



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TROPICAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

ADRIANO BARBOSA DA SILVA

**AÇÃO CICATRIZANTE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA A
ESTIRPES DE *Staphylococcus* RESISTENTES DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Psidium guajava***

RECIFE

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TROPICAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

ADRIANO BARBOSA DA SILVA

**AÇÃO CICATRIZANTE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA A
ESTIRPES DE *Staphylococcus* RESISTENTES DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Psidium guajava***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

RECIFE

2016

ADRIANO BARBOSA DA SILVA

**AÇÃO CICATRIZANTE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA A
ESTIRPES DE *Staphylococcus* RESISTENTES DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Psidium guajava***

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como pré-requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal Tropical.**

Aprovado em ____ de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Elineide Barbosa de Souza - UFRPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

"Ao meu pai, Sr. Severino Francisco da Silva, fundamental à minha formação como cidadão, DEDICO este trabalho".

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fazer parte de sua criação e pelo amparo nos momentos mais difíceis quando precisei.

Aos meus pais pela compreensão, afeto e apoio durante estes e todos os anos em que estivemos juntos.

À Prof.^a Rosa Maria Nunes Galdino, pela amizade, apoio, colaboração e ensinamentos responsáveis por minha persistência em alcançar meus objetivos. Sempre serei grato por seus ensinamentos, sua companhia, seu carinho não só comigo, mas com todos que precisam de você. Que Deus continue abençoando sua vida.

À minha querida esposa que em tão pouco tempo tornou-se meu alicerce, meu ponto de refúgio e minha confidente nos momentos tristes e alegres. Te amarei para sempre.

À Prof.^a Dr.^a Elineide Barbosa de Souza, Supervisora da Área de Microbiologia pela confiança, pelas oportunidades, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por ter me recebido de braços abertos sem mesmo conhecer-me bem, por sua fundamental orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao meu parceiro de curso Filipe Cássio, por sua sincera amizade, ajuda nos experimentos e companheirismo durante esses dois anos.

À Doutoranda Laíse Souza, pela amizade e por suas indicações tão preciosas.

À Doutoranda Bárbara Brooklyn, pela amizade e apoio.

À Doutoranda Hilda Santos, pela amizade, incentivo e apoio.

Ao PNPd/UFRPE Franklin Magliano por sua atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Anísio Francisco Soares pela paciência nas resoluções de problemas decorrentes deste projeto.

A todos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Aplicada, monitores, estagiários, professores, técnicos e alunos por fazerem deste laboratório um dos mais acolhedores da UFRPE.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical e a Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A Agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Aos professores, amigos e funcionários de pós-graduação do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio e amizade durante estes anos.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O uso de plantas medicinais é um recurso terapêutico popular difundido pelas gerações ao longo dos tempos de forma empírica. A crescente necessidade de fármacos mais eficientes e com menores efeitos adversos tem levado ao estudo aprofundado desses fitoquímicos por diversos grupos de pesquisa. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as atividades antimicrobiana e cicatrizante do extrato etanólico de *Psidium guajava* L. sobre estirpes de *Staphylococcus*. Foram avaliadas quatro estirpes de *Staphylococcus sciuri* (Ssl, SsII, SsIII e SsIV) e uma de *Staphylococcus xylosus* (Sx), além da cepa controle ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* (Sa) frente ao extrato de *P. guajava* e antibióticos. Para os teste de controle de infecção foram utilizados 20 ratos Wistar todos machos adultos separados em 4 grupos com 5 ratos cada. As folhas do vegetal foram trituradas para obtenção do extrato etanólico e tratamentos de 10, 50, 120, 210, 330, 400, 480, 530, 650 e 900 µL/mL. Sua toxicidade foi avaliada por DL-50. O perfil de resistência e a atividade antimicrobiana foram avaliados pelo método de disco-difusão, sendo o controle de infecção e cicatrização verificado a partir da aplicação subcutânea do extrato e do controle positivo (antibióticos). Apenas os tratamentos de 650 e 900 µL/mL foram considerados tóxicos com valores de DL-50 maiores que 50%. Todas as estirpes se mostraram sensíveis ao extrato com halos de inibição maiores de 20 mm. Foram consideradas como resistentes aos antibióticos oxacilina e penicilina G as estirpes SsII, Sx e SsIV e a avaliação histoquímica demonstrou que nos grupos dos animais que receberam o extrato como tratamento houve reepitelização com fibras colágenas mais densas em comparação aos demais grupos. Com isso verifica-se um grande potencial terapêutico de *P. guajava* como promissor recurso natural para o desenvolvimento de fármacos mais acessíveis às populações e de baixo impacto residual.

Palavra-chave: *Psidium guajava* L., goiaba, *Staphylococcus* ssp, histoquímica.

ABSTRACT

The use of medicinal plants is a human therapeutic resource dated years before the Christian era being the popular knowledge a vehicle for spreading the efficiency of such herbal medicines which will serve technological generations in the development of new low-cost drugs and lower residual impact. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity and healing of *Psidium guajava* on strains of *Staphylococcus*. Four strains of *Staphylococcus sciuri* (Ssl, SsII, SsIII and SsIV), one of *Staphylococcus xylosus* (Sx) as well as the control strain *Staphylococcus aureus* (Sa) were compared to the *P. guajava* extract and antibiotics. For infection control tests 20 Wistar mice were used, all males, separated into 4 groups of 5 mice each. The leaves of the plant were crushed to obtain the extract and 10, 50, 120, 210, 330, 400, 480, 530, 650 and 900 µL/ml treatments. Its toxicity was evaluated by DL-50. The resistance profile and antimicrobial activity were evaluated by the disk-diffusion method, the control of infection and healing were recorded after the subcutaneous application of the extract and the positive control (antibiotic). Only the treatments with 650 and 900 uL/mL were considered toxic with LD-50 values over 50%. All strains were sensitive to the extract with inhibition halos over 20 mm. They were considered to be resistant to oxacillin antibiotics and penicillin G strains SsII, Sx and SsIV and the immuno-histochemistry evaluation showed that in the groups of animals that received the extract as a treatment there was re-epithelialisation with denser collagen fibers as compared to other groups. Thus there is a great therapeutic potential of *P. guajava* as a promising natural resource for the development of more affordable drugs to the population and low residual impact.

Keywords: *Psidium guajava* L., guava, *Staphylococcus* ssp, microbial resistance, healing

SUMÁRIO

Capítulos		Pág.
1	I. INTRODUÇÃO	14
	II. REVISÃO DE LITERATURA	17
	II.I Infecção bacteriana	17
	II.I.I Mecanismos de ação das bactérias	18
	II.II <i>Staphylococcus</i> spp.	20
	II.III Antibióticos β-lactâmicos	22
	II.III.I Penicilinas	23
	II.III.II Cefalosporinas	24
	II.III.III Carbapenêmicos	25
	II.III.IV Monobactâmicos	25
	II.III.IV Mecanismos de ação dos antibióticos β -lactâmicos .	25
	II.IV Resistência estafilocócica aos antibióticos β-lactâmicos	26
	II.IV.I Dados históricos	27
	II.IV.II <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRSA) .	28
	II.V A Pele	29
	II.V.I Epiderme	31
	II.V.II Derme	32

	II.V.III Infecções de pele causadas por <i>Staphylococcus spp.</i>	33
	II.VI Cicatrização	35
	II.VI.I Fases do processo de cicatrização	35
	II.VI.II Coagulação	36
	II.VI.III Inflamação	36
	II.VI.IV Proliferação	37
	II.VI.V Contração da ferida	37
	II.VI.VI Remodelação	38
	II.VI Fitoterápicos e <i>Psidium guajava</i> L.	38
	 III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
2	Ação cicatrizante e controle de infecção de estirpes de <i>Staphylococcus spp.</i> Com perfil de resistência pelo extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	48
	RESUMO	49
	I. Introdução	50
	II. Material e Métodos	52
	III. Resultados e Discussão	57
	V. Referências	74

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	Pag.
Figura 1: <i>Staphylococcus</i> spp. visualizado ao microscópio óptico, caracterização morfotintorial pela técnica de Gram. Fonte: Tortora et al. (2010)	20
Figura 2: Estrutura molecular de um antimicrobiano β -lactâmico. Fonte: Papp-Wallace et al., (2011)	22
Figura 3: A estrutura da pele humana. Fonte: Fonte: Tortora et al. (2010)	30
Figura 4: Epiderme. Camadas e células imunológicas da epiderme humana. Fonte: Dreamstime (2010)	32
Capítulo II	
Figura 1: Coloração de Gram das estirpes SsI (A), SsII (B), SsIII (C), SsIV (D) e Sx (E) de <i>Staphylococcus</i>	58
Figura 2: Relação entre os resultados obtidos para o teste de antibiograma e atividade antimicrobiana da estirpe SxI. ERI – Eritromicina; AMC – Ácido Clavulânico + Amoxicilina; PG – Penicilina G; CIP – Ciprofloxacina; LVX – Levofloxacina; OXA – Oxacilina; CFL – Cefalotina; IPM – Imipenem; NOR – Norofloxacina; GEN – Gentamicina	63
Figura 3: Teste de toxicidade (DL-50) com cistos de <i>Artemia salina</i> (24h)	66
Figura 4: Formação de crosta nos ferimentos dos ratos 1 dos diferentes grupos. a – grupo 1, pós trauma; b – grupo 1, 1º dia; c – grupo 2, 1º dia	68

Figura 5:	Avaliação macroscópica dos ferimentos e processo de cicatrização ao quinto dia de avaliação. a – rato 1 do grupo 1(extrato); b – rato 2 do grupo 2 (antibiótico)	69
Figura 6:	Fragmentos das áreas de cicatrização dos animais dos grupos experimentais. Notar na derme, a presença de fibras colágenas mais espessas em A (Extrato) e B (Antibiótico). Em C (Álcool) e D (Placebo) a derme apresenta-se com grande teor de fibras colágenas delgadas. Notar ainda ausência de epiderme neste último grupo. Epiderme - setas longas; Fibras colágenas espessas - Fcd; Fibras colágenas delgadas; Ausência de epiderme - seta curta. Coloração Tricrômico de Gomori	71
Figura 7:	Quantificação em pixels do teor de colágeno. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos extrato e antibiótico e em relação aos outros. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo II	Pag.
Tabela 1: Antibiograma das estirpes de <i>Staphylococcus</i> (24h). ERI – Eritromicina; AMC – Ácido Clavulânico + Amoxicilina; PG – Penicilina G; CIP – Ciprofloxacina; LVX – Levofloxacina; OXA – Oxacilina; CFL – Cefalotina; IPM – Imipenem; NOR – Norofloxacina; GEN – Gentamicina	59
Tabela 2: Atividade antiestafilocócica do extrato etanólico de <i>Psidium guajava</i> L. (24h)	61

1. INTRODUÇÃO

2

3 Os fitoterápicos representam um grande número de agentes terapêuticos
4 cada vez mais utilizados pela população mundial. Sob esse aspecto é
5 crescente as atividades de pesquisas direcionadas à identificação dos
6 principais constituintes das plantas usadas pela medicina popular, e também,
7 pelos estudos farmacológicos que tentam comprovar as atividades terapêutica
8 e toxicológica desses produtos naturais de origem vegetal (FARIAS, 2003).

9 Um dos aspectos mais importantes no processo de cicatrização pode
10 decorrer justamente da utilização de substâncias farmacológicas que
11 comprovadamente apresentem este potencial, investigado por inúmeras
12 atividades de pesquisas (MARTINS, 2006).

13 Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), apesar do uso de
14 plantas medicinais terem sua origem desde o início das civilizações e um
15 grande aumento de popularidade na última década, sua utilização não foi
16 reconhecida oficialmente por maioria dos países o que, de forma direta, acabou
17 interferindo e gerando consequências negativas quanto à educação,
18 treinamento e pesquisa nesta área, que acabou sem reconhecimento e
19 suporte. A falta de dados qualitativos e quantitativos para garantir segurança e
20 eficácia de uso mundial dos fitomedicamentos não foi alcançada e, entre outros
21 fatores, a lacuna quanto a metodologias de pesquisas adequadas para sua
22 avaliação são as razões desta falta (WHO, 2000).

23 No Brasil, assim como na América Latina, o uso de fitoterápicos é uma
24 alternativa terapêutica economicamente satisfatória comparada ao uso
25 sistemático de medicamentos alopáticos, uma vez que é caracterizada pela
26 utilização direta de plantas no tratamento de doenças (CARVALHO et al.,
27 2002). Ainda assim, o uso popular de plantas medicinais geralmente é
28 realizado de forma ineficaz e insegura, resultado de um sistema brasileiro de
29 saúde pública ineficiente, levando as populações a recorrerem ao uso irregular
30 dos fitoterápicos (SILVA et al., 2006).

31 O conhecimento e uso popular de fitoterápicos têm justificado a pesquisa
32 científica sobre a eficiência no uso das plantas medicinais. Alguns estudos têm

33 comprovado potencial antimicrobiano de membros da família Myrtaceae. Neste
34 contexto, pesquisas científicas vêm demonstrando resultados positivos de
35 *Psidium guajava* L. como uma alternativa terapêutica para certas patologias
36 (CARVALHO et al., 2002) sendo considerada a espécie do gênero Myrtaceae
37 mais distribuída, de grande importância econômica, devido as suas diversas
38 formas de utilização (SOUZA JÚNIOR et al., 2002), é denominada comumente
39 de goiabeira, conhecida na região Amazônica como goiaba, apesar de suas
40 outras denominações. Nesta região as folhas são empregadas no tratamento
41 caseiro de distúrbios gastrointestinais, em bochechos no tratamento de
42 inflamações da boca e da garganta (LOZOYA et al., 2002).

43 Atualmente já são conhecidos diversos fitoconstituintes de plantas
44 medicinais e estudos em modelos experimentais (como o de resistência
45 microbiana) realizados com a intenção de se conhecer a atividade biológica *in*
46 *vitro* e *in vivo* desses fitoconstituintes (MYIAKE et al., 2004). Dentre essas, *P.*
47 *guajava*, que apresenta em folhas secas, no mínimo, 5,5% de tanino totais,
48 1,0% de flavonoides totais calculados como quercetina, 0,2% de óleo
49 essencial, sendo este último constituído de, no mínimo, 15% de β -cariofileno
50 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002). Devido ao alto teor de taninos e de
51 flavonóides em suas folhas, os extratos metanólicos e aquosos podem
52 apresentar atividade cicatrizante.

53 Segundo o *National Center for Biotechnology Information* (2006), existem
54 cerca de 42 espécies de *Staphylococcus*, das quais 20 são associadas a uma
55 ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e em
56 animais (KONEMAN et al., 2001)

57 O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e está
58 amplamente distribuído em diversos nichos ecológicos, compreendendo mais
59 de 30 espécies já descritas por métodos de análise bioquímica e, mais
60 especificamente por hibridação DNA-DNA, das quais 17 podem ser isoladas de
61 amostras biológicas (GIAMMARINARO et al., 2005; MACHADO, 2007;
62 SANTOS, 2008).

63 Devido ao frequente aumento da resistência de *Staphylococcus aureus* a
64 diversos antimicrobianos como a oxacilina e que expressam plasmídeos com

65 alta frequência de transferência, diferentes linhas de pesquisa têm conduzido
66 estudos sobre mecanismos alternativos com o objetivo de desenvolver drogas
67 antiestafilocócicas e controlar a disseminação das linhagens resistentes. Vários
68 grupos de pesquisa desenvolvem estudos sobre princípios ativos derivados de
69 plantas e os resultados têm sido bastante promissores e estabelece uma nova
70 fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (EVANS, 1996;
71 THULER et al., 1999; ARAÚJO et al., 2000; YUNES et al., 2001; FREITAS,
72 2003).

73 Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 20.000 espécies de
74 diferentes plantas são utilizadas para fins terapêuticos em todo o mundo
75 (PHILLIPSON, 1994; MARTINS et al., 2000). Outro determinante na pesquisa
76 de medicamentos naturais envolve o contexto econômico, pois plantas
77 medicinais são facilmente cultivadas e adquiridas tanto em mercados populares
78 como em farmácias especializadas, em sua forma bruta ou já manipuladas,
79 respectivamente (CALIXTO, 2000). Assim, o presente estudo se propôs: I -
80 avaliar a atividade cicatrizante e o controle de infecção de *Staphylococcus* com
81 genes de resistência a drogas, com extrato etanólico de *P. guajava*; II - analisar
82 histologicamente a regeneração dos tecidos lesados tratados com o extrato
83 etanólico de *P. guajava* e III - determinar a DL50 do extrato em larvas de
84 *Artemia salina*.

85

86

87 2. REVISÃO DE LITERATURA

88

89 2.1 Infecção Bacteriana

90

91 As bactérias são microrganismos unicelulares, identificadas pela primeira
92 vez pelo neerlandês Anton Van Leeuwenhoek, por volta dos anos de 1670,
93 após a invenção do microscópio no século XVI (PATRICK, 2005). De acordo
94 com o *status* de classificação mais atual dos seres vivos, esses
95 microrganismos estão reunidos nos Domínio *Bacteria* e *Archaea*, dentre esses,
96 as mais comuns pertencem ao Domínio Bacteria (Universidade de São Paulo,
97 2015). Eles estão entre os menores organismos existentes, medindo de 0,5 a
98 2,0 μm de diâmetro, com morfologia diversa, mas, geralmente apresentam três
99 formas básicas: esféricas (cocos), em bastão (bacilos) e curvos (vibrião,
100 espirilo e espiroqueta). Além disso, podem ser encontrados em grupos de
101 células, formando arranjos que se originam quando as células em divisão não
102 se separam uma das outras (*estrepto*, *estafilo*).

103 São amplamente distribuídos, sendo encontrados em praticamente todos
104 os ambientes, inclusive sobre o corpo humano compondo sua microbiota. O
105 corpo de um ser humano adulto possui aproximadamente 10 trilhões de células
106 próprias e 100 trilhões de células microbianas na superfície da pele, nas
107 membranas mucosas e nas cavidades digestivas, respiratórias e reprodutoras.
108 A grande maioria dos organismos da microbiota humana são comensais,
109 vivendo em associação sem causar danos ao hospedeiro, porém, alguns
110 microrganismos denominados oportunistas podem causar doenças em
111 condições de deficiência das defesas normais do hospedeiro, acesso a locais
112 incomuns do corpo e distúrbios da própria microbiota (BLACK, 2002).

113 Somente a partir do século XIX que os microrganismos passaram a ser
114 investigados como agentes etiológicos de processos infecciosos e causadores
115 de doenças. Em meados do século XIX a *Teoria Germinal das Doenças*
116 afirmava que os microrganismos podiam invadir outros organismos e causar
117 doenças. Esta hipótese surgiu a partir das grandes contribuições científicas de
118 Louis Pasteur, que observou a associação entre organismos específicos e

119 determinadas doenças e, por Robert Koch, que postulou o conceito de “um
120 organismo, uma doença” em que ele afirmava que uma doença infecciosa era
121 causada por um único microrganismo (BLACK, 2002; PATRICK, 2005).

