pant, G.; Hossain, K.; Ahmad, A.; Alshammari, M. B. Perspectives on usage of functional nanomaterials in antimicrobial therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *ACS Omega*. v.8, n.15, p. 13492-13508, 2023.

Kobayashi, S. D.; Malachowa, N.; DeLeo, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *The American Journal of Pathology*. v.8, n.6, p.1518-1527, 2015.

Kosmeri, C.; Giapros, V.; Serbis, A.; Balomenou, F.; Baltogianni, M. Antibiofilm strategies in neonatal and pediatric infections. *Antibiotics*. v.13, n.6, p.1-13, 2024.

Kováč, J.; Slobodníková, L.; Trajčiková, E.; Rendeková, K.; Mučaji, P.; Sychrová, A.; Fialová, S. B. Therapeutic Potential of Flavonoids and Tannins in Management of Oral Infectious Diseases—A Review. *Molecules*. v.28, n.1, p.1-21, 2022.

Kretschmer, D.; Breitmeyer, R.; Gekeler, C.; Lebtig, M.; Schlatterer, K.; Nega, M.; Stahl, M.; Stapels, D.; Rooijackers, S.; Peschel, A. *Staphylococcus aureus* depends on Eap proteins for preventing degradation of its phenol-soluble modulins by neutrophil serine proteases. *Frontiers in Immunology*. v.12, p.1-14, 2021.

Lavine, D.; Strand, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. v.32, n.10, p.1295-1309, 2002.

Li, G.; Lai, Z.; Shan, A. Advances of antimicrobial peptide-based biomaterials for the treatment of bacterial infections. *Advanced Science*. v.10, n.11, p. 1-23, 2023.

Li, K.; Xing, S.; Wang, M.; Peng, Y.; Dong, Y.; Li, X. Anticomplement and antimicrobial activities of flavonoids from *Entada phaseoloides*. *Natural Product Communications*. v.7, n.7, p.867-871, 2012.

Li, Y., Xia, X., Hou, W., Lv, H., Liu, J., & Li, X. How Effective are Metal Nanotherapeutic Platforms Against Bacterial Infections? A Comprehensive Review of Literature. *International Journal of Nanomedicine*. v.18, p.1109–1128, 2023.