122 Nesse contexto, o termo infecção se refere, de acordo com Martins
123 (2006), ao ato ou efeito de infeccionar-se, contaminação, corrupção,
124 penetração, desenvolvimento e multiplicação de seres inferiores no organismo
125 de um hospedeiro, de que podem resultar, para este, consequências variadas,
126 habitualmente nocivas, em grau maior ou menor. Para Black (2006), infecção
127 se refere à multiplicação de qualquer organismo parasita dentro ou sobre o
128 corpo do hospedeiro e, quando esta infecção prejudica o funcionamento normal
129 desse hospedeiro, ocorre a doença.

130 Segundo Tortora et al. (2010), uma doença infecciosa é a que ocorre
131 quando um patógeno, microrganismo capaz de promover doença, invade um
132 hospedeiro susceptível, efetuando pelo menos uma parte de seu ciclo de vida
133 dentro do hospedeiro que, com frequência, resulta em uma doença.

134

135 *2.1.1 Mecanismos de ação das bactérias*

136

137 Os microrganismos, mas comumente as bactérias, exercem ações que os
138 possibilitam causar diversas doenças: acesso ao hospedeiro, aderência e
139 colonização nas superfícies celulares, invasão de tecidos e a produção de
140 toxinas e outros produtos metabólicos nocivos são alguns destes mecanismos
141 de patogenicidade. As bactérias patogênicas frequentemente apresentam
142 fatores de virulências como características estruturais e fisiológicas que ajudam
143 a causar infecções e doenças. Elas possuem estruturas especiais ou
144 características fisiológicas que aumentam suas chances de invadir e infectar
145 um hospedeiro com sucesso (BLACK, 2006). A aderência é certamente um dos
146 fatores críticos das infecções bacterianas, a ocorrência de certas infecções são
147 dependentes da interação existente entre as membranas plasmáticas das
148 células do hospedeiro e os fatores de aderência bacterianos. A aderência
149 bacteriana frequentemente é mediada por adesinas, fimbriais manose-
150 sensíveis (pili tipo I) e manose-resistentes (fímbricas P e S) estruturas

151 responsáveis pela permanência do contato agente infeccioso-hospedeiro
152 (KNÖBL, 2006).

153 A permanência no sítio da infecção danifica as células do hospedeiro e a
154 produção de enzimas patogênicas, que contribuem para as lesões tissulares,
155 são também um outro fator de virulência. Segundo Tortora et al. (2010), as
156 enzimas coagulase são enzimas que coagulam o fibrinogênio do sangue, que é
157 convertido à fibrina, gerando uma malha que forma o coágulo sanguíneo.
158 Esses coágulos podem proteger a bactérias da fagocitose pelas células do
159 hospedeiro e de outras defesas inespecíficas e específicos. Ainda segundo o
160 autor, essas enzimas são produzidas por apenas alguns membros do gênero
161 *Staphylococcus*, no entanto, mesmo os *Staphylococcus* Coagulase-Negativos
162 (SCN) podem ainda ser virulentos.

163 Arbuthnott et al. (1990) e Lina et al. (1999), concordam que organismos
164 do gênero *Staphylococcus* podem provocar três tipos básicos de síndromes,
165 entre elas as síndromes tóxicas, que ocorrem pela produção de proteínas
166 extracelulares de baixo peso molecular, denominadas enterotoxinas
167 estafilocócicas. Pertencem a uma grande classe de exotoxinas pirogênicas,
168 resistentes à hidrólise das enzimas digestivas e jejunais, e ainda termoestáveis,
169 que garante sua viabilidade mesmo após aquecimento a 100 °C durante alguns
170 minutos.

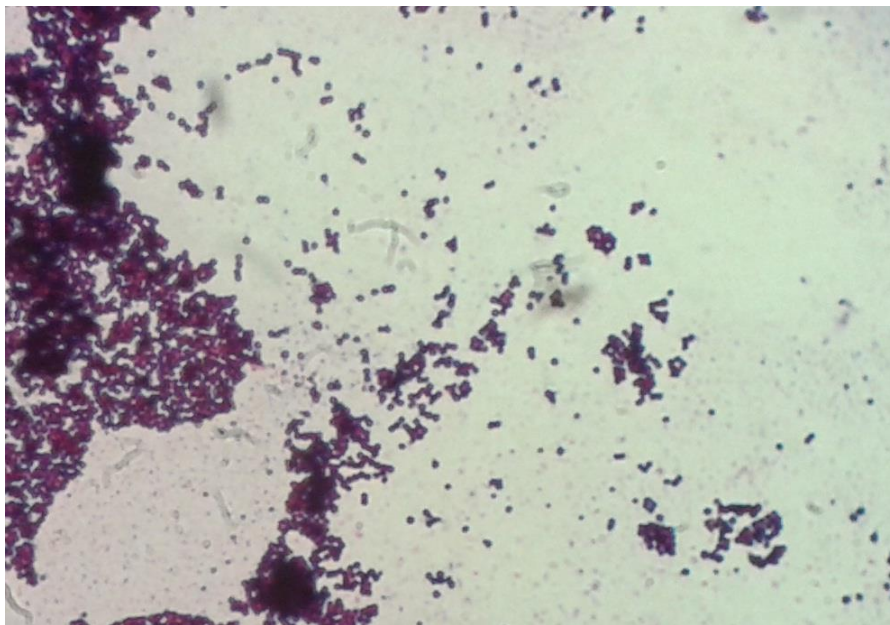
171 Millezi (2012), afirma que uma grande diversidade de microrganismos
172 pode aderir a superfícies bióticas e abióticas, conferindo-lhes características
173 especiais de resistência como proteção a antibióticos, desinfetantes e a
174 ambientes dinâmicos. De acordo com Clonts (2008), a formação de biofilmes é
175 de inquestionável importância à sobrevivência dos microrganismos em ambientes
176 diversos. Segundo o mesmo, as células em biofilmes são muito mais
177 resistentes a desinfetantes que as células livres, e possui em sua estruturação
178 uma matriz de exopolissacarídeo, criando um microambiente com regiões
179 aeróbias e anaeróbias com células em estado de “dormência” (persister cells)
180 em que os métodos convencionais de desinfecção são ineficientes, requerendo
181 doses elevadas de desinfetantes. Em comunidades de biofilmes é possível
182 ainda a transferência gênica entre bactérias por meio de plasmídeos
183 possibilitando, por exemplo, resistência a antibióticos (TENOVER, 2006).

184 2.1.2 *Staphylococcus spp.*

185

186 De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o gênero
187 *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas e “*coccus*” = semente ou
188 grão) compreende todos os microrganismos que pertencem à família
189 Micrococcaceae. As células, visualizadas ao microscópio óptico, são cocos
190 (células esféricas) Gram-positivos, medindo entre 0,5 a 1,5 µm de diâmetro,
191 imóveis, não produtoras de esporos, formando arranjos espaciais individuais,
192 aos pares e em agrupamentos irregulares devido ao seu plano de divisão
193 aleatório ou em vários planos como pode ser verificado na Figura 1
194 (KONEMAN et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2002; GOMES, 2015).

195



196

197 **Figura 1.** *Staphylococcus sciuri* visualizado ao microscópio óptico,
198 caracterização morfotintorial pela técnica de Gram. Fonte:
199 própria.

200

201 Esses microrganismos são aeróbios ou anaeróbios facultativos,
202 quimiorganotróficos com metabolismo respiratório ou fermentativo, produtores
203 de catalase, com capacidade de fermentar diversos carboidratos,
204 especialmente em condições de aerobiose com produção final de ácidos.

205 Geralmente halotolerantes em concentrações de cloreto de sódio que varia de
206 10% a 20%, coagulase positivos ou negativos, termonuclease positivos,
207 sensíveis à ação da lisostafina, oxidase-negativos, apresentam ácido teicóico
208 como constituinte de sua parede celular e conteúdo bastante reduzido de
209 guanina e citosina (30 % a 39%) em seu DNA, características que os
210 diferenciam dos *Micrococcus* (KLOSS; LAMBE, 1991; RAVEL, 1997; FRANCO;
211 LANDGRAF, 2002; TRABULSI et al., 2002; GOMES, 2015).

212 Ainda de acordo com Gomes (2015), as colônias de *Staphylococcus* spp.
213 são opacas, com variações entre brancas, creme, amarela e laranja. São
214 mesófilos, com faixa de temperatura de crescimento entre 4 e 46 °C mas com
215 temperatura ótima de 35 a 37 °C, capacidade de crescimento em pH em escala
216 compreendida entre 4,0 e 9,8 com ótimo entre 6,0 e 7,0 e capacidade de
217 crescimento com atividade em água (Aa) de 0,86 (FRAZIER; WESHOFF, 2000;
218 FRANCO; LANDGRAFF, 2000; JAY, 2005).

219 Dados complementares a esses são os do *National Center for*
220 *Biotechnology Information* (2006), que afirma existir cerca de 40 espécies de
221 *Staphylococcus*, das quais 20 são associadas a uma ampla variedade de
222 infecções de caráter oportunista, em seres humanos e em animais (KONEMAN
223 et al., 2001). O primeiro relato de microrganismos deste gênero é de 1878,
224 quando foi isolado e descrito pelo alemão Robert Koch. Logo após, em 1880, o
225 médico escocês Alexander Ogston adotou o nome do gênero da palavra grega
226 *staphylo* que significa cacho de uvas e também evidenciou sua patogenicidade
227 para cobaias e camundongos (GOMES, 2015). São microrganismos de ampla
228 distribuição, mas são encontrados principalmente na pele e nas mucosas dos
229 seres humanos e de outros mamíferos e aves (NEVES et al., 2007). As vias de
230 transmissão podem ser pessoa-pessoa, objetos-pessoa (ou vice-versa),
231 animais-pessoas (ou vice-versa). Pode ocorrer, inclusive, de pessoas
232 infectadas para outras saudáveis, mas que não apresentam sintomas
233 (BASTOS, 2008).

234 Dentre as espécies catalogadas no gênero *Staphylococcus* destacamos
235 as espécies *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus xylosus*. Segundo Kloos
236 (1994) são descritas como coagulase-negativos, extensivamente estudados,
237 nos últimos anos, devido sua patogenicidade e envolvimento com algumas

238 doenças humanas e animais. São reconhecidos como causa comum de
239 infecções hospitalares e um importante patógeno de infecções da corrente
240 sanguínea em casos de cuidados intensivos (SHITTU, 2004). Estirpes da
241 espécie *S. sciuri* têm sido associadas a infecções humanas graves como
242 endocardite, peritonite, septicemia e feridas.

243

244 2.2 Antibióticos β -lactâmicos

245

246 Os β -lactâmicos são uma classe de drogas que se caracterizam
247 quimicamente pela presença, em sua molécula, de um grupamento
248 heterocíclico azetidina denominado anel β -lactâmico (apontado pela seta na
249 figura 2). O termo lactama designa uma amida cíclica e a letra β indica uma
250 posição química: o segundo carbono mais próximo da função ácido carboxílico
251 (TAVARES, 2001).

252

253

254

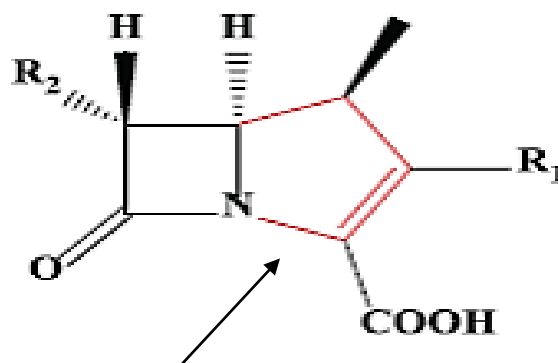
255

256

257

258

259



260 **Figura 2.** Estrutura molecular de um antimicrobiano β -lactâmico. Fonte: Papp-
261 Wallace et al., (2011).

262

263 Essa classe de antibióticos compreendem quatro grupos de drogas que
264 atuam sobre a parede celular dos microrganismos: penicilínicos,
265 cefalosporínicos, carbapenêmicos e monobactâmicos (NASCIMWENTO, 2004).

266

267 2.2.1 Penicilinas

268

269 As penicilinas naturais, como a penicilina G e V, são extraídas da cultura
270 do fungo filamentosso *Penicillium notatum*. A meticilina, primeira penicilina
271 semissintética, surgiu da necessidade pelo desenvolvimento de uma nova
272 droga isenta da ação das β -lactamases, fenotipicamente expressas por cepas
273 de *S. aureus* resistentes. Outras penicilinas semissintéticas como a oxacilina,
274 nafcilina, ampilicilina, amoxicilina, carbenicilina e a ticarcilina, surgiram em
275 rápida sucessão. Cada uma é sintetizada pela adição de uma cadeia lateral
276 especial a um núcleo de penicilina (BLACK, 2002).

277 A penicilina G, a penicilina natural mais frequentemente utilizada, é
278 administrada por via parenteral, ou seja, por uma via diferente da entérica, tal
279 como por via intramuscular ou endovenosa. Quando administrada por via oral,
280 a sua maior parte é degradada pelos ácidos estomacais. É um β -lactâmico
281 apropriado para tratar infecções causadas por algumas variedades de
282 estafilococos e gonococos que não sejam a ele resistentes. O fato de sua
283 atividade se conservar na urina a torna de preferência no tratamento de
284 algumas infecções do trato urinário. A alergia à penicilina G é rara entre
285 crianças, mas ocorre em 1 a 5% dos adultos. As penicilinas são geralmente
286 atóxicas, no entanto, doses elevadas podem ter efeitos tóxicos sobre os rins,
287 fígado e sistema nervoso central (MOODLEY, J; HOOSEN, 1996).

288 No ano de 1959, com o isolamento do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA),
289 foi possível a produção de penicilinas semissintéticas. Modificações na cadeia
290 desse precursor da penicilina resultaram em proteção do anel β -lactâmico
291 contra a ação hidrolítica das β -lactamases. Os primeiros desses agentes
292 antimicrobianos disponíveis para uso clínico foram a oxacilina e a meticilina,
293 que solucionaram temporariamente o problema causado pela resistência do *S.*
294 *aureus* à penicilina. Contudo, o uso desses agentes foi rapidamente seguido
295 pelo surgimento de cepas resistentes em 1961 (MARANAN et al., 1997).

296

297

298

299 2.2.2 Cefalosporinas

300

301 As cefalosporinas naturais, derivadas de diversas espécies do fungo
302 *Cephalosporium*, possuem ação microbicida limitada. Sua descoberta levou a
303 um grande número de derivados semissintéticos bactericidas da cefalosporina
304 C natural. As cefalosporinas semissintéticas, do mesmo modo que as
305 penicilinas semissintéticas diferem na constituição de suas cadeias laterais. As
306 frequentemente usadas incluem a cefalexina, a cefradina e o cefadroxil, todas
307 as quais são bem absorvidas por via oral. Outras cefalosporinas tais como a
308 cefalotina, cefapirina e a cefazolina, devem ser administradas por via
309 parenteral, geralmente nos músculos ou nas veias (TAVARES, 2001).

310 Embora as cefalosporinas não sejam geralmente a primeira droga de
311 escolha no tratamento de uma infecção, elas são frequentemente usadas
312 quando alergias ou toxicidade impedem o uso de outras drogas. Mas, pelo fato
313 de as cefalosporinas serem estruturalmente semelhantes à penicilina, alguns
314 pacientes que são alérgicos à penicilina podem também serem sensíveis às
315 cefalosporinas. Entre os β -lactâmicos elas representam drogas de amplo
316 espectro de atividade, raramente causam efeitos colaterais graves e podem ser
317 usadas profilaticamente em pacientes submetidos a cirurgias (BLACK, 2002).

318 O desenvolvimento de novas variedades de cefalosporinas parece ser
319 uma corrida contra a capacidade das bactérias de adquirirem resistência a
320 variedades mais antigas. Quando os organismos se tornaram resistentes às
321 cefalosporinas iniciais, de primeira geração, foram produzidas cefalosporinas
322 de segunda geração e logo após cefalosporinas de terceira geração
323 (RODRIGUES, 2007).

324 Os efeitos adversos provocados pelas cefalosporinas tendem a
325 apresentar reações locais, tais como irritação no local da injeção ou náusea,
326 vômitos e diarreia, quando a droga é administrada por via oral. Dos pacientes
327 alérgicos à penicilina, 4 a 15% também tendem a ser alérgicos às
328 cefalosporinas (BLACK, 2002).

329

330

331 *2.2.3 Carbapenêmicos*

332

333 Os carbapenens representam grupo novo de antibióticos bactericidas com
334 estrutura dupla. A primaxina, um carbapenem típico, é constituído de um
335 antibiótico β -lactâmico (imipenem), que interfere na síntese da parede celular, e
336 da citastina sódica, um composto que impede a degradação da droga nos rins.
337 Como grupo, os carbapenens possuem um espectro de atividade
338 extremamente amplo (BLACK, 2002).

339

340 *2.2.4 Monobactâmicos*

341

342 Entre os mais novos antibióticos β -lactâmicos está o grupo dos
343 antibióticos monobactâmicos, representados pelo aztreonam (MONTIANI-
344 FERREIRA et al., 1999). Os antibióticos monobactâmicos possui apenas um
345 único anel estrutural que não é afetado por β -lactamases (Figura 6). O
346 aztreonam um antibiótico beta-lactâmico monocíclico monobactâmico, possui
347 espectro de ação estreito (LOEB, 1993; AXELROD et al., 1994; GARVEY,
348 1995; PAPICH, 1995).

349

350 *2.2.5 Mecanismos de Ação dos Antimicrobianos β -lactâmicos*

351

352 Os antimicrobianos podem atuar de diversas maneiras, interferindo em
353 processos metabólicos ou em estruturas do microrganismo. O mecanismo de
354 ação é exercido essencialmente por interferência na síntese da parede celular,
355 alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, interferência na
356 replicação do cromossomo e na síntese proteica (TENOVER, 2006).

357 O mecanismo de ação primordial exercido pelos antimicrobianos β -
358 lactâmicos é o bloqueio da síntese do peptideoglicano ou mureína,
359 constituintes da parede celular bacteriana pela inativação da transpeptidase,
360 enzima essencial nesta síntese (TAVARES, 2001).

361 A parede celular é responsável por dar forma e rigidez à célula
362 bacteriana. Ela serve como uma barreira osmótica permitindo que as bactérias
363 retenham nutrientes, proteínas essenciais e ácidos nucleicos em seu interior e
364 mantenham certas moléculas em seu exterior (KOCH, 2003). Nos
365 microrganismos Gram-positivos, esse mucopéptido compreende 60% da
366 parede celular, sendo o restante constituído de ácidos teicóico, ribonucleato de
367 magnésio e carboidratos (OPAL; COHEN, 1999; GINSBURG, 2002).

368 A síntese do peptidoglicano ocorre em três etapas: a primeira ocorre no
369 citoplasma bacteriano e resulta na formação de um derivado do ácido N-
370 acetilmurâmico, o ácido uridinodifosfato-N-acetilmurâmico. Na segunda etapa
371 ocorre à formação de um composto do ácido N-acetilmurâmico com um
372 pentapéptido, que será transportado por um fosfolípido para fora da
373 membrana citoplasmática, juntamente com moléculas de N-acetilglicosamina.
374 No meio externo ocorrerá à terceira etapa com reações de transglicosamilação
375 e transpeptidação (MAINARDI et al., 2002).

376 Proteínas ligadoras de penicilina ou PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) são
377 proteínas situadas na face externa da membrana citoplasmática, que tem
378 atividade enzimática de transglicosidases, transpeptidases, carboxipeptidases e
379 endopeptidases, e participam da terceira etapa da biossíntese das novas
380 moléculas de peptidoglicano (PERITI; MAZZEI, 1999). Estas PBPs são os
381 principais alvos dos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas,
382 carbapenêmicos e monobactâmicos), os quais inibem sua ação e,
383 conseqüentemente, a formação do peptidoglicano havendo lise osmótica e por
384 tanto, morte celular (SINGH, 2004).

385

386 **2.3 Resistência Estafilocócica aos Antibióticos β -lactâmicos**

387

388 As características e a capacidade de microrganismo adquirem resistência
389 e os seus fenômenos são estudados desde o advento da resistência dos
390 patógenos quando em 1905 Ehrlich, Franke e Roehl, descobriram a resistência
391 dos tripanossomos, quando tratados com arsênio e que o mecanismo adquirido
392 era transferido à progênie, via mecanismo de herança gênica. Posteriormente,

393 em 1941, pesquisas com isolados bacterianos puros submetidos às
394 concentrações basais de sulfonamidas em longo prazo, deram origem a cepas
395 resistentes, em colônias que anteriormente mostravam-se sensíveis (ALBERT,
396 1968).

397

398 2.3.1 Dados Históricos

399

400 Alexandre Fleming, considerado o pai da microbiologia e descobridor da
401 capacidade de resistência das bactérias aos antimicrobianos, descreveu em
402 1929 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a antibiótico, por
403 mecanismo natural. Posteriormente em 1940, Abraham e Chain, mostraram
404 que uma enzima extraída de lisados de *Escherichia coli*, quebrava a estrutura
405 molecular da penicilina, denominando-a de penicilinase, mas somente em
406 1944, foi descrito pela primeira vez a resistência natural de *S. aureus* isolados
407 de pacientes. Hoje, os mecanismos de resistência bacteriana já são
408 conhecidos em todos os grupos de bactérias, bem como os mecanismos de
409 aquisição da resistência e as suas correlações moleculares (JACOBY, 1998).

410 Com a descoberta da penicilina, por Alexandre Fleming e sua utilização
411 no tratamento das infecções acreditou-se que as doenças infecciosas
412 deixariam de ser um problema na prática médica. No entanto, pouco tempo
413 depois, após o início da sua utilização, em 1946, cerca de 5% dos *S. aureus*,
414 isolados de pacientes ou portadores já eram resistentes à penicilina. Em 1949,
415 esta resistência podia ser percebida em 29% dos estafilococos isolados em
416 hospitais, em 1950 esse número chegou a 50% e em 1959, era cerca de 80%
417 em hospitais americanos.

418 Assim, a utilização da penicilina funcionou muito bem até a década de
419 1960 quando começaram a aparecer os isolados resistentes a esse
420 antimicrobiano. Para contornar o problema, foi criado o β -lactâmico sintético
421 meticilina, que era resistente a ação das β -lactamases que o *S. aureus*
422 produzia. Entretanto, logo após o advento da meticilina, surgiram relatos de
423 amostras resistentes também a esse antimicrobiano, além da expressão de
424 multirresistência. Essas cepas foram denominadas de MRSA (*Staphylococcus*

425 *aureus* resistente a meticilina) e são resistentes a todos os antimicrobianos β -
426 lactâmicos (LOWY, 1998).

427

428 2.3.2 *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA)

429

430 Segundo BUSTOS-MARTÍNEZ (2006), tradicionalmente as infecções
431 causadas pelo MRSA estavam limitadas aos hospitais (HA-MRSA); mas, nos
432 últimos anos, as infecções associadas ou adquiridas na comunidade e
433 denominadas de CA-MRSA estão sendo documentadas de forma crescente em
434 todo o mundo.

435 De acordo com Chambers (1997), os antimicrobianos β -lactâmicos se
436 ligam a proteínas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs
437 (proteínas ligadoras de penicilina), impedindo a formação da parede celular e
438 resultando em lise bacteriana. O mecanismo de resistência a meticilina está
439 relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que é
440 plenamente funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos beta-
441 lactâmicos. A codificação dessas novas PBPs, tornando esses patógenos
442 resistentes a oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz
443 parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de MRSA. Esse
444 gene é parte integrante de um elemento genômico denominado “cassete
445 cromossômico estafilocócico *mec*” (*SCCmec*).

446 Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos são baseados na
447 expressão fenotípica dos caracteres gênicos, herdados ou adquiridos, os quais
448 são responsáveis pela biossíntese de enzimas ou diferentes fenômenos
449 moleculares capaz de degradar, inativar, bloquear ou expulsar o antibiótico.
450 (MCDONALD, 1966; ZULIANI; TRABULSI, 1972; TRABULSI, 1973; NOVICK,
451 1980; LEVY, 1982; SUASSUNA, 1983; LACEY, 1984; SAUNDERS, 1984).
452 Esses mecanismos de aquisição de resistência podem ser classificados em
453 dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano, ou
454 aquisição de um gene de resistência de outro microrganismo, através de
455 transdução, transformação ou conjugação e estes genes geralmente se
456 encontram nos plasmídeos e transposons bacterianos (ITO et al., 2003). Essas

457 modificações no genoma dos microrganismos normalmente estão relacionadas
458 à: mudança na enzima ou estrutura alvo, mudança na via metabólica alvo,
459 bombas de efluxo e inativação do antibiótico por sua degradação e/ou inibição
460 competitiva (PRESCOT; HARLEY; KLEIN, 2002).

461

462 **2.4 A Pele**

463

464 Firmino (2010), afirma em seu trabalho que, a pele é uma estrutura de
465 revestimento do organismo, de extrema importância, que isola os componentes
466 orgânicos do meio exterior. Composta por uma variedade de tecidos de forma a
467 se organizar adequadamente para desenvolvimento de suas funções. Em um
468 adulto médio, a pele ocupa uma área de 1,9 m² e espessura que varia de 0,05
469 a 3,0 mm (TORTORA et al., 2010) representando, segundo Boranic et al.
470 (1999) o maior órgão do corpo humano com 15% do peso corporal.

471 De acordo com Black (2002), a pele é uma barreira para a maioria dos
472 microrganismos, importante para as defesas inespecíficas do sistema
473 imunológico. Ela é composta por duas diferentes camadas de tecidos: uma
474 superfície constituída de uma tênue **epiderme** desprovida de vasos
475 sanguíneos, composta por células epiteliais contendo em sua porção mais
476 externa várias fileiras de células mortas e uma proteína impermeabilizante, a
477 queratina; e uma camada subjacente, a **derme**, mais espessa em relação a
478 epiderme, constituída basicamente por tecido conectivo (Figura 3) e, inseridos
479 na derme podem ser encontrados folículos pilosos e ductos das glândulas
480 sudoríparas e sebáceas que podem proporcionar uma via de passagem por
481 onde microrganismos podem penetrar em tecidos mais profundos.

482 A transpiração pode fornecer umidade e nutrientes aos microrganismos,
483 mas ainda assim, a presença de sais, oriundos da mesma transpiração pode
484 inibir o crescimento microbiano, além de lisozimas que quebram a parede
485 celular de alguns micróbios, peptídeos antimicrobianos, a produção de ácidos
486 orgânicos que ajudam a manter o pH ácido da pele e uma microbiota normal
487 diversificada que compete com patógenos por espaço, dificultam o seu

488 estabelecimento e colonização que provavelmente acarretaria em danos
489 tissulares (TORTORA et al., 2010).

490

491

492

493

494

495

496

497

498

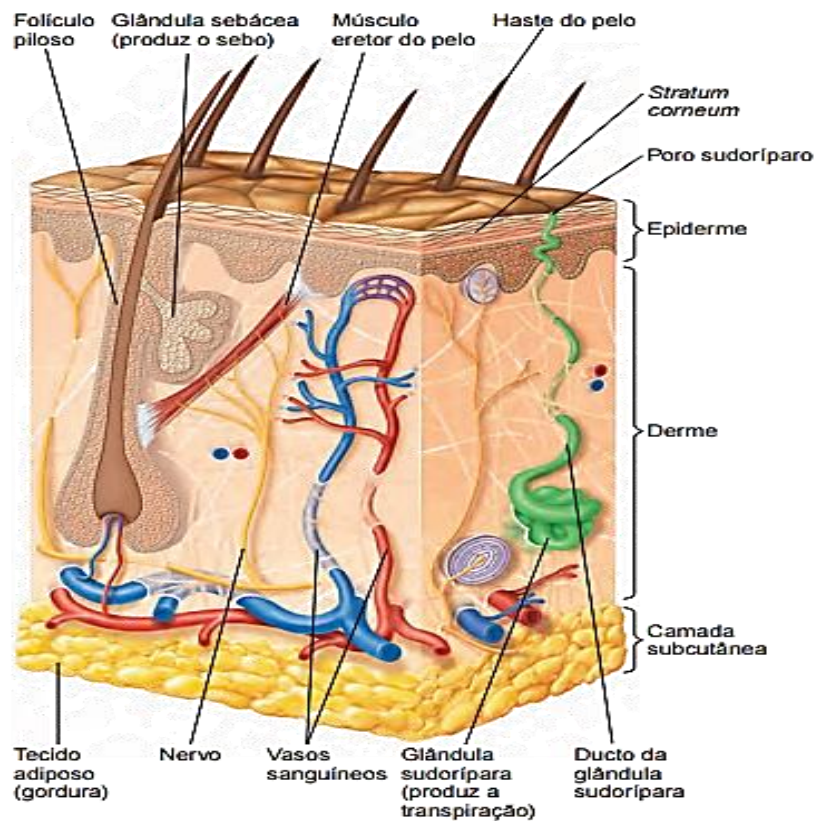
499

500

501

502

503



504 **Figura 3.** A estrutura da pele humana. Fonte: Tortora et al. (2010).

505

506 De fato a pele é uma barreira mecânica muito eficiente contra as invasões
507 microbianas. Compõe um dos mecanismos inespecíficos da imunidade como
508 primeira linha de defesa do organismo. A capacidade coordenada que as
509 células cutâneas apresentam em iniciar e regular a intensidade da resposta
510 imunológica da pele, mantendo a sua homeostase, levou a que se
511 considerasse a pele como um órgão imunologicamente competente
512 (LARREGINA; FALO, 2001). Assim, segundo Bruch-Gerharz et al. (1998), a
513 pele é, por excelência, um local de atividade imunológica importante devida à
514 constante exposição à condições ambientes, tais como estresse físico,
515 traumatismos, substâncias químicas irritantes e microrganismos infecciosos

516 oportunistas que explicam a ocorrência de constantes reações imunológicas
517 permitindo a manutenção das defesas adequadas.

518

519 2.4.1 Epiderme

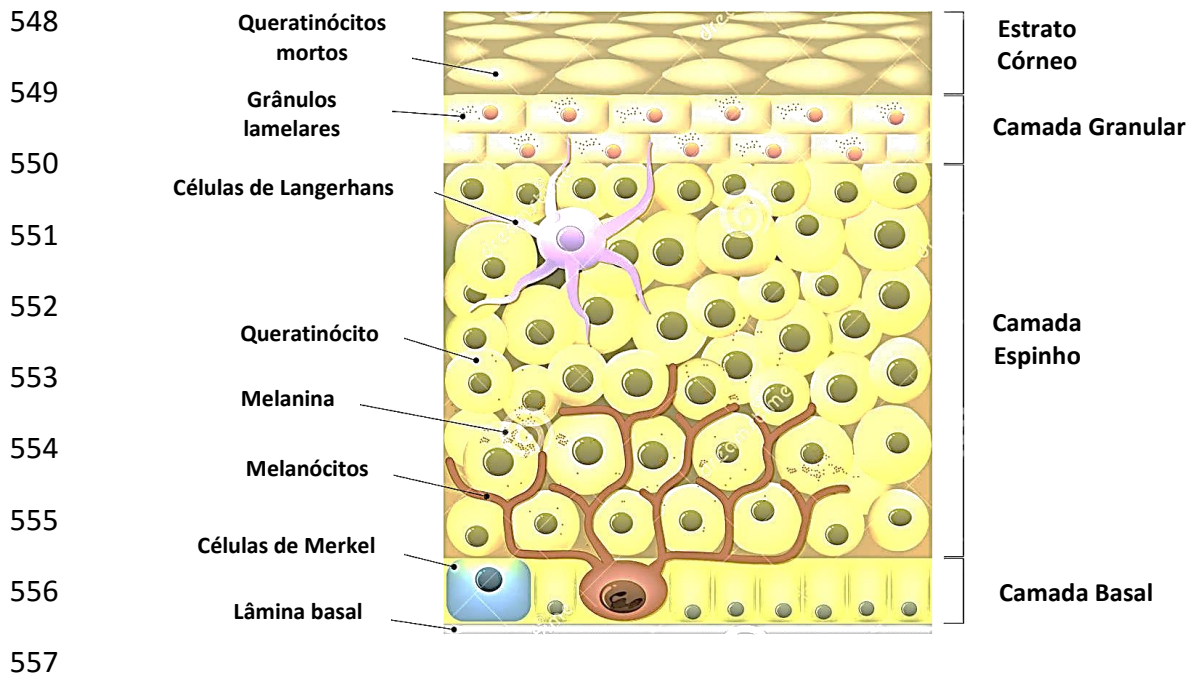
520 A epiderme é a camada mais externa do tecido epitelial, constituída por
521 uma camada basal (*stratum* germinativum), responsável pela renovação
522 celular, queratinócitos, melanócitos que produzem melanina e responsáveis
523 pela pigmentação da pele, e células do sistema inume como as células de
524 Langerhans (Figura 3) (REDHER et al., 2004; SOUTO et al., 2006).

525 Segundo Gartner e Hiatt (2003), é uma camada de epitélio estratificado
526 pavimentoso queratinizado, sobreposta por cinco camadas organizadas
527 estruturalmente, a partir da superfície interna inferior compreendendo: camada
528 basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea como visualizado na figura 4. Na
529 camada basal, também conhecida por germinativa, as células cúbicas são
530 responsáveis por originar outros tipos de células que compõem a epiderme,
531 pois, apresentam alta atividade proliferativa. Logo acima se encontra a camada
532 espinhosa com células morfologicamente achatadas, com núcleo central e
533 pequenas expansões no citoplasma que dá o aspecto de espinho. Sobre está
534 camada situa-se a camada granulosa, também com células achatadas ricas em
535 proteínas, lipídeos e grânulos envoltos por membranas provenientes da
536 camarada espinhosa. A camada lúcida é caracterizada pela ausência de
537 folículos pilosos, apresentando células com morfologia achatada, rica em
538 grânulos proteicos e normalmente corresponde a palma das mãos e planta dos
539 pés. Por fim, a camada mais superficial da epiderme, a camada córnea, que
540 atua como barreira para o órgão cutâneo. Essa última camada é constituída por
541 células escamosas, achatadas e mortas, repleta de queratina em seu
542 citoplasma correspondendo ao estágio final de diferenciação celular das células
543 da camada germinativa (ARNOLD et al., 1994; JUNQUEIRA, 1999; AMÂNCIO,
544 2003).

545

546

547



558 **Figura 4.** Epiderme. Camadas e células imunológicas da epiderme humana.
 559 Fonte: Dreamstime (2010).

560

561 As células de Langerhans, visualizadas na figura 4, na camada

562 espinhosa, como células caracterizadas por seu aspecto irregular, estrelada e

563 com prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados, estão presentes na

564 epiderme, mas tem sua origem em células-tronco hematopoiéticas que migram

565 e se estabelecem na grande maioria dos epitélios pavimentosos definindo a

566 imunidade local (AUSTYN, 1998; CHARTON-BAIN et al., 1998; LINS et al.,

567 2003).

568 2.4.2 *Derme*

569

570

571 A derme está situada como camada cutânea mais profunda entre a

572 epiderme e o tecido subcutâneo e se caracteriza por grande quantidade de

573 fibras colágenas e elásticas. Sua função envolve a participação na sustentação

574 da epiderme, nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo. Em

575 sua composição encontram-se tipos celulares como fibroblastos, mastócitos,

576 linfócitos e células dendríticas dermais, responsáveis pela defesa imunológica
577 da pele (GONÇALVEZ, 1990; NESTLÉ et al., 1993).

578 Estruturalmente a derme é subdividida em outras duas camadas: a
579 camada papilar, pouco espessa, com grande quantidade de tecido conjuntivo
580 frouxo e fibroblastos, constituída por colágeno tipo III e vasos sanguíneos de
581 menor calibre; e a camada reticular, caracterizada por feixes dérmicos
582 constituídos por colágeno tipo I, permeados por colágeno tipo III e vasos
583 sanguíneos calibrosos (SOUZA; VARGAS, 2004; FREEDBERG et al., 2005).

584 Segundo Cuttle et al. (2004) e Brink et al. (2005), o colágeno é o
585 componente mais abundante da matriz extracelular que promove a resistência
586 tênsil da pele. Brink et al. (2005), afirma que na pele adulta o percentual de
587 colágeno tipo I alcança 90% e 10% colágeno de tipo III. Estima-se que haja
588 uma redução da síntese e da quantidade total de colágeno em cerca de 1% ao
589 ano a partir da vida adulta por área de superfície da pele. A neoformação e
590 deposição desta fibra exercem papel importante na resposta de cicatrização,
591 uma vez que a modulação da migração e proliferação celular garante a eficácia
592 do processo de reparo (CUTTLE et al., 2004).

593

594 **2.5 Infecções de Pele Causadas por *Staphylococcus* spp.**

595

596 A pele em seu estado estrutural íntegro é uma barreira anatômica eficaz
597 contra a invasão por microrganismos que provavelmente levariam a infecção.
598 Além de sua função estrutural a pele exerce outras atividades imunológicas
599 inespecíficas de defesa que garantem essa proteção. As infecções na pele
600 ocorrem em consequência de uma ruptura da epiderme, assim, a invasão da
601 derme e do tecido subcutâneo mecanismos inflamatórios são ativados como
602 resposta à invasão. Uma vez estabelecida a infecção se propaga através de
603 espaços teciduais por ação de hialuronidases, fibrinolisinases e lectinases e não
604 é possível o isolamento dos microrganismos responsáveis pelas infecções,
605 sugerindo que muitas das alterações clínicas locais são mediadas por citocinas
606 e/ou toxinas (TSAO, 1999; LEÇA; CARVALHO, 2015).