- Lima, R. A.; Souza, S. L. X.; Lima, L. A.; Batista, A. L. X.; Araújo, J. T. C.; Sousa, F. F. O.; Rolim, P. M. L.; Gomes, J. P. Antimicrobial effect of anacardic acid-loaded sein nanoparticles loaded on *Streptococcus mutans* biofilm. Brazilian journal of microbiology. v.51, n.4, p.1623-1630, 2020.
- Liu, Q.; Mazhar, M.; Miller, L. S. Immune and inflammatory responses to *Staphylococcus aureus*. Current Dermatology Reports. v.7, p. 338-349, 2018.
- Lopes, A. C. C. B.; Nascimento, J. R.; Camara, M. B. P.; Lima, A. S.; Lopes, G. L. N.; Do Nascimento, M. O.; Xavier, J. K. A. M.; Jesus, C. M.; Mendonça, C. J. S.; Carvalho, A. L. M.; Silva, L. A.; Rocha, C. Q. Chemical characterization Leishmanicidal activity and *in vitro* cytotoxicity of the essential oil extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. microemulsion systems. Pharmaceutics, v.16, n. 1. p.1-14, 2024.
- Maganda, J. B.; Sani, J.; Jabaka, D.R.; Ukatu, V. E. Antibacterial effects of *Piliostigma thonningii* and *Anacardium occidentale* against some foods spoilage pathogens. Journal of Nutrition and Food Science. v. 3, n.3, p.234-241, 2024.
- McGonigle, J. E.; Purves, J.; Rolff, J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. Developmental, Comparative Immunology. v.16, p.1-17, 2016.
- Menezes, C. W.; Camilo, S. S.; Fonseca, A. J.; Junior, S. L. A. J.; Bispo, D. F.; Soares, M. A. A dieta alimentar da presa *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pode afetar o desenvolvimento do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Arquivo Instituto Biológico. v.81, n.3, p.250-256, 2014.
- Mesquita, U. O., Tavares-Mesquita, A. C. C., Etnobotanica de plantas medicinales em la comunidade de Caruarú, Isla del Mosqueiro, Belém- Pará. Boletín Latino-americano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. v.17, n.2, p.130-159, 2018.
- Milanovic, V. Cardinali, F.; Bellegia, L.; Garofalo, C.; Pasquini, M.; Tavoletti, S.; Riolo, P.; Ruschioni, A.; Isidoro, N.; Osimani, A.; Aquilanti, L. Exploitation of *Tenebrio molitor* larvae as biological factories for human probiotics, na exploratory study. Journal of Functional Foods. v.82, p.1-9, 2021.
- Miller, L. S.; Fowler, V. G.; Shukla, S. K.; Rose, W. E.; Proctor, R. A. Development of vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. FEMS Microbiology Reviews. v.44, n.1, p. 123-153, 2020.
- Miller, L.; Cho, J. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. Nature Reviews Immunology. v.11, p. 505-518, 2011.
- Miller, W. R.; Arias, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. Nature Reviews Microbiology. v.22, p.598-616, 2024.
- Mirzaei, R.; Goodrzi, P.; Asadi, M.; Soltani, A.; Aljanabi, H. A. A.; Jeda, A. S.; Dashtbin, S.; Jalalifar, S.; Mohammadzadeh, R.; Teimoori, A.; Tari, K.; Salari, M.; Ghiasvand, S.; Kazemi, S.; Youselfimashouf, R.; Keyvani, H.; Karampoor, S. Bacterial co-infections with SARS-Cov-2. Critical Review. v.72, p.2097-2111, 2020.
- Mishra, A.; Aggarwal, A.; Khan, F. Medical device-associated infections caused by biofilm-forming microbial pathogens and controlling strategies. Antibiotics, v.13, n.7, p.1-16, 2024.

Mohammadi Bazargani M, Falahati-Anbaran M, Rohloff J. Comparative analyses of phytochemical variation within and between congeneric species of willow herb, *Epilobium hirsutum* and *E. parviflorum*: Contribution of environmental factors. *Frontiers Plant Science*. v. 11:595190, 2021.

Monteiro-Neto, V., De Sousa, C. D., Gonzaga, L. F., Silveira, B. C., Souza, N. C. F., Pontes, J. P., Santos, D. M., Martins, W. C., Pessoa, J. F. V., Junior, A. R. C., Almeida, V. S. S., Oliveira, N. M. T., Araújo, T. S., Maria-Ferreira, D., Mendes, S. J. F., Ferro, T. A. F., Fernandes, E. S. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Plos One*. May 14, 2020.

Morris, S., Cerceo, E. Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. *Antibiotics*. v.9, n.196, p.1-20, 2020.

Morrison, L.; Zembower, T. R. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am*. v.30, p.619-635, 2020.

Mota, L. A., Pereira, D. T. M., Assis, M. E. S., Marques, S. B., Silva, B. B., Etnofarmacologia de plantas medicinais utilizadas pela população rural e ribeirinha do município de Itacoatira – AM. *Research, Society and Development*, v.11, n.5, p.1-9, 2022.

Moura, D. F.; Melo, M. A.; Barros, D. M.; Rocha, T. A.; Silva, F. A.; Silva, G. M.; Oliveira, G. B.; Medeiros, S. M. F. R. S.; Cavalcanti, I. D. L.; Macêdo, D. C. S.; Soares, J. C. S.; Nunes, J. S.; Siqueira, T. T. A.; Leite, A. R. F.; Costa, M. P. C.; Diniz, M. A.; Costa, M. P.; Santos, J. M. S.; Fonte, R. A. B. The importance of biosafety in the production and use of natural and herbal products. *Brazilian Journal of Development*. v.6, n.2, p.7054-7062, 2020.