607 Muito poucos microrganismos podem penetrar na pele intacta, mas
608 muitas bactérias oportunistas são encontrados entre a microbiota normal. As
609 infecções da pele por estafilococos são muito comuns, porque os organismos
610 estão quase sempre presentes nela. Essa microbiota cutânea é composta por
611 estafilococos coagulase negativos, difteróides aeróbicos (*Corynebacterium*
612 spp.) e difteróides anaeróbicos (*Propionibacterium acnes*). Em casos graves
613 de infecções há, também, a propensão de invasão de vasos linfáticos e
614 sanguíneos, resultando em linfangite, linfadenite, bacteriemia e septicemia
615 (FITZPATRICK, 1998; BLACK, 2002).

616 Os principais causadores de infecção são os microrganismos que
617 colonizam de forma ocasional e transitoriamente a pele. Entre eles pode ser
618 destacado o *S. aureus*, o mais patogénicos do gênero. Na maioria dos estudos
619 efetuados essa bactéria foi o agente mais frequentemente isolado nas
620 infecções da pele e tecidos moles, seguido de *Streptococcus pyogenes*. A
621 agressividade de algumas estirpes e mecanismos imunológicos mediados por
622 superantígenos podem determinar a evolução para quadros clínicos muito
623 graves, como o choque tóxico estreptocócico e estafilocócico (BLACK, 2002;
624 LEÇA; CARVALHO, 2015). Além disso, algumas cepas podem causar
625 septicemia com grande risco à vida, e outras produzem enterotoxinas que
626 afetam o trato gastrointestinal (TORTORA et al., 2010).

627 As infecções ocorrem quando esses microrganismos invadem a pele por
628 meio do folículo piloso promovendo a foliculite também conhecido por pústula
629 que podem tornar-se grande e serem extremamente dolorosas. Quando a
630 infecção é maior e mais profunda, com aparecimento de uma secreção
631 pulverulenta ocorre o abscesso, quando externo denomina-se furúnculo. Uma
632 disseminação para o pescoço e parte superior das costas, produz uma lesão
633 compacta denominada carbúnculo (BLACK, 2002).

634 Segundo Fitzpatrick et al. (1998) e Tsao et al. (1999), com a instalação da
635 infecção, os pacientes sentem dor, edema, eritema e calor locais, associados a
636 variáveis graus de sintomas sistêmicos, resultantes da disseminação da
637 infecção: indisposição, anorexia, febre e calafrios. Em alguns indivíduos,
638 sintomas sistêmicos podem anteceder os sinais e sintomas locais da infecção.

639 O eritema, no sítio da infecção, rapidamente se intensifica e amplia, e a dor
640 torna-se marcante.

641

642 **2.6 Cicatrização**

643

644 Os mecanismos que envolvem a recuperação de tecidos ou de
645 cicatrização demandam um processamento fisiológico elaborado, e
646 desencadeiam uma cascata de eventos, com fases bem definidas como
647 inflamação, proliferação e remodelagem. Tais mecanismos que envolvem além
648 de células e moléculas é um processo dinâmico de fenômenos bioquímicos e
649 fisiológicos, comportando-se mutuamente de forma harmoniosa, a fim de
650 garantir uma repavimentação tissular eficiente (MANDELBAUM et al., 2014).

651 De acordo com Stevens e Lowe (2002), a cicatrização ou repavimentação
652 tissular é um processo pelo qual o tecido lesado é substituído por tecido
653 conjuntivo vascularizado independente da lesão, tenha ela sido traumática ou
654 necrótica e o reparo tecidual poderá ocorrer de duas diferentes formas: pela
655 reconstituição do tecido com reposição da atividade funcional do mesmo, ou
656 por cicatrização, com o estabelecimento da homeostasia do tecido, mas com
657 perda de sua funcionalidade.

658 Os traumas podem danificar a derme de forma completa ou incompleta e
659 até mesmo chegar a atingir todo o órgão, até o tecido celular subcutâneo. Os
660 traumas que provocam danos na derme completa e atingem o tecido
661 subcutâneo denominam-se feridas de espessura total. Nesse caso há
662 necessidade de formação de novo tecido (tecido de granulação). A reparação
663 de tecido ocorre sobre as influências de diversos fatores como localização
664 anatômica, tipo de pele, fase de vida do indivíduo, podendo variar de jovens
665 para adultos (JULÍA et al., 1992).

666

667 *2.6.1 Fases do Processo de Cicatrização*

668

669 Fazio et al. (2000), afirma que alguns autores classificam as fases dos
670 processos de cicatrização em: fase de coagulação, inflamação, proliferativa, de
671 contração da ferida e de remodelação e ainda que, em determinado momento,
672 as fases ocorrem simultaneamente, o que permite o sucesso da cicatrização.

673

674 *2.6.1.1 Coagulação*

675

676 A fase inicial do processo de cicatrização depende da atividade
677 plaquetária, da cascata de coagulação e ocorre logo após o surgimento da
678 lesão. Várias substâncias como proteínas adesivas, fatores de crescimento e
679 proteases são liberadas e acabam iniciando a ativação das fases seguintes.
680 Na coagulação, ingressam na ferida, fibroblastos, células endoteliais e
681 queratinócitos, por meio da matriz provisória oferecida pela formação do
682 coágulo que, é importante também para o fechamento da ferida
683 (BROUGHTON, 2006).

684

685 *2.6.1.2 Inflamação*

686

687 Inúmeros mediadores químicos e células inflamatórias como os leucócitos
688 polimorfonucleares (PMN), os macrófagos e linfócitos são requisitados nesta
689 fase. Os PMN promovem a fagocitose das bactérias no local da infecção,
690 durante o tempo que permanecem no local, um período que varia de três a
691 cinco dias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase,
692 permanecendo no local da infecção do terceiro ao décimo dia fagocitando
693 bactérias, removendo corpos estranhos e direcionando o desenvolvimento do
694 tecido de granulação. Após o período de uma semana os linfócitos aparecem
695 na ferida e exercem importante influência sobre os macrófagos (PETROVA,
696 1992; BROUGHTON, 2006).

697 A fibronectina, sintetizada por uma variedade de células como
698 fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, também exerce função muito
699 importante nos processos da fase inflamatória. Por meio de sua adesão ao

700 colágeno e outros tipos celulares ela consolida o coágulo de fibrina, as células
701 e os componentes da matriz. Sua participação também se dá através da
702 opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias (CLARK, 1980;
703 BROUGHTON, 2006).

704

705 *2.6.1.3 Proliferação*

706

707 O início desta fase ocorre ao redor do quarto dia após a lesão e se
708 estende aproximadamente até o término da segunda semana. A epitelização,
709 angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno são
710 etapas decorrentes da fase proliferativa. Se a membrana basal estiver intacta,
711 as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da
712 epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as
713 células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de
714 restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994). O fator
715 de necrose tumoral alfa (TNF- α) estimula a angiogênese que é caracterizada
716 pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a
717 cicatrização adequada. Na etapa final da fase proliferativa ocorre a formação
718 de tecido de granulação que têm como células primordiais, os fibroblastos e as
719 células endoteliais. Após ativação, os fibroblastos, que saem do estado de
720 quiescência, migram dos tecidos vizinhos para a ferida (BROUGHTON, 2006).

721

722 *2.6.1.4 Contração da ferida*

723

724 Nesta etapa é liberado o fator de crescimento de transformação beta
725 (TGF- β) pelas plaquetas, que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno
726 tipo I e se transformarem em miofibroblastos, que promovem a contração da
727 ferida. Entre os fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial
728 podem ser citados o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PGDF), que
729 induz a proliferação celular, a quimiotaxia e a síntese matricial; o fator de
730 crescimento epidérmico, que estimula a epitelização; o fator transformador alfa,

731 responsável pela angiogênese e pela epitelização; o fator de crescimento
732 fibroblástico, que estimula a proliferação celular e angiogênese e o fator
733 transformador beta, responsável pelo aumento da síntese matricial (WITTE;
734 BARBUL, 1997).

735

736 2.6.1.5 Remodelação

737

738 A deposição de colágeno, de maneira organizada, é a característica mais
739 importante da fase de remodelação, mais importante clinicamente. O colágeno
740 produzido inicialmente (colágeno tipo III) é mais fino do que o colágeno
741 presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. O colágeno inicial é
742 reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e depositado ao longo
743 das linhas de tensão com o decorrer do tempo o que significa maior força tênsil
744 da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante da
745 cicatrização. Células fibroblásticas e leucocitárias secretam colagenases
746 promovendo a lise da matriz antiga. Ocorre o sucesso da cicatrização quando
747 há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, ocorrendo
748 sucesso quando a deposição é maior. Mesmo após um longo período de tempo
749 a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele original,
750 e a força tênsil jamais será a mesma, atingindo uma eficiência em torno de
751 80% após três meses de reconstituição (BROUGHTON, 2006).

752

753 2.7 Fitoterápicos e *Psidium guajava* L.

754

755 O uso de plantas com finalidade terapêutica têm sido um recurso humano
756 datado de 460 a.C. Contudo, as primeiras informações sistemáticas sobre
757 como medicamentos naturais são da Índia antiga. O conhecimento tradicional
758 sobre esse recurso terapêutico pode servir à geração de tecnologias para o
759 desenvolvimento de novos recursos farmacológicos de baixo custo e menor
760 dano residual ao homem (RUDDER, 2002; WANZALA et al., 2005)

761 *Psidium guajava* L. é uma árvore de pequeno, porte pertencente à família
762 das *Myrtaceae*, com caule tortuoso de muitas ramificações, recoberto por
763 cascas finas aderentes (CARVALHO et al., 2002). Conhecida como “goiabeira”,
764 é um arbusto ou árvore, podendo atingir 8 m de altura, sendo encontrada
765 desde o México até São Paulo. Comumente conhecida como guayabo na
766 Espanha e guava nos Estados Unidos, é frequentemente cultivada como um
767 alimento por ser uma fruta agradável, que também é utilizada na produção de
768 geleias (LOZOYA et al., 2002), sorvetes, sucos, vinhos, queijos e outros. A
769 fruta é uma baga, que consiste em um pericarpo e uma polpa com numerosas
770 pequenas sementes (ESCRIG et al., 2001). Existem dois tipos mais comuns, a
771 vermelha e a branca, sendo a vermelha mais saborosa e nutritiva. Pode ser
772 cultivada a partir das sementes. Possui quantidade regular de ácidos,
773 açúcares, e pectinas e, de acordo com Carvalho et al. (2002), seus principais
774 constituintes são: taninos, flavonóides, óleos essenciais, álcoois
775 sesquiterpenóides e ácidos tripernóides.

776 Em estudos realizados com extratos aquosos obtidos por infusão de
777 folhas de *P. guajava* foram constatados efeitos de bio-proteção contra radicais
778 livres, analgésico, sedativos, depressor do sistema nervoso central e
779 antitussígeno (TONA, 1998). Essas atividades foram atribuídas à presença de
780 flavonóides, tais como quercetina, canferol e miricetina (ALMEIDA et al., 2006).
781 Segundo Carvalho et al (2002), existe uma relativa segurança para o uso
782 terapêutico de *P. guajava*, comprovado pelo resultado do estudo de toxicidade
783 aguda e de Dose Letal 50 do extrato hidroalcoólico seco do caule e da folha
784 (779,17 mg/kg).

785 Os extratos de folhas de goiaba (etanol:água) apresentaram maior
786 atividade antibacteriana quando comparados com os extratos aquosos, em
787 ensaio de microdiluição em caldo. Os extratos aquosos das folhas, raízes e
788 cascas do caule foram ativos contra as bactérias Gram-positivas de *S. aureus*
789 (GNAN; DEMELLO, 1999) e *Bacillus subtilis*, e foram inativas contra as
790 bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (SANCHES et al, 2005).

791 Menezes et al. (2004), comprovaram em seu trabalho a inibição do
792 crescimento bacteriano de cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25923 utilizando o
793 extrato de folhas de *P. guajava*. Ojewoule (2006) pesquisou os efeitos anti-

794 inflamatórios e analgésicos do extrato aquoso das folhas de *P. guajava* em
795 ratos, utilizando edema induzido por albumina de ovo, enquanto o efeito
796 analgésico foi avaliado em modelos de testes de dor em ratos por queimaduras
797 térmica e química, com o extrato administrado por via oral. O autor observou
798 efeito anti-inflamatório e analgésico significativo e dose-dependente tendo
799 como controle o diclofenaco e morfina para comparação respectivamente anti-
800 inflamatória e analgésica. Dessa forma, a avaliação da atividade cicatrizante e
801 o controle de infecção de *Staphylococcus* mutantes, com extrato de *P. guajava*,
802 utilizando como modelo experimental protocolo de incisão cirúrgica e
803 desenvolvimento de infecção epitelial em ratos, pode promover uma alternativa
804 ao tratamento de infecções promovidas por *S. aureus Meticilina Resistente*
805 (MRSA).

806

807 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

808 ALMEIDA, K. C. et al. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L.
809 (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 2, p. 60-62, 2006.

810 AMÂNCIO, A. C. G. **Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de**
811 **enxertos e pele total em coelhos**. Universidade de São Paulo, 2003, 68p
812 (Dissertação de Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São
813 Carlos, Faculdade de Medicina de São Carlos.

814 ARAUJO, B. A. C.; OLIVEIRA, A. L.; SANTOS FILHO, L. Isolamento de
815 amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em estetoscópios usados
816 no ambiente hospitalar. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 32, n. 4, p.
817 285-288, 2000.

818 ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C.; AZAVEDO, J. S. Staphylococcal
819 toxins in human disease. **Journal of Applied Microbiology**, v.19, n. 1, p. 101-
820 107, 1990.

821 ARIDOGAN, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA, S. et al. Antimicrobial activity and
822 chemical composition of some essential oils. **Archives Pharmacal Research**,
823 v. 25: n. 6, p. 860-864, 2002.

824 ARNOLD, J. R. H. L. et al. **A pele: estrutura básica e função. Doenças**
825 **básicas da pele de Andrews**. 8 ed. São Paulo: Manole LTDA, 1994, p.1-14.

826 AUSTYN, J. M. Dendritic cells. **Curr Opin Hematol**, v. 5, n. 1, p. 3-15, 1998.

- 827 BASTOS, C. P. **Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S.***
828 ***intermedius* e *S. hyicus*.** Rio Grande do Sul, 2008, 53f. (Dissertação) –
829 Universidade Federal de Pelotas.
- 830 BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas.** 4. ed. Rio de
831 Janeiro: Guanabara, 2002.
- 832 BORANIC, M. et al. Stanica Kultura koznih: primjena u plasticnoj kirurgiji
833 istrazivanju laboratorijskom i. [Cultura de células da pele: utilização em cirurgia
834 plástica e estudos de laboratório]. **Lijec Vjesn**, v. 121, n. 4, p. 137-43, 1999.
- 835 BRINK, H. E. Influence of serum on adult and fetal dermal fibroblast migration,
836 adhesion, and collagen expression. **In Vitro Cellular & Developmental**
837 **Biology**, v. 41, n. 1, p. 252-57, 2005.
- 838 BROUGHTON, G. et al. The basic science of wound healing. **Plastic and**
839 **Reconstructive Surgery**, v. 117, suppl. 7, p. 12s-34s, 2006.
- 840 BRUCH-GERHARZ, D. et al. Nitric oxide in human skin: current status and
841 future prospects. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 1, p. 1-7,
842 1998.
- 843 CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory
844 guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of**
845 **Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p.179-189, 2000.
- 846 CARVALHO, A. A. T. et al. Estudos toxicológicos do extrato hidroalcoólico de
847 *Psidium guajava* Linn. **Revista Brasileira Ciências da Saúde**, v. 6, n. 1, p. 43-
848 50, 2002.
- 849 CHARTON-BAIN, M. C. et al. Reduced number of Langerhans cells in
850 oesophageal mucosa from AIDS patients. **Histopatology**, v. 34, n. 1, p. 399-
851 404, 1999.
- 852 CLARK, R. A. R. Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair.
853 **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 2, p. 201-206, 1998.
- 854 CLONTS, L. Como evitar a formação de biofilmes. **Revista Controle de**
855 **Contaminação**, v. 109, n. 1, p. 50-56, 2008.
- 856 CUTTLE L. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-
857 polarization. **Wound repair regeneration**, v. 12, n. 3, p. 374-83, 2004.
- 858 ESCRIG A. J. et al. Guava fruit (*P. guajava* L.) as a new source of antioxidante
859 dietary fi ber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p.
860 5489-5493, 2001.

- 861 EVANS, F. J. The use of plants products as tools to study mechanisms of drug
862 action. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of**
863 **Science**, v. 48, n. 4, p. 223-226, 1996.
- 864 FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In:
865 SIMÕES, C. M. O, et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.
866 5 ed. Ver. Ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 12.
- 867 FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 198.
- 868 FAZIO, M. J. et al. **Cicatrização de feridas**. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt
869 TH, Asken S. *Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas*. 2.ed. Rio de Janeiro:
870 Revinter, 2000. p. 23-28
- 871 FIRMINO, I. C. L. **Infecções de pele e partes moles: proposta de protocolo**
872 **de atendimento em unidade pediátrica**. Brasília, 2010, 65p. (Monografia de
873 Especialização) – Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal.
- 874 FITZPATRICK T. B. **Infecções bacterianas sistêmicas**. In: *Dermatologia:*
875 *Atlas e texto*. 3a ed. São Paulo: McGraw Hill. p. 622-678, 1998.
- 876 FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São
877 Paulo: Atheneu, 2000.
- 878 FRAZIER, W. C; WESHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed.
879 Zaragoza: Acribia, 2000.
- 880 FREEDBERG, I. M. et al. **Fitzpatrick – Tratado de Dermatologia**. 5 ed. Rio de
881 Janeiro: Revinter, 2005. p. 88-259.
- 882 FREITAS, D. B. **Atividade antimicrobiana de fluorquinolonas e ação sobre**
883 **plasmídeos em amostras de Staphylococcus aureus humanas e bovinas**.
884 João Pessoa. 85p, 2003. (Mestrado) – CCEN/UFPB.
- 885 GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tegumento**. In: GARTNER, L. P.; HIAT, J. L.
886 *Tratado de Histologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 265-
887 279.
- 888 GIAMMARINARO, P. et al. Development of a new oligonucleotide array to
889 identify Staphylococcal strains at species level. **Journal of**
890 **Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3673-3680, 2005.
- 891 GNAN, S. O.; DEMELLO, M. T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous
892 Goiaba extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 3, p. 103-108,
893 1999.