Movahedi, A.; Yaghuti, A. A. Z.; Wei, H.; Rutland, P.; Sun, Weibo, S.; Mousavi, M.; Li, D.; Zhuge, Q. Plant secondary metabolites with a overview of *Populus*. *Molecular. Internacional Journal of Molecular Sciences*. v.22, n.6890, p.1-14, 2021.

Mumcuoğlu, İ.; Çağlar, H.; Erdem, D.; Aypak, A.; Gün, P.; Kurşun, Şenol.; Çakır, E. Y.; Aydoğan, S.; Kırca, F.; Dinç, B. Secondary bacterial infections of the respiratory tract in COVID-19 patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*. v.16, p.1131–1137, 2022.

Murray, C. J. L.; Ikuta, K. S. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet Journal*. v.399, n.10325, p.629-655, 2022.

Nazir, A.; Song, J.; Chen, Y.; Liu, Y. Phage-Derived Depolymerase: Its possible role for secondary bacterial infections in COVID-19 patients. *Microorganisms*. v.11, n.2, p.1-13, 2023.

Neiva, V. A., Ribeiro, M. N. S., Nascimento, F. R. F., Cartágenes, M. S., Coutinho-Moraes, D. F., Do Amaral, F. M. M. Plants species used in giardiasis treatment: etnopharmacology and *in vitro* evaluation of anti-Giardia activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.24, p. 215-224, 2014.

Nguyen, T. L. A.; Bhattacharya, D. Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. *Molecules*. v.27, n.2494, p.1-13, 2022.

Nisa, K.; Hasanah, A. U.; Damayanti, E.; Frediansyah, A.; Anwar, M.; Khumaira, A.; Anindita, N. S. In vitro antibacterial activity and phytochemical profiling of Indonesian

Anacardium occidentale L. leaf extract and fractions. Journal of Pharmacy e Pharmacognosy Research. v.12, n.1, p.50-72, 2024.

Oliveira A. S., Nascimento J. R., Trovão L. O., Alves P. C. S., Maciel M. C. G., Silva L. D. M., Marques A. A., Santos A. P. S. A., Silva L. A., Nascimento F. R. F., & Guerra R. N. M. The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis, Journal of Ethnopharmacology. v. 236, p.345-353, 2019.

Oliveira, A. S. Atividade antifúngica de *Anacardium occidentale* L. na infecção letal por *Candida* spp. 2022. 104f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão.

Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. B.; Paterson, D. L.; Walker, M. J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clinical Microbiology Reviews. v.33, n.3, p.1-49, 2020.

Oliveira, R. D.; Bustamante, P. F. O.; Besen, B. A. M. P. Tackling healthcare-associated infections in Brazilian intensive care units: we need more than collaboration. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. v.34, n.3, p.313-315, 2012.

Oliveira, V. F.; Saenz, C. C. B. Inhibitory factors of *Quorum sensing* and its relationship with biofilm. Atas de Ciências da Saúde. v.11, p. 6-14, 2023

Organização Mundial da Saúde. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) Report 2022. P.1-82, 2022.

Peng, Q.; Tang, X.; Dong, W.; Sun, N.; Yuan, W. A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism. Antibiotics. v.12, n.1. p.1-21,2023.

Pereira, A. V.; Azevedo, T. K. B.; Higino, S. S.; Santana, G. M.; Trevisa, L. F. A.; Azevedo, S. S.; Pereira, M. V.; Paula, A. F. R. Taninos da casca do cajueiro: atividade antimicrobiana. Revista Agropecuária Técnica. v.36, n. 1, p.121-127, 2015.