- 894 GOMES, M. J. P. **Gênero *Staphylococcus* spp.** Disponível em:
895 <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp>
896 %204-2015_0.pdf> Acesso em: 21 de out, 2015.
- 897 HOOSEN. Programa Estadual de DST/AIDS-SP. Sífilis congênita: um desafio
898 para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico**. São Paulo: Secretaria de
899 Estado da Saúde, 1995.
- 900 JAIN A, AGARWAL J, BANSAL S. Prevalence of methicillin-resistant,
901 coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from
902 a tertiary care hospital in India. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, n.1, p.
903 941-944, 2004.
- 904 JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. London: Chapman & Hall, 2005.
- 905 JULÍA, V. et al. Características de la cicatrización de las heridas en el período
906 fetal. **Cirurgia Pediátrica**, v. 5, n. 3, p. 117-21, 1992
- 907 JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed. São Paulo:
908 Guanabara-Koogan; 2013. p.46-66.
- 909 KLOOS WE, BANNERMAN TL. Update on clinical significance of coagulase
910 negative staphylococci. **Journal Clinical Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 117-140,
911 1994.
- 912 KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. Staphylococcus. In: **BALOWS, A. Manual of**
913 **Clinical Microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology,
914 1991, 1500 p.
- 915 KNÖBL, T. et al. **Investigação molecular dos fatores de virulência de**
916 ***Escherichia coli* isoladas de fezes de psitacídeos mantidos em cativeiro.**
917 In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA VETERINÁRIOS DE
918 ANIMAIS SELVAGENS – ABRAVAS, 15. Águas de São Pedro. 2006, Anais.
919 Águas de São Pedro: Associação Brasileira dos Veterinários de Animais
920 Selvagens, 2006.
- 921 KONEMAN, E.W. et al. **Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e**
922 **Microrganismos Relacionados**. In: KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico
923 Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p.
924 551- 588.
- 925 LARREGINA A. T, FALO L. D, Jr. **Dendritic Cells in context of skin**
926 **immunity**, In: Dendritic Cells: Biology and clinical applications, ed. Lotze MT,
927 Thomson AW (Academic Press, San Diego), 2001, p.301-306.
- 928 LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing.
929 **Clinics in Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157-169, 1994.

- 930 LEÇA, A.; CARVALHO, L. **Infecções de pele e tecidos moles**. Disponível
931 em:<http://www.spp.pt/UserFiles/file/Protocolos_SPP/Infeccoes_da_Pele_e_Te
932 [cidos_Moles.pdf](http://www.spp.pt/UserFiles/file/Protocolos_SPP/Infeccoes_da_Pele_e_Te)> Acesso em: 23 de out. 2015.
- 933 LINA G. Toxin involvement in staphylococcal scalded skin syndrome. **Clinical**
934 **Infectious Disease**, v. 25, n. 6, p. 1369-1373, 1997.
- 935 LINS, R. D. A, et al. Células dendríticas: origem, distribuição, morfologia,
936 estrutura, atividade funcional e métodos de identificação – uma revisão.
937 **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 2, n. 3, p. 29-35, 2003.
- 938 LOZOYA, X. et al. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium*
939 *guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of**
940 **Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 19-24, 2002.
- 941 MANDELBAUM, S. H. Cicatrization: currents concepts and auxiliary resources
942 – Part I. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- 943 MARANAN, M.C. et al. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology,
944 molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of**
945 **North America**, v. 11, n. 4, p. 813-49, 1997.
- 946 MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas**
947 **Medicinais**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2000. 220p.
- 948 MENEZES, M. C. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de
949 extratos de plantas brasileiras sobre bactérias isoladas da cavidade de cães.
950 **Revista Universidade Rural**, v. 24, n. 2, p. 141-144, 2004.
- 951 MILLEZI, A. F. **Ação dos óleos essenciais sobre biofilmes formados por**
952 ***Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. Minas Gerais, 2012, 113f.
953 (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras (Revisão).
- 954 MIYAKE, M. A. et al. Inquérito, sobre uso de plantas medicinais para
955 tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital
956 pública terciário. **Caderno de Debates da RBORL**, v. 70, n. 1, p. 43-55, 2004.
- 957 MOODLEY, J. A. A. Sexually transmitted diseases and urinary tract infections in
958 pregnancy. **In: Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 9, n. 1, p. 34-36,
959 1996.
- 960 NASCIMENTO, E. D. **Resistência de bactérias Gram-positivas e Gram-**
961 **negativas aos antimicrobianos β -lactâmicos**. Monografia (Curso de
962 Especialização em Microbiologia) – Universidade Federal Rural de
963 Pernambuco, Recife, 2004.

- 964 NESTLÉ, F. O. et al. Characterization of dermal dendritic cells obtained from
965 normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets.
966 **Journal of Immunology**, v. 151, n. 1, p. 6535-6545, 1993.
- 967 OJEWOLE, J. A. Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Psidium guajava*
968 Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. **Methods and Findings in**
969 **Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 10, p. 689-695, 2005.
- 970 PAPP-WALLACE, K. M., et al. Carbapenems: Past, Present, and Future.
971 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.11, pp. 4943-4960, 2011.
- 972 PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University
973 Press. New York, 2005, cap.16. In: Patrick, G. L. **An Introduction to Medicinal**
974 **Chemistry**, Oxford University Press. New York, 1995, cap. 10.
- 975 PETROVA, M. B. Morfofunktional'nye osobennosti zazhivleniia kozhnoi rany u
976 krys pri vozdeistvii nizkointensivnogo lazernogo izlucheniia. **Morfologiia**, v.
977 102, n. 6, p. 112-121, 1992.
- 978 PHILLIPSON, J. D. Natural products as drugs. Transactions of the Royal
979 Society **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 17-19, 1994.
- 980 RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados**
981 **laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 1997.
- 982 REDHER, J. et al. Model of human epidermis reconstructed in vitro with
983 keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **São**
984 **Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 1, p. 22-25, 2004.
- 985 RODRIGUES, P. R. C. et al. O uso das cefalosporinas na clínica de pequenos
986 animais: breve revisão. **Veterinária em Foco**, v. 4, n. 2, p. 143-158, 2007.
- 987 RUDDER, M. C. **Guia Compacto das plantas medicinais**. São Paulo: Rideel,
988 2002, 478p.
- 989 SANCHES, N. R. et al. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium*
990 *guajava* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 429-
991 436, 2005.
- 992 SANTOS, A. **Pesquisa de portadores de *Staphylococcus aureus* nas**
993 **fossas nasais de indivíduos e análise do perfil de sensibilidade aos**
994 **antimicrobianos**. Carazinho, 2008. 22f. (Curso de Biomedicina) –
995 Universidade Luterana do Brasil - ULBRA.
- 996

- 997 SHITTU A.J, LIN J, MORRISON D, KOLAWOLE D. Isolation and molecular
998 characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus*
999 *haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. **Journal Medical**
1000 **Microbiology**, 53, n. 1, 5-51, 2004.
- 1001 STEPANOVIC S, DAKIC I, DJUKIC S, LOZUK B, SVABIC-VLAHOVIC M, ET
1002 AL. Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri*.
1003 **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 685-686, 2002.
- 1004 SILVA, J. O. et al. Caracterização físico-químico do extrato fluído e seco por
1005 nebulização de *Sympytm officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.
1006 16, n. 2, 2006.
- 1007 SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. **Anatomia, fisiologia e histologia da**
1008 **pele**. In: KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. Dermatologia estética. São Paulo:
1009 Atheneu, cap. 1, 2004.
- 1010 SOUTO, L. R. M. et al. Model for human skin reconstructed in vitro composed
1011 of associated dermis and epidermis. **São Paulo Medical Journal**, v. 124, n. 2,
1012 p. 71-76, 2006.
- 1013 SOUZA JÚNIOR, E. E.; DUARTE, J. B.; CHAVES, L. J. Estabilidade
1014 fenotípica em goiabeira (*Psidium guajava* L.) com ênfase em peso de fruto,
1015 precocidade e período de colheita. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 32, n.
1016 2, p. 97-103, 2002.
- 1017 STEVENS A.; LOWE, J. **Respostas teciduais ao dano**. In: Stevens A, Lowe J.
1018 Patologia. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2002. p. 49-50.
- 1019 TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª
1020 ed., São Paulo: Atheneu, 2001, 1216 p.
- 1021 TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American**
1022 **Journal of Medicine**, v. 119, s. 6A, p. 3-10, 2006.
- 1023 THULER, L. C. S. et al. Determinants of mortality in oncology patients colonized
1024 or infected with *Staphylococcus aureus*. **Revista Hospital das Clínicas**, v. 54,
1025 n. 2, p. 47-52, 1999.
- 1026 TONA, L. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese
1027 medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 57-65, 1998.
- 1028 TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 1029 TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

- 1030 TSAO H. et al. **Soft tissue Infections: erysipelas, cellulitis and gangrenous**
1031 **cellulites**. In: FREEDBERG I. M. et al. *Dermatology in general medicine*. 5. ed.
1032 New York: McGraw Hill, p. 2213-2231, 1999.
- 1033 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – UNIVESP. **Panorama histórico da**
1034 **classificação dos seres vivos e os grandes grupos dentro da proposta**
1035 **atual de classificação.** Disponível em:
1036 <http://midia.atp.usp.br/impressos/lic/modulo03/diversidade_biolologica_filogenia
1037 [_PLC0019/Bio_Filogenia_top01.pdf](http://midia.atp.usp.br/impressos/lic/modulo03/diversidade_biolologica_filogenia)> Acesso em: 20 out. 2015.
- 1038 VIEIRA, R. H. S. F. et al. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium*
1039 *guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish muscle
1040 and known to induce diarrhea in children. **Revista do Instituto de Medicina**
1041 **Tropical**, v. 43, n. 1, p. 145-148, 2001.
- 1042 WANZALA, W. et al. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution,
1043 perception, understanding and the way forward. **Livestock Research for Rural**
1044 **Development**, v. 17, n. 5, p. 20-26, 2005.
- 1045 WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical**
1046 **Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.
- 1047 WORLD Health Organization. **General Guidelines for Methodologies on**
1048 **Research Evaluation of Traditional Medicines**. Geneve: WHO, 2000.
- 1049 YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e
1050 fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e
1051 fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 48-56, 2001.
- 1052
- 1053
- 1054
- 1055
- 1056
- 1057
- 1058
- 1059
- 1060
- 1061
- 1062
- 1063
- 1064
- 1065

Capítulo II

1066

1067

1068

1069 Ação cicatrizante e controle de crescimento de estirpes de *Staphylococcus* spp. com
1070 perfil de resistência pelo extrato de *Psidium guajava* L.

1071

1072 Adriano Barbosa da Silva¹, Andressa dos Anjos Lima², Hilda Michelly Paiva dos
1073 Santos¹, Cintia Giselle Martins Ferreira¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹ *

1074

1075

1076 ¹*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e*
1077 *Fisiologia Animal, Recife, Brasil*

1078 ²*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, Brasil*

1079 *Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

1080 Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

1081 *E-mail: teixeira.alvaro@ig.com.br*

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088 **RESUMO**

1089 Objetivou-se avaliar a atividade cicatrizante e o controle de infecção do extrato
1090 etanólico de *Psidium guajava* frente a estirpes da espécie *Staphylococcus sciuri* (SsI,
1091 SsII, SsIII e SsIV) e *Staphylococcus xylosus* (Sx) em modelo experimental com
1092 protocolos de incisão cirúrgica. A atividade antimicrobiana e o perfil de resistência a
1093 antibióticos foram verificados pelo método de disco-difusão com discos de papel de
1094 filtro e discos padrão dos antibióticos respectivamente, comparados aos diâmetros de
1095 halo de inibição e interpretados de acordo com os critérios preconizados pelo Clinical
1096 and Laboratory Standards Institute. A toxicidade do extrato foi avaliada pelo método
1097 DL-50, o controle de infecção e cicatrização foram realizados em ratos Wistar. Todas as
1098 estirpes se mostraram sensíveis ao extrato de *P. guajava* que, em comparação com os
1099 antibióticos Penicilina G e Oxacilina foi mais eficientes. A diferença estatística
1100 significativa no teste de Kruskal-Wallis ocorreu apenas entre os tratamentos 10-900
1101 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para as estirpes SsI, SsII, Sx e SsIV e entre 10-330 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para a estirpe SsII.
1102 Foram considerados tóxicos os tratamentos de 650 e 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ com mais de 50% dos
1103 náuplios mortos após 24 h. A análise histoquímica mostrou reepitelização com fibras
1104 colágenas mais densas no grupo de ratos tratados com o extrato. Diante disso, sugere-se
1105 que os compostos químicos encontrados nas folhas de *P. guajava* poderão representar
1106 grande potencial antimicrobiano e cicatrizante na constituição de novos fármacos.

1107

1108 **Palavra-chave:** *Psidium guajava*, goiaba, *Staphylococcus*, resistência microbiana,
1109 cicatrização

1110

1111 1. Introdução

1112 A Organização Mundial de Saúde (OMS) já catalogou mais de 20.000 espécies de
1113 plantas medicinais com propriedades terapêuticas para patologias como pneumonia,
1114 úlcera, diarreia, bronquite, constipações e doenças do trato respiratório pela utilização
1115 de óleos essenciais extraídos das plantas, obtidos a partir de diferentes órgãos vegetais
1116 tais como cascas, sementes, flores e folhas (ARIDOGAN et al., 2002).

1117 Os medicamentos obtidos a partir dessas plantas têm sido cada vez mais
1118 reconhecidos pelos pesquisadores como uma alternativa importante aos antibióticos
1119 produzidos industrialmente por seu baixo custo (VIEIRA et al., 2001). No Brasil e em
1120 alguns países da América Latina esses medicamentos são economicamente mais
1121 acessíveis em relação aos medicamentos alopáticos (CARVALHO et al., 2002).

1122 Algumas pesquisas comprovam resultados antimicrobianos de plantas medicinais,
1123 dentre elas, membros da família *Myrtaceae*. Pesquisas científicas vêm comprovando a
1124 eficácia de *Psidium guajava* L. (goiabeira), como recurso terapêutico para certas
1125 patologias (CARVALHO et al., 2002).

1126 *P. guajava* L. é uma árvore de pequeno porte, membro da família *Myrtaceae*,
1127 amplamente distribuída no território nacional. Apresenta caule tortuoso e esgalhado,
1128 recoberto por uma casca fina e aderente, seus principais constituintes fitoquímicos são
1129 taninos, flavonóides, óleos essenciais, álcoois sesquiterpenóides e ácidos tripernóides
1130 (CARVALHO et al., 2002; SCHUCH et al., 2008). Suas folhas secas apresentam 5,5%
1131 de taninos totais, 1% de flavonóides (quercetina) e 0,2% de óleo essencial, constituído
1132 de 15% de β -cariofileno (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

1133 Estudos em ratos por modelos de testes de edema induzido e dor por queimadura
1134 térmica e química comprovaram as atividades anti-inflamatória e analgésica,
1135 respectivamente do extrato aquoso das folhas de *P. guajava* (OJEWOLE, 2006).

1136 Segundo Shittu (2004), a espécie *Staphylococcus scuri* é uma das causas, mas comuns
1137 de infecções hospitalares e um importante patógeno de infecções na corrente sanguínea
1138 em cuidados intensivos. Hedin e Widerstrom (1998) e Hanberger et al. (2010), afirmam
1139 que esta espécie é um membro do grupo dos *Staphylococcus* Coagulase-Negativos
1140 (SCN) associados a resistência à múltiplos antimicrobianos, em especial à metilina.

1141 *Staphylococcus xylosum* é um comensal comum, habitando geralmente a
1142 membrana mucosa e a pele de uma variedade de mamíferos e ocasionalmente em seres
1143 humano por meio de formação de biofilme. Em esta espécie seja descrita como não
1144 patogênica dentre os *Staphylococcus* vários relatos descrevem infecções oportunistas
1145 em animais (BINGEL, 2002; BRADFIELD et al., 1993; JACKSON et al., 2001) e seres
1146 humanos (KOKSAL et al., 2009).

1147 De acordo com Okamoto (2010), o extrato glicólico obtido das folhas de
1148 goiabeira, com alto teor de taninos e flavonóides, apresentou atividade antimicrobiana
1149 com inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e atividade cicatrizante,
1150 verificada histologicamente com evidências de fibroplasia e proliferação vascular.

1151 As atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana já foram
1152 comprovadamente apresentadas por flavonóides, encontrados nas folhas de *P. guajava*,
1153 interagindo com uma variedade de sistemas enzimáticos e bioquímicos (ACAMPORA
1154 et al., 2007).

1155 Com base nos relevantes dados sobre atividade biológica de *P. guajava* o presente
1156 estudo avaliou a ação cicatrizante e o controle do crescimento de estirpes de
1157 *Staphylococcus* spp. com perfil de resistência em um modelo experimental de
1158 desenvolvimento de infecção epitelial utilizando ratos Wistar.

1159

1160

1161 2. Material e Métodos

1162 2.1. Obtenção do Extrato Etanólico de *P. guajava*

1163 As folhas para obtenção do extrato etanólico de *P. guajava* (EEPg) foram
1164 coletadas no Campus Dois Irmãos, Universidade Federal Rural de Pernambuco
1165 (UFRPE), Recife-PE, Brasil, sob as coordenadas 8°00'51.0"S 34°57'02.1"W. O
1166 material vegetal foi identificado a partir da comparação com a exsicata n° 12715 do
1167 Herbário Sérgio Tavares (UFRPE) que tem como curadora Dr.^a Maria Elizabeth
1168 Bandeira-Pedrosa.

1169 As folhas passaram por antissepsia com álcool 70%, foram desidratadas em estufa
1170 a 45 °C durante 5 dias. Logo após foram trituradas em triturador de lâminas e
1171 solubilizadas em álcool etílico 92.8° INPM (extrator/diluyente) na proporção de 0,2
1172 g/mL. O EEPg final foi obtido após filtração em papel de filtro Whatman n° 1 e
1173 esterilização em filtro millipore com membrana de 0,20 µm para as diluições de 10, 50,
1174 120, 210, 330, 400, 480, 530, 650 e 900 µL/mL, utilizadas como tratamentos nos
1175 experimentos. O antibiótico comercial Chemitril[®] Injetável 2,5% (Enrofloxacina) e o
1176 diluyente foram utilizados como controles positivo e negativo respectivamente.

1177

1178 2.2 Teste de Toxicidade com *Artemia salina* (DL-50)

1179 A avaliação toxicológica do EEPg foi realizada de acordo com o método descrito
1180 por Lopes et al. (2002), modificado. O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi
1181 água salgada artificial (3,8 g de NaCl/L de água destilada). As larvas foram utilizadas
1182 nos ensaios 24 h após a eclosão em aquário com bomba de aeração, em fase náupilo.
1183 Aproximadamente 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para 11 tubos de ensaio
1184 contendo os tratamentos de 10, 50, 120, 210, 330, 400, 480, 530, 650 e 900 µL/mL nos
1185 10 primeiros tubos e no tubo 11 (controle) contendo o meio para cultivo. O ensaio foi

1186 realizado em triplicata e a contagem dos náupilos mortos e vivos foi realizada após 24 h.
1187 Este procedimento foi repetido ao menos três vezes.

1188
1189 *2.3 Determinação do Perfil de Resistência de Staphylococcus sciuri (Sz) e*
1190 *Staphylococcus xylosus (Sx) a Antibióticos*

1191 Foram realizados testes para confirmação quanto a morfologia das estirpes
1192 (cocos Gram-positivos), pelo método de coloração de Gram (BLACK, 2002), e
1193 antibiograma, pelo método de disco-difusão, descrito em NCCLS (2003), para definição
1194 do perfil de resistência aos antibióticos, eritromicina (ERI), ácido clavulânico +
1195 amoxicilina (AMC), Penicilina G (PG), Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LVX),
1196 Oxacilina (OXA), Cefalotina (CFL), Norofloxacina (NOR) e Gentamicina (GEN). A
1197 avaliação foi realizada pela medida em milímetros, do halo de inibição do crescimento
1198 bacteriano, em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de um paquímetro e
1199 comparados aos diâmetros de halo de inibição, interpretados de acordo com os critérios
1200 preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2005).

1201
1202 *2.4 Atividade Antiestafilocócica do Extrato de P. guajava*

1203 Para o estudo da atividade antiestafilocócica *in vitro* e controle de infecção foram
1204 utilizadas 4 estirpes da espécie *Staphylococcus sciuri* (SsI, SsII, SsIII e SsIV), 1
1205 *Staphylococcus xylosus* (Sx), todas portadoras de genes caracterizados por expressão de
1206 resistência (*mecA*, *seg* e *seh*) à oxacilina e SsIII para oxacilina e penicilina (BATISTA
1207 et al., 2008) e 1 cepa padrão *Staphylococcus aureus* (Sa) como controle. As estirpes de
1208 *Staphylococcus* foram reativadas em ágar sal manitol a 37±0,5 °C por 24 h. O
1209 subcultivo para realização dos testes foi preparado com a transferência das culturas de
1210 manutenção (Ágar Mueller Hinton – DIFCO™ (MH) acrescido de NaCl a 4%) para
1211 tubos de ensaio contendo MH inclinado e incubado a 37±0,5 °C por 24 h.

1212 As suspensões bacteriológicas das estirpes foram preparadas com solução salina a
1213 0,9% ajustando-se sua densidade de controle de turbidez a partir da solução padrão da
1214 escala 0,5 de McFarland para a absorbância de $A_{620} = 0,10$ em espectrofotômetro,
1215 resultando em uma suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL
1216 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Placas de Petri contendo
1217 MH foram inoculadas com swabs saturados nas suspensões, e após secagem por 5
1218 minutos, discos de papel de filtro Watmann n° 1 de 6 mm de diâmetro esterilizados,
1219 saturados com 30 μ L dos tratamentos do extrato e controles, foram depositados e
1220 pressionados sobre o meio de cultura com auxílio de pinça em cinco pontos
1221 equidistantes das placas.

1222 A avaliação foi realizada após 24 h de incubação a $35 \pm 0,5$ °C e os resultados
1223 foram comparados aos resultados obtidos para os antibióticos. O delineamento
1224 experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento, os
1225 resultados expressos em milímetros (mm) pela média aritmética do diâmetro dos halos
1226 de inibição, formado ao redor dos discos e a avaliação estatística foi realizada pelo teste
1227 de Kruskal-Wallis, considerados como valores significativos quando o P foi menor que
1228 0,05.

1229

1230 *2.5 Controle de Infecção e Cicatrização em Ratos Wistar*

1231 O estudo de controle de infecção e cicatrização foi desenvolvido no Biotério da
1232 UFRPE e todos os protocolos obedeceram princípios éticos em experimentação animal,
1233 preconizados pela legislação brasileira de animais de experimentação (Lei Federal n°
1234 6.638 -1997). O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovação pela
1235 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFRPE, sub n° do processo
1236 23082.026191/2014-86.

1237 Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar,
1238 machos, adultos, com 90 dias e peso médio de 260g, adquiridos no Biotério da UFRPE.
1239 Os animais foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos com 5 animais cada,
1240 sendo dois Grupos Controle (GC): Grupo Controle positivo (GC+) em que foi utilizada
1241 enrofloxacina (5u/dia) e Grupo Controle negativo (GC-) onde foi utilizado o diluente do
1242 extrato; e dois Grupos Experimentais (GE): o Grupo Experimental I (GEI) com extrato
1243 de *P. guajava* (5u/dia) e Grupo Experimentação II sem tratamento (GEII). Foram
1244 identificados, marcados e pesados em balança eletrônica digital.

1245 Os animais foram anestesiados com hidrocloreto de quetamina (80mg/kg) e
1246 cloridrato de xilazina (20mg/kg). Após anestesia foram colocados sobre prancha
1247 cirúrgica em decúbito ventral. Inicialmente foi realizada a epilação por tração manual
1248 dos pêlos do dorso com extensão de 6 cm². Para realização do procedimento de remoção
1249 do epitélio foi utilizada lâmina de bisturi. Com a lâmina foi incisado um fragmento
1250 cutâneo de 1cm² de diâmetro na área epilada, até exposição da fáscia muscular dorsal. A
1251 hemostasia foi realizada por compressão digital, utilizando-se gaze (MIRRANDA,
1252 2001; GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006; SCHIRATO et al., 2006).

1253 Após procedimento, foi realizada a inoculação com a suspensão da estirpe *Sx*. Foi
1254 depositado 100 µL em cada ferida dos animais correspondentes aos seus grupos e
1255 acondicionados em gaiolas de acordo com seus respectivos grupos. A aplicação dos
1256 tratamentos foi realizada após 24 h de inoculação. Os tratamentos foram repetidos
1257 diariamente até completa cicatrização ou fechamento da ferida. Todos os ratos foram
1258 examinados diariamente quanto a sua mobilidade comparados aos dos grupos controle.
1259 Foi realizada avaliação macroscópica da ferida operatória, observando-se a presença ou
1260 ausência de secreção, cicatriz hipertrófica, crosta, necrose e tamanho da ferida residual,
1261 no maior e menor eixo, medidos com paquímetro. A eutanásia de 1 animal de cada

1262 grupo foi realizada nos dias 5, 10, 15, 20 e 25 contados a partir do início dos tratamento.
1263 No dia pré-estabelecido, os animais foram sacrificados, mediante dose excessiva de
1264 anestésico de quetamina (160 mg/kg), cloridrato de xilazina (40 mg/kg) e tiopental (160
1265 mg/kg).

1266 Após inoculados, os animais foram mantidos em biotério, sob condições
1267 controladas de luminosidade e umidade do ar, com água e ração *ad libitum*. Foram
1268 observados por 25 dias, sendo analisado o quadro de infecção local,
1269 macroscopicamente, através da detecção das características de edema.

1270 As lâminas para avaliação histológica foram preparadas a partir da excisão de 1
1271 cm² da ferida, a partir do centro da lesão, em profundidade até a fáscia muscular. Em
1272 seguida o material foi fixado em formol tamponado por 48 h, seccionado
1273 transversalmente, desidratado em álcool etílico (concentrações crescentes de 80, 90 e
1274 100% por 20 min cada), diafanizado pelo xilol por 30 min, impregnado e incluídos em
1275 parafina histológica. Após 24 horas, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo
1276 Minot (Leica RM 2035) ajustado para 10 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados
1277 em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa
1278 regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Os cortes
1279 foram corados pela técnica de Tricômico de Gomori e analisados em microscópio óptico
1280 de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS
1281 BX-50.

1282

1283 *2.5 Quantificação do Colágeno*

1284 As imagens das áreas de cicatrização, coradas pelo tricômico de Gomori, foram
1285 capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®]
1286 Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio

1287 de Histograma RGB (Red-Green-Blue), o qual se baseia na intensidade de
1288 luminescência onde os tons dos pixels da imagem variam de 0 a 255, sendo que o tom 0
1289 representa o escuro absoluto (menor luminescência), enquanto que o tom 255,
1290 representa o branco absoluto (maior luminescência) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE
1291 et al., 2001).

1292

1293 3. Resultados e Discussão

1294 3.1 Confirmação Morfológica e Resistência Microbiana das Estirpes

1295 O perfil morfológico das estirpes SsI, SsII, SsIII, SsIV e Sx foi confirmado como
1296 cocos Gram-positivo, células individuais, aos pares e com arranjo em aglomerados de
1297 células (Figura 1), como definido para o gênero (GOMES, 2008). A coloração de Gram
1298 específica para as estirpes de *Staphylococcus* (Gram-positivos em tonalidade azul-roxo)
1299 só foi conseguida neste trabalho após cultivo de reativação em ágar sal manitol por 24 h
1300 à 35 ± 2 °C em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand).

1301

1302

1303

1304

1305

1306

1307

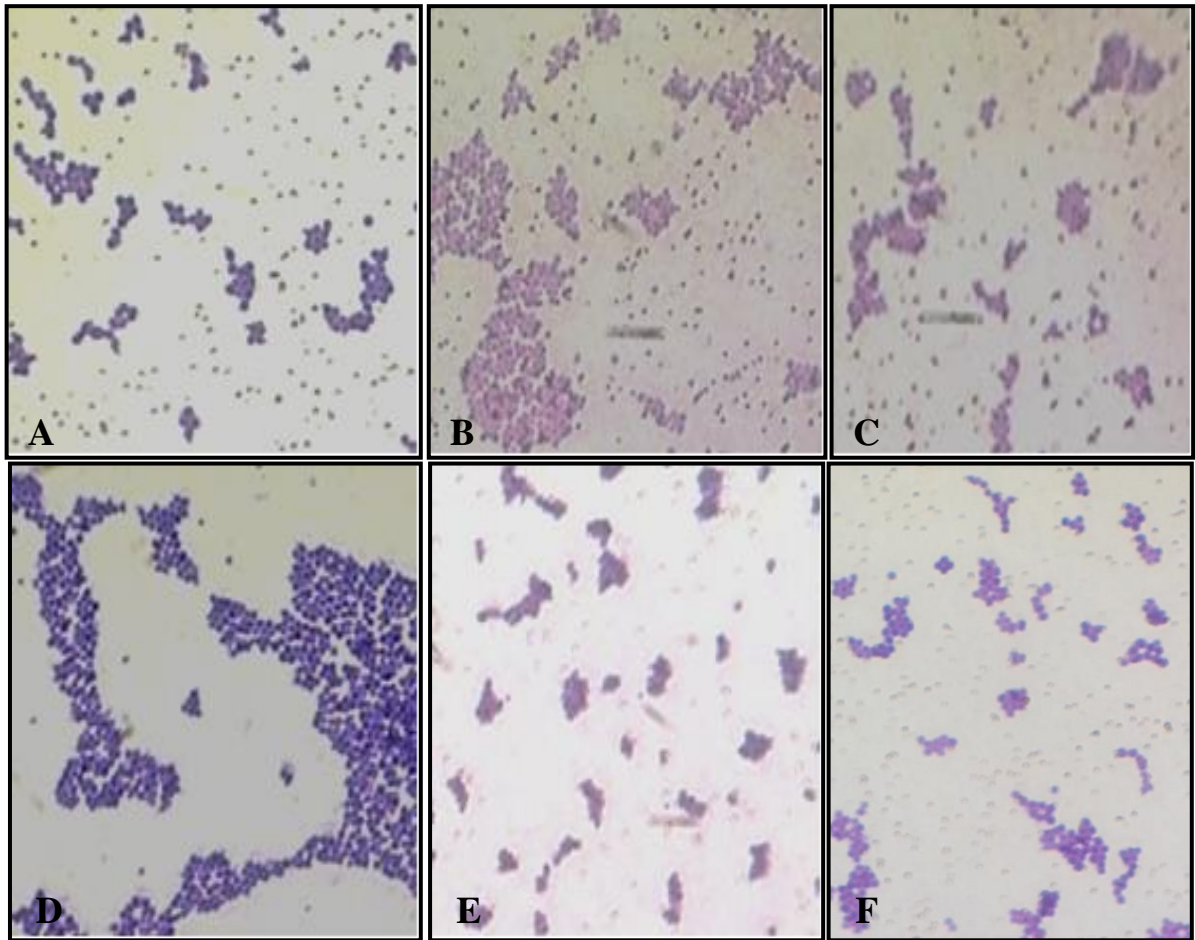
1308

1309

1310

1311

1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323



1324 **Figura 1:** Coloração de Gram das estirpes SsI (A), SsII (B), SsIII (C), SsIV (D), Sx (E) e
1325 *Sa* (F) de *Staphylococcus*.

1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335

Todas as estirpes foram confirmadas como resistentes à oxacilina no teste de antibiograma, no entanto, SsIII, notificada como resistente à penicilina segundo Batista et al. (2008), foi caracterizada, nesta pesquisa, como sensível, com halo de inibição de 30 mm para penicilina G (Tabela 1). Kuchenbecker et al. (2008), encontraram um percentual (30,2%) de cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina com número amostral de 88 cepas isoladas a partir de alimentos. Já pesquisas feitas por Júnior et al. (2013), obtiveram um percentual de 22,22% de 9 amostras de *S. aureus* sensíveis à oxacilina. Ambos os autores apontam os resultados como significativos para penicilina e oxacilina corroborando com os dados encontrados nesta pesquisa.

1336 As estirpes SsII, Sx e SsIV mostraram-se resistentes tanto à oxacilina quanto à
 1337 penicilina G, com halos de inibição que variaram de 0 a 17 mm para oxacilina e de 18 a
 1338 24 mm para penicilina G como mostrado na tabela 1. Esses resultados podem levar a
 1339 supor uma possível ativação da expressão gênica para conferir resistência à penicilina,
 1340 uma vez que, apesar de todas as estirpes apresentarem os genes *mecA*, *seg* e *seh* apenas
 1341 SsIII foi relatada como resistente à penicilina em trabalhos anteriores, tendo nesta
 1342 pesquisa um perfil de resistência definido para duas estirpes distintas.

1343
 1344 **Tabela 1:** Antibiograma das estirpes de *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus xylosus*
 1345 (24 h). ERI – Eritromicina; AMC – Ácido Clavulânico + Amoxicilina; PG – Penicilina
 1346 G; CIP – Ciprofloxacina; LVX – Levofloxacina; OXA – Oxacilina; CFL – Cefalotina;
 1347 IPM – Imipenem; NOR – Norofloxacina; GEN – Gentamicina. Padrão de Halos
 1348 preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2005).

Diâmetro dos Halos de Inibição (mm) em 24 h										
	ERI	AMC	PG	CIP	LVX	OXA	CFL	IPM	NOR	GEN
SsI	26s	35s	34s	23s	22s	17r	36,5s	39s	25s	25,5s
SsII	23s	23s	18r	24s	23s	0	24s	31s	23s	22s
Sx	17i	26s	20r	24s	24s	0	24s	30,5s	23s	23s
SsIII	29s	36s	30s	28s	27s	12r	35s	44,5s	24s	27s
SsIV	23s	32s	24r	24s	21s	11r	32s	37s	23s	22s

1349
 1350 r – resistente; s – sensível; i – intermediário.

1351
 1352 Dentre todos os microrganismos estudados Sx foi a que apresentou o mais amplo
 1353 perfil de resistência aos antibióticos utilizados na pesquisa. Essa estirpe mostrou-se
 1354 resistente à penicilina G, oxacilina e intermediária para eritromicina, um macrolídeo.
 1355 Esta estirpe foi selecionada para inoculação *in vivo* e desenvolvimento dos ensaios de

1356 controle de infecção em ratos uma vez que demonstrou perfil de resistência mais amplo
1357 aos antibióticos utilizados.

1358

1359 3.2 Atividade Antibacteriana do Extrato Etanólico de *P. guajava*

1360 Todos as estirpes bacterianas mostraram-se sensíveis ao extrato de *P. guajava* com
1361 valores de halo de inibição crescentes a partir de 22 mm (30 μ L) para o tratamento de 10
1362 μ L/mL, diferentemente dos resultados encontrados por Okamoto (2010), que obteve
1363 halos de inibição de 6 mm (5 μ L) e 9,5 mm (10 μ L) para o tratamento de 200 μ L/mL,
1364 mostrando valores de halo de inibição inferiores aos encontrados nesta pesquisa. É
1365 possível que esta diferença tenha si dado pela quantidade (μ L) do extrato usado para
1366 saturar os discos de papel de filtro, já que neste trabalho foram usados 30 μ L em
1367 comparação com 5 e 10 μ L utilizados no trabalho mencionado, uma vez que, quanto
1368 maior a quantidade de extrato no disco maior o halo de inibição bacteriana.

1369 O tratamento de 330 μ L/mL apresentou maior potencial antimicrobiano com
1370 valores de halo maiores em relação aos outros tratamentos, à exceção dos tratamentos de
1371 600 e 900 μ L/mL que foi inviável para uso *in vivo* devido à sua toxicidade (Tabela 2).

1372

1373

1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

1381 **Tabela 2.** Atividade antiestafilocócica do extrato etanólico de *Psidium guajava* L. (24 h)

Tratamentos do extrato etanólico ($\mu\text{L}/\text{mL}$) / diâmetro dos halos de inibição (mm)										
	10	50	120	210	330	400	480	530	650	900
SsI	22,6	23,6	26,6	28,3	29,6	28	29,3	29	29	30,6
SsII	22,5	24	27,6	28	30,6	28,3	28,6	29	29	30,3
Sx	22,6	23,6	28	28,6	29,3	27,3	29,3	29	30	30,3
SsIII	23	23,5	23	26	29,5	27,3	28,3	29	29,3	29,6
SsIV	22	22,6	25	27,3	29	28,6	29	28,6	29	29,6

1382

1383 Menezes (2013) obteve halos de inibição para *S. aureus* com extrato hidroalcoólico
1384 das folhas de *P. guajava* que variam entre 13 e 28 mm, com tratamentos de 400 e 800
1385 $\mu\text{L}/\text{mL}$, resultados muito semelhantes aos do presente estudo onde foram obtidos halos
1386 entre 22 e 30,6 mm. Foi verificado ainda por este autor sensibilidade para todos os
1387 isolados estudados como ocorrido nesta pesquisa.

1388 É provável que, assim como os antimicrobianos sintéticos, que atuam interferindo
1389 nos processos metabólicos ou nas estruturas dos microrganismos como na síntese da
1390 parede celular, em alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, na
1391 replicação do cromossomo e na síntese proteica (TENOVER, 2006), os antibióticos de
1392 origem vegetal também exercerem mecanismos de interferência semelhantes. De acordo
1393 com Gutierrez et al. (2008), estudos com extratos metanólicos de folhas e raízes de *P.*
1394 *guajava* mostram que a quercetina, um flavonóide presente nestes órgãos, é o
1395 fitoconstituente responsável por exercer atividade antibacteriana.