Rahamouz-Haghighi, S.; Asadi, M. H.; Baghizadeh, A. Antiproliferative and Antibacterial Properties of Pethanolic Extract and Essential Oil of *Trachyspermum ammi* and *Foeniculum vulgare* Seeds on Gastric Cancer, *Artemia salina* Larvae and Pathogenic bacteria. EthoPharm Products. v.2, n.2, p.42-50, 2021.

Rahimifard, M.; Moini-Nodeh, S.; Niaz, K.; Baeeri, M.; Jamalifar, H.; Abdollahi, M. Improvement of the functionality of pancreatic Langerhans islets via reduction of bacterial contamination and apoptosis using phenolic compounds. Iran J Basic Med Sci. v.21, n.9, p.920-927,2018.

Ribeiro, A. D.; Junior, E. C. F.; Junior, J. G. R.; Costa, B. P. Freire, J. C. P.; Melo, W. O. S.; Pereira, J. V. Antimicrobial potential of *Anacardium occidentale* Lin. against oral pathogens. Research, Society and Development. v.9, n.8, p.1-21, 2017.

Ribeiro, E. A.; Torres, G. C.; Rodrigues, G. F.; Alves, J. A. G. Infecções secundárias causadas por bactérias do grupo ESKAPE e impacto a saúde de pacientes com complicações de COVID-19. Research, Society and Development. v.11, n.15,1-12, 2022.

Rowe, W. J.; Lebman, D. A.; Ohman, D. E. Mechanism of resistance to phagocytosis and pulmonary persistence in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. p.1-13, 2023.

Roy, R.; Tiwari, M.; Donelli, G.; Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, v.9; n.1, p. 522-554, 2018.

Salehi, B.; Gültekin-Özgüven, M.; Kirkin, C.; Özçelik, B.; Morais-Braga, M. F. B.; Carneiro, J. N. P.; Bezerra, C. F.; Silva, T. G.; Coutinho, H. D. M. C.; Amina, B.; Armstrong, L.; Selamoglu, Z.; Sevindik, M.; Yousaf, Z.; Sharifi-Rad, J.; Muddathir, A. M.; Devkota, H. P.; Martorell, M.; Jugran, A. K.; Martins, N.; Cho, W. C. *Anacardium occidentale*: Chemical, nutritional composition and biotechnological applications. *Journal of Biomolecules*, v.9, n.9, p.1-34, 2019.

Sang, H.; Jin, H.; Song, P.; Xu, W.; Wang, F. Gallic acid exerts antibiofilm activity by inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adhesion. v.14, n.17220, n. 1-11, 2024.

Santos, P. G. Efeito Antimicrobiano De Compostos Químicos Derivados Das Flores De *Anacardium occidentale* L. (Monografia) São Luís – Universidade Federal do Maranhão.64 f, 2021.

Sarjit, A.; Wang, Y.; Dykes, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiology*. v.46, p.227-233, 2015.

Sartori, M. R. K. Atividade antimicrobiana das flores de extratos puros de *Acmela brasilienses* Spreng. *Pharmazie*. v.58, n.8, p.567-569, 2005.

Sartori, M. R., Pretto, J. B., Cruz, A. B., Bresciani, L. F., Yunes, R. A., Sortino, M., Zacchino, S. A., Cechinel, V. F. (2003). Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Die Pharmazie*, 58(8), 567–569.

Sastalla, I.; Monack, D. M; Kubatzky, K. F. Editorial: Bacterial Exotoxins: How Bacteria Fight the Immune System. *Frontiers in Immunology*, v.7, n.300, p. 1-3, 2016.

Sauer, K.; Stoodley, P.; Goeres, D. M.; Hall-Stoodley, L.; Burmolle, M.; Stewart, P. S.; Bjarnsholt, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. v.20, p.608-620, 2022.

Sharma, A. K.; Dhasmana, N.; Dubey, N.; Kumar, N.; Gangwal, A.; Gupta, M.; Singh, Y. Bacterial virulence factors: secreted for survival. *Indian Journal Microbiology*. v.57, n.1, p.1-10, 2017.

Siddiqui, Z.N., Farooq, F., Musthafa, T.N.M., Ahmad, A., Khan, A.U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* v.17, 237–243, 2013.

Silva R. A.; Liberio, S.; Amaral, F. M. M.; Nascimento, F.; Torres, L.; Monteiro-Neto, V.; Guerra, R. N. Antimicrobial and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* L. flowers in comparison bark and leaves extracts. *Journal of Biosciences and Medicines*, v.4, n.4, p.87-99, 2016.

Silva, A. F.; Farias, J. R.; Franco, D. C. G.; Galiza, A. A.; Motta, E. P.; Oliveira, S. O.; Vasconcelos, C. C.; Cartágenes, M. S. S.; Da Rocha, C. Q.; Da Silva, M. C. P.; Lopes, A. J. O.; Do Nascimento, F. R. F.; Monteiro, C. A.; Guerra, R. N. M. Anti-*Candida albicans* activity of ononin and other secondary metabolites from *Platonia insignis* MART. v.12, n.1014, p. 1-20, 2022.

Silva, E. A. B., Da Conceição, M. D. S., Gois, M. A. F., Lucas, F. C. A. Plantas medicinais, usos e memória na Aldeia do Cajueiro, Pará. Gaia Scientia. v.14, n.3, p. 31-50, 2020.

Silva, L. A. C. Bioprospecção de *Anacardium occidentale* como produto anti-*Leishmania* e cicatrizante. 2016. 122f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão.

Silva, S. M.; Silva, F. H. S.; Sá, R. A. Q. C.; Barbosa, A. V.; Lima, A. V. A.; Perez, A. M. C. Virulence factors of human pathogens; an always-needed approach. Brazilian Journal of Health Review. v.5, n.1, p. 2900-2922, 2022.

Silva, T. A. *Anacardium occidentale* L. ação sobre a inibição enzimática, glicemia e produção de insulina na diabetes. 2015. 98f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão.

Silva, T. F., Filho, J. R. N. C., Fonseca, M. M. L. B., Dos Santos, N. M., Da Silva, A. C. B., Zagmignan, A., Abreu, A. G., Da Silva, A. P. S., Lima, V. L. M., Da Silva, N. H., Dutra, L. M., Almeida, J. R. G. S., Da Silva, M. V., Correia, M. T. S., Da Silva, L. C. N. Products derived from *Buchenavia tetraphylla* leaves have *in vitro* antioxidant activity and protect *Tenebrio molitor* larvae against *Escherichia coli*-induced injury. Pharmaceuticals. v.13, n. 3, p. 1-17, 2020.

Silva, N. F., Silva, E. R. A., Silva, G. N. B., Silva, M. E. B., Espindola, M. T. A., Correia, S. D. O. S., Falcão, R. E. A., Castanha, E. R. Estudo etnofarmacológico e propriedade antifúngica de duas espécies medicinais: *Anacardium occidentale* (Linn) (Cajueiro, Anacardiaceae) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira, Anacardiaceae). Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.1, p.9791-9806, 2021.

Soares-Pereira, J.; DoVale, J. C.; Pinheiro-Machado, I.; Silva-Melo, J. W.; Vidal-Neto F. C.; Silva-Melo, D.; Barros, L. M. Flowering time and harvest on floral morphology and production of hermaphrodite flowers in the cashew tree *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae). Revista de biologia tropical. v.71, n.1, p.1-15, 2023.

Sousa, L. B.; Feitosa, L. L.; Gomes, R. L. F.; Lopes, A. C. A. L.; Soares, E. B.; Silva, E. M. P. Aspectos biológicos floral do cajueiro anão precoce e comum. Ciência Rural. v.37, n.3, p.882-885, 2007.