1396 É possível ser verificado, a partir dos dados encontrados, que a ação inibitória do
1397 crescimento microbiano aumenta com o aumento de concentração do extrato

1398 (tratamentos) até 330 µL/mL. A partir do tratamento de 400 µL/mL há um redução da
1399 atividade inibitória do crescimento microbiano para todas as estirpes testes (Tabela 2). Os
1400 valores de halo de inibição encontrados entre os tratamentos 530 µL/mL e 650 µL/mL
1401 são estatisticamente insignificantes e não diferem entre si quanto à atividade
1402 antimicrobiana.

1403 Observou-se que, o aumento na concentração dos tratamentos gerou maior inibição
1404 de crescimento das estirpes estudadas, como se esperava, à exceção dos valores
1405 encontrados entre o intervalo de tratamento 530 µL/mL e 650 µL/mL. O melhor valor
1406 observado foi verificado para a estirpe SsI com média de halo de inibição de 30,6 mm
1407 com tratamento de 900 µL/mL.

1408 Na figura 2 é possível estabelecer uma relação entre os resultados obtidos no teste
1409 de antibiograma e atividade antimicrobiana para a estirpe Sx, em que, apenas o halo de
1410 inibição para o Imipenem foi maior que todos os resultados verificados para o extrato,
1411 independente do tratamento. A exceção do Imipenem todos os outros antibióticos
1412 apresentaram valores de halo de inibição inferiores aos tratamentos utilizados acima de
1413 50 µL/mL, sugerindo melhor eficiência do extrato em inibir o crescimento deste
1414 microrganismo *in vitro*.

1415 De acordo com Chambers (1997), os antimicrobianos β-lactâmicos se ligam a
1416 proteínas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs (proteínas
1417 ligadoras de penicilina), impedindo a formação da parede celular, resultando em lise
1418 bacteriana e morte do microrganismo. O mecanismo de resistência a oxacilina está
1419 relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que é plenamente
1420 funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos. A codificação
1421 dessas novas PBPs, tornando esses patógenos resistentes a oxacilina, está relacionada à
1422 aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em

1423 isolados com perfil de resistência aos β -lactâmicos. Neste sentido, pode-se sugerir que o
1424 alvo molecular para inativação ou degradação do microrganismo pelos fitoconstituintes
1425 majoritários de *P. guajava* (taninos e flavonóides) não é a parede celular, uma vez que, os
1426 resultados demonstraram que as estirpes foram sensíveis ao extrato e resistentes à
1427 oxacilina e penicilina G, ambos antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos.

1428 Mesmo com o tratamento de 10 μ L/mL (menor concentração do extrato), foi
1429 possível verificar inibição do crescimento bacteriano diferentemente dos valores
1430 encontrados para penicilina G e oxacilina para os quais a estirpe foi relatada como
1431 resistente.

1432

1433

1434

1435

1436

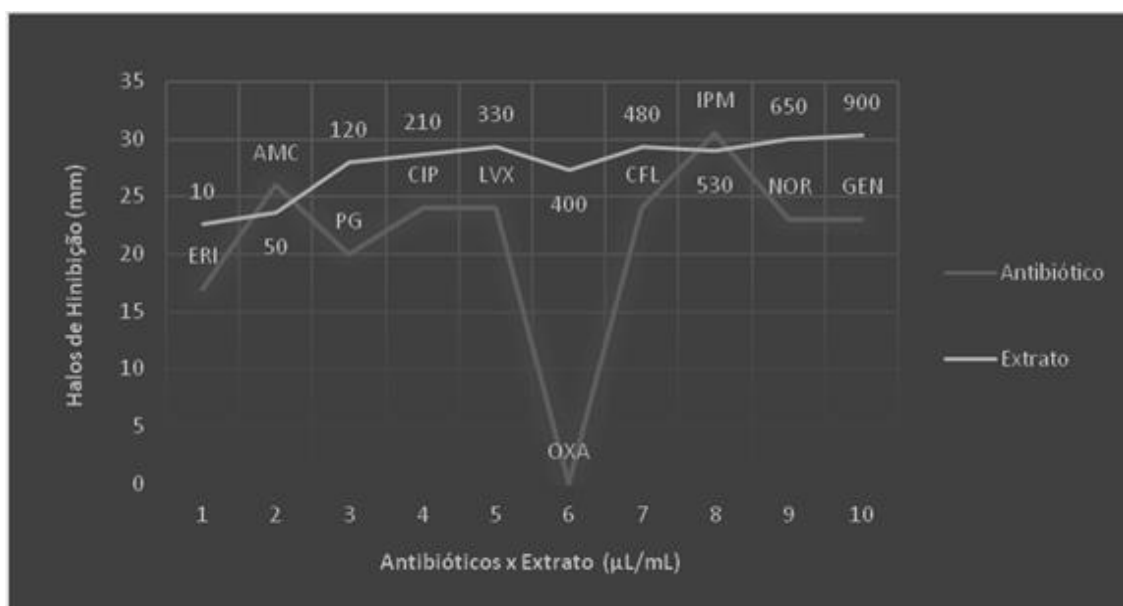
1437

1438

1439

1440

1441



1442 **Figura 2.** Relação entre os resultados obtidos para o teste de antibiograma e atividade
1443 antimicrobiana da estirpe Sx. ERI – Eritromicina; AMC – Ácido Clavulânico +
1444 Amoxicilina; PG – Penicilina G; CIP – Ciprofloxacina; LVX – Levofloxacina; OXA –
1445 Oxacilina; CFL – Cefalotina; IPM – Imipenem; NOR – Norofloxacina; GEN –
1446 Gentamicina.

1447

1448 Os dados obtidos a partir do teste de Kruskal-Wallis demonstraram diferenças
1449 significativas entre os tratamentos de 10-900 μ L/mL para todas as estirpes a exceção da
1450 estirpe SsIII com valores de $p = 0,015, 0,005, 0,015, 0,002$ respectivamente, e 10-300

1451 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para a estirpe SsII com $p = 0,005$. Não houve diferença significativa entre os
1452 tratamentos para a estirpe SsIII.

1453 Gonçaves et al. (2005), também estimaram a resistência e sensibilidade, tanto
1454 para antibióticos comerciais quanto para o extrato de *P. guajava*, e demonstraram que
1455 estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativo foram resistentes ao extrato e aos
1456 antibióticos penicilina e sulfazotrim, mantendo uma correlação com os resultados da
1457 presente pesquisa apenas para o antibiótico penicilina, pois, todas as estirpes tiveram
1458 seu crescimento inibido com o extrato.

1459 São escassos os trabalhos que identificam quais fitoconstituente de *P. guajava*
1460 exercem atividade antibacteriana, no entanto, várias pesquisas já identificaram
1461 princípios ativos de órgãos desta planta que, por serem os compostos majoritários de
1462 órgãos específicos, podem ser apontados como os responsáveis por essa atividade
1463 biológica. Segundo Pino et al. (2001), os principais constituintes dos óleos voláteis das
1464 folhas de *P. guajava* (órgão utilizado para extração do extrato nesta pesquisa), são β -
1465 cariofileno (21,6%), (E)-nerolidol (19,2%) e selin-11-en-4 α -ol (13,4%), ainda de acordo
1466 com Domingos et al. (2003), os principais constituintes de óleo essencial de folhas e
1467 caules de *P. guajava* são α -pineno (23,9%), 1,8-cineol (21,4%) e β -bisabolol (9,2%).

1468 Almeida et al. (2006), descreveram outras atividades terapêuticas atribuídas à
1469 flavonóides como quercetina, canferol e miricetina obtidos da infusão de folhas de *P.*
1470 *guajava*. Arima e Danno (2002) identificaram e definiram a estrutura química de quatro
1471 componentes antibacterianos das folhas de *P. guajava* sendo dois novos glicosídeos
1472 flavonóides, morin-3-o- α -L-lixopiranosídeo e morin-3-o- α -L-arabopiranosídeo, e dois
1473 flavonóides já conhecidos, guaijavarina e quercetina, no entanto, a atividade
1474 antimicrobiana foi testada para *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*, dois

1475 microrganismos bacilares, um Gram-negativo e outro Gram-positivo, respectivamente,
1476 diferindo dos microrganismos deste estudo.

1477 Araújo (2010), em testes com cepa padrão obteve halos de inibição para *S. aureus*
1478 ATCC 6538 de 10 mm com tratamento de 500 µL/m, enquanto neste trabalho foram
1479 obtidos halos de 29 mm para as estirpes SsI, II, III e Sx e 28,6 mm para a estirpe SsIV.
1480 Diferenças significativas como essas podem ocorrer devida a fatores múltiplos como
1481 estirpe/espécie, órgão utilizado para obtenção do extrato, período de coleta do vegetal,
1482 extrator e diluente.

1483

1484 3.3 Teste de Toxicidade com *Artemia salina*

1485 Os dados mostraram uma taxa (%) média de mortalidade de 39,66%, valor abaixo
1486 para dose DL50 que corresponde a uma taxa de 50% de morte. Porém nos tratamentos de
1487 650 µL/mL e 900 µL/mL, os dois últimos maiores valores para os tratamentos utilizados
1488 nesta pesquisa, as taxas de morte foram respectivamente 57,1%, e 54,5% valores acima
1489 DL50 (Figura 3). Portanto, os tratamentos considerados tóxicos na presente pesquisa
1490 foram os de 650 µL/mL e 900 µL/mL, sendo descartados para uso *in vivo*. Os demais
1491 tratamentos não apresentaram toxicidade verificada no teste com cistos de *A. salina*.

1492

1493

1494

1495

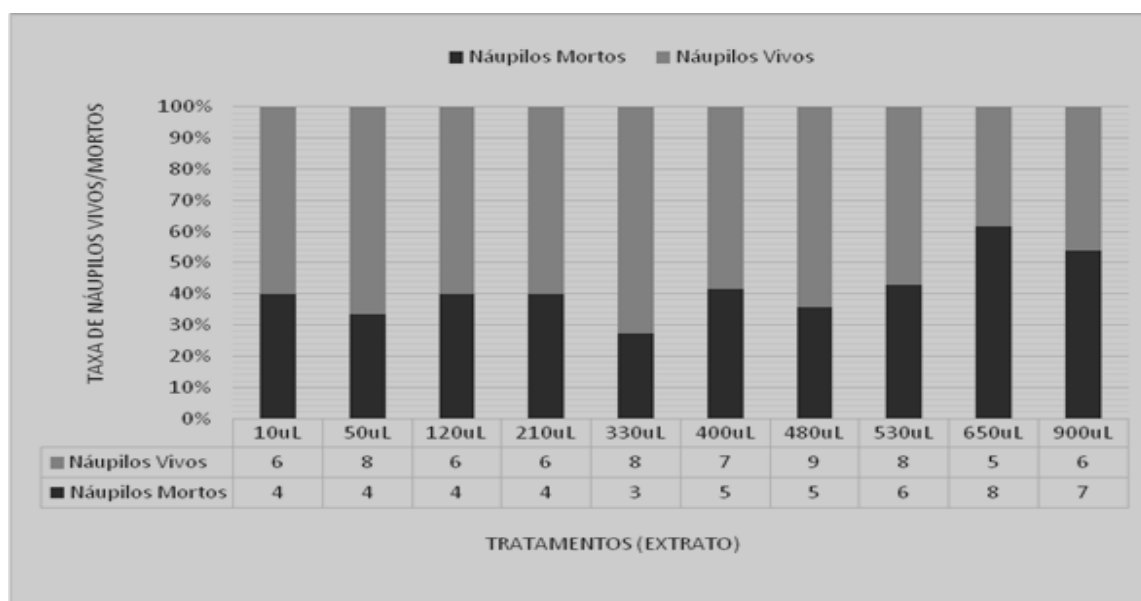
1496

1497

1498

1499

1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509



1510
1511
1512
1513

Figura 3: Teste de toxicidade (DL-50) com cistos de *Artemia salina* (24h).

3.4 Avaliação macroscópica dos ferimentos

1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521

Não foi verificada nenhuma mudança no comportamento dos animais durante a realização dos experimentos. Após efeito dos anestésicos os animais apresentaram comportamento equivalente ao percebido antes dos procedimentos realizados nos testes. A avaliação macroscópica dos ferimentos provocados no dorso dos animais, após 24 h de inoculação com as suspensões das estirpes, não apresentou sinais indicativos de infecção, não foi observado nos animais dos 4 grupos secreção purulenta. Após 24 h de inoculação com as suspensões das estirpes nenhum dos animais dos 4 grupos estudados apresentaram secreção purulenta.

1522
1523
1524
1525
1526

A terapêutica de feridas é uma constante preocupação clínica, pois ainda é um desafio cuidar de lesões cutâneas com os recursos atuais existentes. Apesar dos avanços tecnológicos, poucos têm acesso, devido ao alto custo e à limitação aos grandes centros urbanos (LIMA; GUERRA, 2011). Estudos mostram que a utilização de plantas torna-se uma necessidade para a ampliação do arsenal terapêutico nessa área e na redução dos

1527 recursos dispensados para o tratamento (MAJEWSKA; GENDASZEWSKA-
1528 DARMACH, 2011).

1529 Neste estudo a avaliação dos ferimentos nos primeiros cinco dias apresentou rápida
1530 evolução para fechamento das feridas nos animais do GEI, com lesões secas, sem formação de
1531 secreção purulenta, coagulação inicial de sangue com formação de crosta, como pode ser
1532 verificado na figura 4b. Resultados diferentes foram percebidos para os animais dos demais
1533 grupos, em que, o progresso de cicatrização foi considerado lento, em comparação com os ratos
1534 do GEI, com ferimento ainda com sangramento, principalmente para os ratos do grupo 2
1535 (Figura 4c), edema e sem retração. Em animais de pele menos aderida aos planos profundos
1536 (como os ratos), a contração pode chegar de 80 a 90% de fechamento das lesões cutânea.

1537 A análise macroscópica das lesões então permite inferir que os animais do grupo tratado
1538 com o extrato de *P. guajava* apresentou melhores resultados, comparado aos demais grupos,
1539 inclusive ao grupo GC+. Mesmo não ocorrendo infecção esperada (com a inoculação do
1540 patógeno) é possível deduzir que estes resultados tenham sido possíveis devido às menores
1541 reações derivadas do processo inflamatório que são mecanismos naturais em lesões. Ainda
1542 assim, uma elevada atividade inflamatória é prejudicial podendo haver comprometimento da
1543 microcirculação e inibir a formação de fibroblastos (LUCENA et al., 2006).

1544

1545

1546

1547

1548

1549

1550

1551

1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577

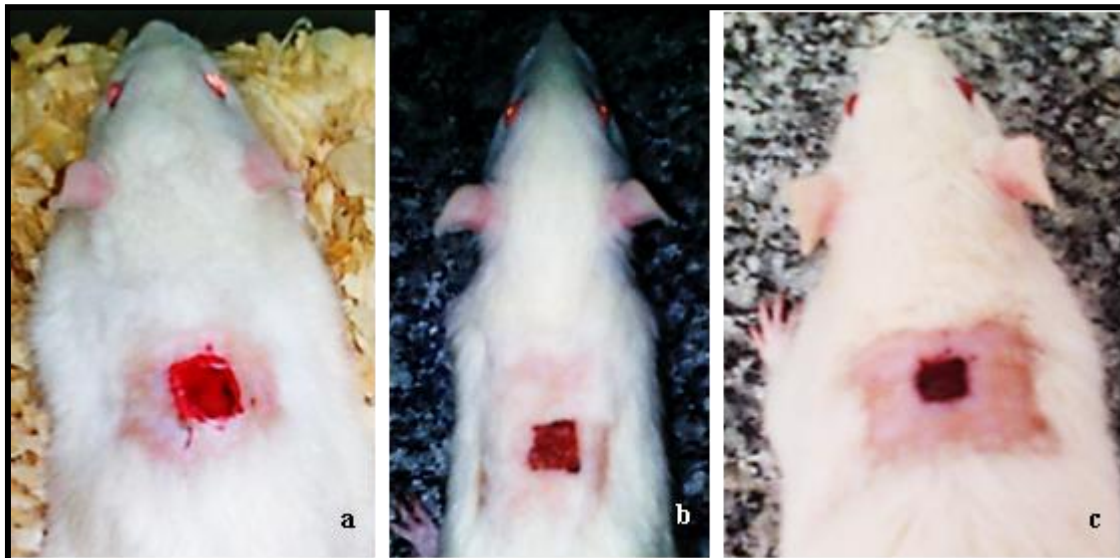
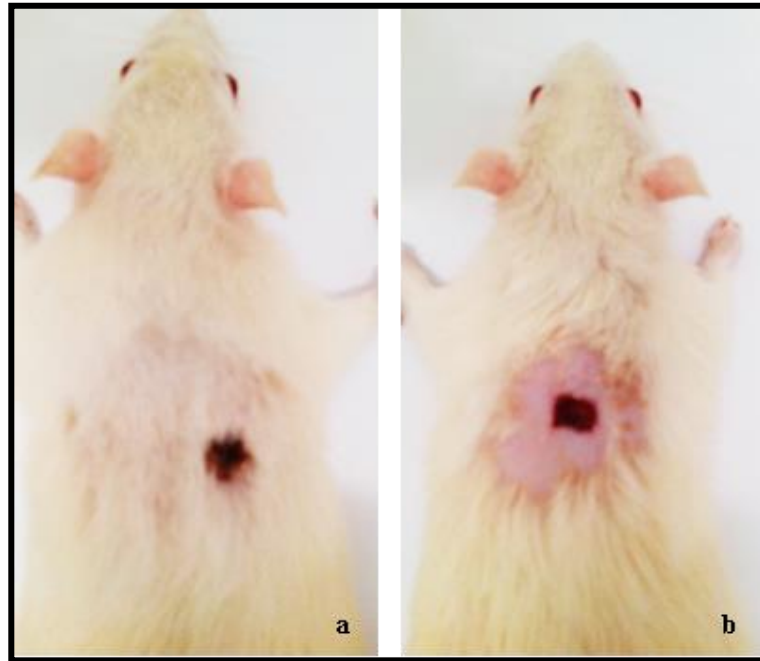


Figura 4: Formação de crosta nos ferimentos em ratos dos diferentes grupos. a – grupo 1, pós trauma; b – grupo 1, 1º dia; c – grupo 2, 1º dia.

Ao terceiro dia de avaliação o progresso de cicatrização foi considerado muito avançado para todos os animais do GEI em relação aos ratos dos demais grupos. No quinto dia de avaliação foi verificada uma diferença significativa no processo macroscópico de cicatrização para os animais do grupo 1 em relação aos animais dos demais grupos. Pode ser verificado na figura 5a retração do ferimento completamente coberto por uma crosta de aspecto rígido resultado da coagulação sanguínea no local do ferimento enquanto na figura 5b pode ainda ser notada a presença de sangue, sem retração aparente e bordas de ferimento indicando edema.

Segundo autores a estabilidade dos constituintes de flavonóides totais das folhas de *P. guajava* na composição do produto obtido de extrato vegetal é importante para a ação anti-inflamatória e cicatrizante de compostos a serem testado (SILVA et al., 2002; MILTERSTEINER et al., 2003).