Souza, C.M.P., Brandão, D. O., Silva, M. S. P., Palmeira, A. C., Simões, S. M. O., Madeiros, A. C.D. Utilização de Plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande- Parnaíba. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Campinas, v.15, n.2, p. 188-193, 2013.

Souza, N. O.; Cunha, D. A.; Rodrigues, N. S.; Pereira, A. L.; Medeiros, E. J. T.; Pinheiro, A. A.; Vasconcelos, M. A.; Neto, L. G. N.; Bezerra, T. T.; Teixeira, E. H.; Saboia, V. P. A. Cashew nut shell liquids: Antimicrobial compounds in prevention and control of the oral biofilms. Archives of Oral Biology. v.133, p.1-10, 2022.

Souza, P. C., Morey, A. T., Castanheira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., Furlanetto, M. C., Yamada-Gata, S. F., Costa, I. N., Mora-Montes, H. M., Almeida, R. S. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. Journal of Microbiology Methods. v.118, p.182-186, 2015.

Souza, P. C.; Caloni, C. C.; Wilson, D., Almeida, R. S. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. Journal of Fungi, v.4, n.125, p.1-12, 2018.

Souza, P. C.; Caloni, C. C.; Wilson, D.; Almeida, R. S. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. v.4, n.125, p.1-12, 2018.

Spaan, A. N.; Surewaard, B. G. J.; Nijland, R.; Strijp, J. A. G. V.; Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: A biological tug war. Annual review of microbiology. v.67, p. 629-650, 2013.

Tavares, T. D.; Antunes, J. C.; Padrão, J.; Ribeiro, A. I.; Zille, A.; Amorim, M. T. P.; Ferreira, F.; Felgueiras, H. P. Activity of specialized biomolecules against gram-positive and gram-negative bacteria. Antibiotics. v.9, n.314, 1-16, 2020.

Tejumade, A; O.; Ajayi, T. O.; Adeyemi, A. A.; Elujoba, A. A. Anti-malarial activity of methanol extracts of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) and *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae) Leaves. Afr. J. Biomed. Res. v.26, p.411-416, 2023

Thammavongsa, V.; Kim, H. K.; Missiakas, D.; Schneewind, O. *Staphylococcus* manipulation of host immune responses. Natural Reviews Microbiology. v.13, p.529-543, 2015.

Uebele, J.; Stein, C.; Nguyen, M. T.; Schneider, A.; Kleinert, F.; Tichá, O.; Bierbaum, G.; Gotz, F.; Bekeredjian-Ding, I. Antigen delivery to dendritic cells shapes human CD4+ and CD8+ T cell memory responses to *Staphylococcus aureus*. PLOS Pathogens. v.13, n.5, p.1-23, 2017.

Urban-Chmiel, R.; Marek, A.; Stepień-Pysniak, D.; Wieczorek, K.; Dec, M.; Nowaczek, A.; Osek, Jacek. Antibiotic resistance in bacteria- a review. Antibiotics. v.11, p.1-40, 2022.

Urbanski, A.; Adamski, Z.; Rosiński, G. Mudanças de desenvolvimento na morfologia dos hemócitos em resposta a *Staphylococcus aureus* e esferas de látex no besouro *Tenebrio molitor* L. Micron, v. 104, p.8–20, 2018.

Utay, N. S.; Roque, A.; Timmer, J. K.; Morcock, D. R.; DeLeage, C.; Somasunderam, A.; Weintrob, A. C.; Agan, B. K.; Estes, J. D.; Crum-Cianflone, D. C. MRSA Infections in HIV-Infected People Are Associated with Decreased MRSA-Specific Th1 Immunity. PLOS Pathogens. v.12, n.4, p. 1-15, 2016.

Veloso, D. S.; Campelo, V. Incidência de infecções bacterianas e o perfil antimicrobiano utilizado no tratamento dos pacientes de um hospital de ensino. Revista Interdisciplinar Ciência e Saúde. v.4, n.2, p.19-28, 2017.

Vieira, D. R. P., Amaral, F. M. M., Maciel, M. C. G., Nascimento, F. R. F., Libério, S. A., Rodrigues. Plants species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. Journal of Ethnopharmacology, v.155, n.3, p.1441-1449, 2014.

Vommaro, M. L; Kurtz, J.; Giglio, A. Caracterização Morfológica de Hemócitos no Besouro Mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). Journal Insects. v.12, n.5, p. 1-18, 2021.

Willemsem, A.; Reid, S.; Assefa, Y. A review of national action plans on antimicrobial resistance: strengths and weaknesses. Antimicrobial Resistance and Infection Control. v.11, n.9, p. 1-13, 2022.

Wójcik-Bojek, U.; Różalska, B.; Sadowska, B. *Staphylococcus aureus*—A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development—Do We Still

Have a Chance to Win? Internacional Journal of Molecular Sciences. v.20, n.2, p.1-16, 2022.

Xavier, A. De L., Silva, N. C. De O., Soares, R. R., Abreu, S., De Araújo, E. A., Júnior, J. B. O., Siqueira, A. B. S. Antibacterial activity of the ethanolic extract of Brazilian red propolis against multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-producing bacteria.v.19, n.4, p. 1-12, 2023

Xu, Z.; Li, Y.; Xu, A.; Soteyome, T.; Yuan, L.; Ma, Q.; Senevirathe, G.; Li, X.; Liu, J. Cell-wall-anchored proteins affect invasive host colonization and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research. v.285, p.1-10, 2024.

Xuan, J.; Feng, Weiguo, F.; Wang, J.; Wang, R.; Zhang, B.; Bo, L.; Chen, Zhe-Sheng.; Yang, H.; Sun, L. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. Drug Resistance Updates Journal. v.68, p. 1-12, 2023.

Yamada, K. J.; Heim, C. E.; Xi, X.; Attri, K. S.; Wang, D.; Zhang, W.; Singh, P. K.; Bronich, T. K.; Kielian, T. Monocyte metabolic reprogramming promotes pro-inflammatory activity and *Staphylococcus aureus* biofilm clearance. PLoS Pathogens. v.16, n.3, p.1-34, 2020.

Zeng, Y.; Nikitkova, A.; Abdelsalam, H.; Li, J. Arquivos de Biologia Oral Atividade de Quercetina e Kaemferol contra *Streptococcus Mutans* Bio Fi Lm. Arch. Oral Biol. v. 98, p.9–16, 2019.

Zhanhua, T.; Wang., H.; Ke, K.; Shi, D.; Zhu, L. Flavone inhibits *Staphylococcus aureus* virulence via inhibiting the sae tw component system. Microbial Pathogenesis. v.180, p. 106-128, 2023.

Zhou L, Zhang Y, Ge Y, Zhu X, Pan J. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of *Quorum Sensing*-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. Front Microbiol. n. 11, p.1-13, 2020.

ANEXOS

ANEXO I – Identificação da planta no Herbário do Maranhão



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS



HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

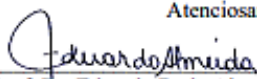
São Luís, 30 de Outubro de 2023.

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

Segue abaixo a confirmação da identificação solicitada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
14.709	SANTOS, P.G. (01)	ANACARDIACEAE	<i>Anacardium occidentale</i> L.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
Curador do Herbário MAR

ANEXO II – Cadastro da planta no SisGen



Ministério do Meio Ambiente CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AAA8E4B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AAA8E4B**
Usuário: **Rosane NM Guerra**
CPF/CNPJ: **756.037.807-20**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Anacardium occidentale occidentale

Título da Atividade: **Avaliação da atividade antimicrobiana, antifúngica e imunológica de Anacardium occidentale**

Equipe

Rosane NM Guerra **INDEPENDENTE**

Data do Cadastro: **23/09/2022 11:39:08**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:44 de 23/09/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**