1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592



1593 **Figura 5:** Avaliação macroscópica dos ferimentos e processo de cicatrização ao quinto
1594 dia de avaliação. **a** –grupo 1(extrato); **b** grupo 2 (antibiótico).

1595

1596 Todos os animais do GC+ apresentaram diarreia durante o tratamento com o
1597 antibiótico. É possível afirmar que o estado diarreico dos animais tenha sido provocado
1598 pelo uso do antibiótico Chemitril® uma vez que, os mesmos sintomas não foram
1599 percebidos para os animais dos demais grupos.

1600

1601 *3.5 Avaliação Histoquímica do Processo de Cicatrização*

1602 A análise histoquímica nas áreas de cicatrização dos animais dos grupos extrato e
1603 antibiótico apresentaram reepitelização da epiderme e uma derme com presença de
1604 fibras colágenas espessas. Já nas áreas de cicatrização dos animais dos grupos álcool e
1605 placebo apresentaram derme com fibras colágenas mais delgadas. Além disso, neste
1606 último grupo, não foi evidenciado processo de reepitelização (Figura 6A-6D). A
1607 quantificação em pixels do teor de colágeno não revelou diferenças significativas dos
1608 pixels entre as áreas de cicatrização dos animais dos grupos extrato e antibiótico, porém

1609 estes grupos apresentaram os menores valores, diferindo significativamente dos grupos
1610 álcool e placebo, os quais não diferiram entre si (Figura 7).

1611 O colágeno é o componente mais abundante da matriz extracelular que promove a
1612 resistência tênsil da pele (CUTTLE et al., 2004; BRINK et al., 2005). A neoformação e
1613 deposição desta fibra exercem papel importante na resposta de cicatrização, uma vez
1614 que a modulação da migração e proliferação celular garante a eficácia do processo de
1615 reparo (CUTTLE et al., 2004). Assim, quanto mais fibras colágenas (fibras colágenas
1616 espessas), maior resistência tênsil e, portanto, reparo tecidual mais eficiente. Estes
1617 resultados foram obtidos para os animais do grupo GEI em comparação com os grupos
1618 controle + e placebo.

1619

1620

1621

1622

1623

1624

1625

1626

1627

1628

1629

1630

1631

1632

1633

1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664

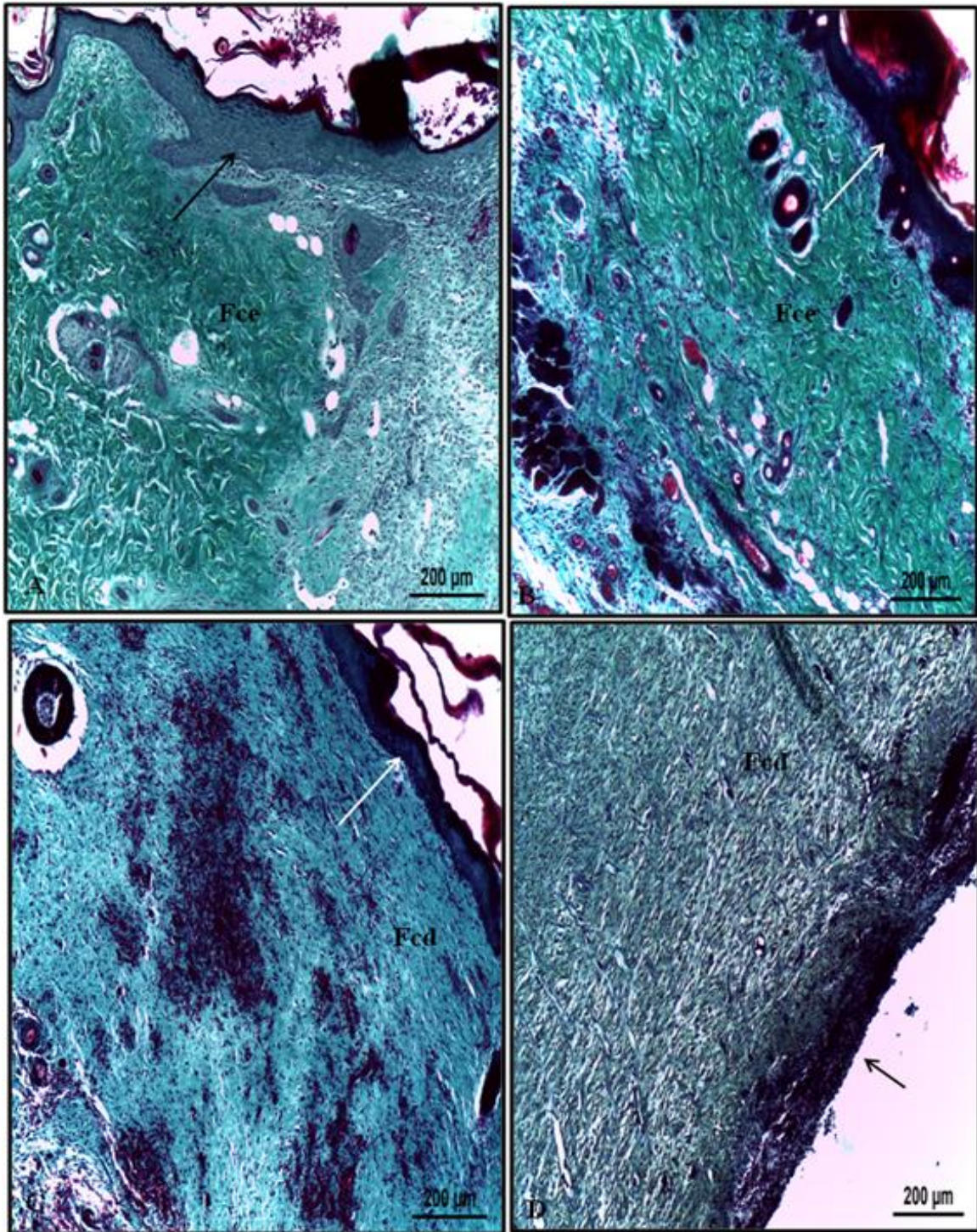


Figura 6: Fragmentos das áreas de cicatrização dos animais dos grupos experimentais. Notar na derme, a presença de fibras colágenas mais espessas em A (Extrato) e B (Antibiótico). Em C (Álcool) e D (Placebo) a derme apresenta-se com grande teor de fibras colágenas delgadas. Notar ainda ausência de epiderme neste último grupo. Epiderme - setas longas; Fibras colágenas espessas - Fce; Fibras colágenas delgadas; Ausência de epiderme - seta curta. Coloração Tricrômico de Gomori.

1665 Broughton (2006), afirma que a deposição de colágeno é a característica
1666 clinicamente mais importante da fase de remodelação, a última fase da cicatrização. O
1667 colágeno produzido inicialmente (colágeno tipo III) é mais fino do que o colágeno
1668 presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. O colágeno inicial é
1669 reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e depositado ao longo das linhas
1670 de tensão com o decorrer do tempo o que significa maior força tênsil da ferida, como
1671 observado na figura 6a que representa o grupo GEI. Mesmo após um longo período de
1672 tempo a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele original, e a
1673 força tênsil jamais será a mesma, atingindo uma eficiência em torno de 80% após três
1674 meses de reconstituição (Broughton, 2006).

1675

1676

1677

1678

1679

1680

1681

1682

1683

1684

1685

1686

1687

1688

1689

1690

1691

1692

1693

1694

1695

1696

1697

1698

1699

1700

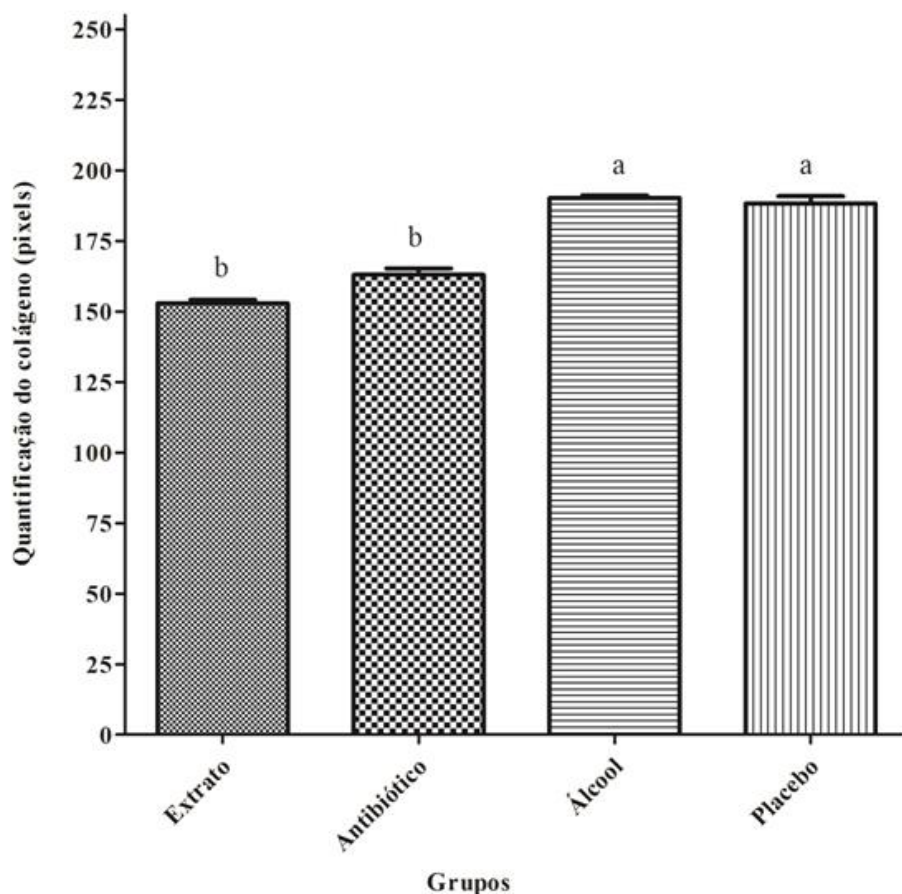


Figura 7: Quantificação em pixels do teor de colágeno. Notar redução significativa dos pixels entre os grupos extrato e antibiótico e em relação aos outros. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

1701 Diante dos resultados, conclui-se que o extrato etanólico de folhas de *P. guajava*,
1702 demonstrou ser eficiente na inibição do crescimento de estirpes *Staphylococcus* spp. *in*
1703 *vitro*, além de promover mais rapidamente o processo de cicatrização. Entretanto, há
1704 necessidade de mais estudos no sentido de avaliar fitoquimicamente a espécie vegetal a
1705 fim de constatar os seus compostos majoritários e testar suas atividades biológicas,
1706 farmacológicas e/ou tóxicas.
1707

1708 4. Referências

- 1709 ACAMPORA, A. J.; TRAMONTE, R.; BÜRGER, D.; BÜRGER, P. J. Efeitos da
1710 quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos**
1711 **Catarinenses de Medicina**, v. 36, p. 69-75, 2007.
- 1712 ALMEIDA, K. C.; BARBOSA, T. R.; SILVA, R. N. R. da; JACQUES, D. da S.;
1713 FREIRE, R. B. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae).
1714 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 87, p. 60-62, 2006.
- 1715 ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação n vitro da atividade antimicrobiana de extratos**
1716 **vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 2010. 100p.
1717 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Belém.
- 1718 ARIMA, H.; DANNO, G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium*
1719 *guajava* L.) and their structural elucidation. **Bioscience, Biotechnology, and**
1720 **Biochemistry**, v. 66, p. 1727-1730, 2002.
- 1721 ANDOĞAN B. C.; BAYDAR H.; KAYA S.; DEMIRCI M; ÖZBAŞAR D.; MUMCU
1722 E. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils.
1723 **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, p.860-864, 2002.
- 1724 BATISTA J. E.; FERREIRA E L.; NASCIMENTO D. C.; VENTURA R. F.;
1725 OLIVEIRA W. L.; LEAL N C.; LIMA-FILHO J. V. Antimicrobial resistance and
1726 detection of the *mecA* gene besides enterotoxin-encoding genes among coagulase-
1727 negative Staphylococci isolated from clam meat of *Anomalocardia brasiliana*.
1728 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 1044-1049, 2013.
- 1729 BINGEL, S. A. Pathology of a mouse model of x-linked chronic granulomatous disease.
1730 **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 41, p. 33–38, 2002.
- 1731 BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro:
1732 Guanabara Koogan, 2002, 856p.
- 1733 CARVALHO, A. A. T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; MELO, A. F. M.;
1734 SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; HIGINO, J. S. Atividade *in vitro* de extratos
1735 hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-Negativas. **Acta**
1736 **Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, p. 255-258, 2002.
- 1737 CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical
1738 basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 781-791,
1739 1997.
- 1740 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial*
1741 *Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S15
1742 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley
1743 Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
- 1744 CLSI publication M100-S20 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial
1745 Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious
1746 Organisms by Clinical Laboratories, 2010.

- 1747 SILVA, J. D.; LUZ, A. I. R.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. G. B.;
 1748 MAIA, J. G. S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium guajava* spp.
 1749 **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 240-243, 2003.
- 1750 FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 198p.
- 1751 GOMES M. J. P. 2013. **Gênero *Staphylococcus* spp.** Disponível em:
 1752 [http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-](http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf)
 1753 2013-1.pdf. Acesso em: 18 nov. 2015.
- 1754 GONÇALVES, A.; ALVES, F. A.; MENEZES, H. Estudo comparativa da atividade
 1755 antimicrobiana de extrato de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**,
 1756 v. 72, p. 353-358, 2005.
- 1757 GUTIERREZ, R. M.; MITCHEL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its
 1758 traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**,
 1759 v. 117, p. 1-27, 2008.
- 1760 HANBERGER, H.; DIEKEMA, D.; FLUIT, A.; JONES, R.; STRUELENS, M.;
 1761 SPENCER, R.; WOLFF, M. Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs.
 1762 **Journal of Hospital Infection**, v. 48, p. 161-176, 2001.
- 1763 HEDIN, G.; WIDERSTROM, M. Endocarditis due to *Staphylococcus sciuri*. **European**
 1764 **Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 17, p. 673-675, 1998.
- 1765 JACKSON, S. H.; MILLER, G. F.; SEGAL, B. H.; MARDINEY, M.; 3rd,
 1766 DOMACHOWSKIE, J. B.; GALLIN, J. I.; HOLLAND, S. M.; 2001. IFN γ is effective in
 1767 reducing infections in the mouse model of chronic granulomatous disease (CGD).
 1768 **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, p. 567-573, 2001.
- 1769 JÚNIOR, J. D. P.; GONÇALVES, J. C.; TINOCO, A. L. A.; COELHO, R. O.; PERON,
 1770 G. R. Identificação e perfil de sensibilidade de bactérias em garrotes de uso hospitalar.
 1771 **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 269-273, 2013.
- 1772 KOKSAL F, YASAR H, SAMASTI M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-
 1773 negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in
 1774 Turkey. **Microbiological Research**, v. 164, p. 404-410, 2009.
- 1775 KUCHENBECKER, B. S.; RIBEIRO, A. R.; CARDOSO, M. Perfil de resistência de
 1776 *Staphylococcus aureus* obtidos de produtos de origem animal analisados pelo Serviço
 1777 de Inspeção Federal do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37: p. 143-149, 2009.
- 1778 LIMA, A. C. B.; GUERRA, D. M. Avaliação do custo do tratamento de úlceras por
 1779 pressão em pacientes hospitalizados usando curativos industrializados. **Ciência &**
 1780 **Saúde Coletiva**, v. 16: p. 267-77, 2011.
- 1781 LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A.
 1782 Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para
 1783 avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Horizonte Científico**,
 1784 v. 1, p. 1-11, 2002.

- 1785 LUCENA, P. L. H.; FILHO, J. M. R.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.;
1786 Mario NETO, A. C.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE,
1787 E. S. Evaluation of the areira (Schinus terebinthifolius Raddi) in the healing process
1788 of surgical incision in the bladder of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 46-51,
1789 2006.
- 1790 MAJEWSKA, I.; GENDASZEWSKA-DARMACH, E. Proangiogenic activity of plant
1791 extracts in accelerating wound healing – a new face of old phytomedicines. **Acta**
1792 **Biochimica Polonica**, v. 58, p. 449-60, 2011.
- 1793 MENEZES, J. S. **Ação antimicrobiana in vitro de Psidium guajava L. contra**
1794 **Staphylococcus aureus isolados de leite mastítico**. 2013. 64p. Dissertação (Mestrado)
1795 – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas.
- 1796 MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; FILHO, N. P.; FROTA, A. R.; ELY, P.
1797 B.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Uso de quercetina a longo
1798 prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 232-237, 2003.
- 1799 NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI,
1800 S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and
1801 human skin. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 245–250, 2002.
- 1802 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Padronização dos
1803 testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada – Oitava
1804 Edição. Documento M2-A8, National Committee for Clinical Laboratory Standards,
1805 Pennsylvania, v. 23, n. 1, 2003, p. 58.
- 1806 OBERHOLZER, M.; ÖSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRÜHIMANN, M.
1807 Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, p.
1808 333-345, 1996.
- 1809 OKAMOTO M. K. H. **Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do**
1810 **extrato glicólico e do gel de Psidium guajava L. e estudo da estabilidade do gel**.
1811 2010. 118p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- 1812 PLANCHON, S.; GAILLARD-MARTINIE, B.; DORDET-FRISONI, E.; BELLON-
1813 FONTAINE, MN.; LEROY, S.; LABADIE, J.; HÉBRAUD, M.; TALON, R. 2006.
1814 Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. **International Journal of Food**
1815 **Microbiology**, v. 109, p. 88–96, 2006.
- 1816 PINOA, J. A.; AGÜEROB, J.; MARBOTC, R.; FUENTESD, V. Leaf oil of *Psidium*
1817 *guajava* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 61-6, 2001.
- 1818 SHITTU, A.J.; LIN, J.; MORRISON, D.; KOLAWOLE, D. Isolation and molecular
1819 characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *staphylococcus*
1820 *haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. **Journal of Medical**
1821 **Microbiology**, v. 53, p. 51-55, 2004.
- 1822 SCHUCH, L. F.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S.; PRESTES, L. S.; TONI, L. D.;
1823 LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a
1824 micro-organismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p.
1825 161-169, 2008.

- 1826 SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonóides
1827 no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, v. 35, p. 127-133, 2002.
- 1828 TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American**
1829 **Journal of Medicine**, v. 119: p. 3-10, 2006.
- 1830 VIEIRA, R. H.; RODRIGUES, D. P.; GONÇALVES, F. A.; MENEZES, F. G.;
1831 ARAGÃO, J. S.; SOUSA, O. V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts
1832 (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon bacteria isolated from fish
1833 muscle and known to induce diarrhea in children. **Revista do Instituto de Medicina**
1834 **Tropical**, v. 43, p. 145-148, 2001.