

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 04/12/2027.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RAQUEL TELES DE MENEZES

**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EFEITO
ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E
CASCA DE ROMÃ ISOLADOS E COMBINADOS FRENTE CEPAS
MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii* E
*Pseudomonas aeruginosa***

RAQUEL TELES DE MENEZES

**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EFEITO ANTIMICROBIANO DOS
EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E CASCA DE ROMÃ ISOLADOS E
COMBINADOS FRENTE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter
baumannii* E *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2026]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Menezes, Raquel Teles de

Citotoxicidade, genotoxicidade e efeito antimicrobiano dos extratos de própolis verde e casca de romã isolados e combinados frente cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* / Raquel Teles de Menezes. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.

95 f. : il.

Tese (doutorado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Sinergismo. 4. Biofilme. 5. Citotoxicidade. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Em decorrência da crescente prevalência de microrganismos multirresistentes a antimicrobianos, associada ao aumento da mortalidade ocasionada por infecções oportunistas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma lista de patógenos críticos prioritários que demandam o desenvolvimento urgente de novas estratégias terapêuticas. Entre os microrganismos de maior relevância clínica, destacam-se *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse cenário, a fitoterapia desponta como uma abordagem terapêutica promissora, em virtude de suas propriedades farmacológicas amplamente descritas na literatura, incluindo atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-biofilme e antitumoral. A investigação da atividade antibacteriana de extratos de origem vegetal apresenta-se como um campo de elevada importância, uma vez que pode subsidiar o desenvolvimento de formulações inovadoras e/ou integrativas aplicáveis à terapêutica clínica. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram efeitos significativos dos extratos hidroalcoólicos de própolis verde e casca de romã contra cepas clínicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, evidenciando não apenas atividade antibacteriana e antibiofilme relevantes, mas também pronunciada ação antioxidante. Ademais, verificou-se ausência de citotoxicidade e genotoxicidade nas concentrações avaliadas, reforçando o potencial desses compostos naturais como candidatos a futuras alternativas terapêuticas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Due to the growing prevalence of multidrug-resistant microorganisms, coupled with increased mortality from opportunistic infections, the World Health Organization (WHO) has established a list of priority critical pathogens that require the urgent development of new therapeutic strategies. Among the most clinically relevant microorganisms are Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. In this scenario, phytotherapy emerges as a promising therapeutic approach due to its pharmacological properties, which are widely described in the literature, including anti-inflammatory, antimicrobial, anti-biofilm, and antitumor activities. Research into

the antibacterial activity of plant extracts is a highly important field, as it can support the development of innovative and/or integrative formulations applicable to clinical therapy. The results obtained in the present study demonstrate significant effects of hydroalcoholic extracts of green propolis and pomegranate peel against clinical strains of A. baumannii and P. aeruginosa, evidencing not only relevant antibacterial and antibiofilm activity, but also pronounced antioxidant action. Furthermore, there was an absence of cytotoxicity and genotoxicity at the evaluated concentrations, reinforcing the potential of these natural compounds as candidates for future therapeutic alternatives.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento Biociências e Diagnóstico Bucal

Profa. Dra. Adeline Lacerda Jorjão

Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN)

Campus de São Paulo

Prof. Dr. Jonâtas Rafael de Oliveira

Universidade Anhembi Morumbi

Curso de Medicina

Profa. Dra. Camilla Magnoni Moretto Nunes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento Biociências e Diagnóstico Bucal

Profa. Dra. Karen Cristina Kazue Yui

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento Odontologia Social e Clínica Infantil

São José dos Campos, 04 de Dezembro de 2025.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, antes de tudo, a **Deus**, fonte de vida, sabedoria e esperança, por me conceder forças nos momentos em que o caminho parecia pesado demais, por iluminar meus passos e renovar minha fé diante das incertezas.*

*Aos meus pais, **Francisco e Edinelsa**, que me ensinaram que a educação é o maior legado que alguém pode deixar, que me mostraram na prática o valor do esforço, da disciplina e da honestidade, e que sempre estiveram presentes, mesmo nos momentos em que a distância e o tempo se fizeram barreiras. À minha mãe, pela ternura que sempre foi meu abrigo e pela paciência infinita diante da minha ausência. Ao meu pai, pelo exemplo de força e pela confiança inabalável no meu potencial, mesmo quando eu mesma duvidava. Ao meu irmão **Lucas**, esta conquista também é sua, pois o amor e a confiança que sempre demonstrou me ajudaram a chegar até aqui.*

*Ao meu **marido e companheiro de vida Kaique**, dedico este sonho que agora se torna realidade. Obrigada por ter caminhado ao meu lado, suportando a rotina intensa, as noites de estudo, a ansiedade e as renúncias que este percurso exigiu. Sua compreensão, carinho e amor foram fundamentais para que eu não desistisse e seguisse em frente com coragem.*

*Dedico também aos meus **familiares e amigos**, que sempre estiveram presentes com palavras de incentivo, com gestos simples, mas cheios de significado, e com a alegria de celebrarem comigo cada pequena conquista ao longo do caminho.*

Aos meus **amigos de laboratório, Lara, Tuana, Luma, Leticia, Vanessa, Thais e Geovane** que de diferentes formas me sustentaram nesta trajetória, seja compartilhando risadas em momentos de exaustão, seja com palavras de ânimo nos períodos de dúvida. Vocês tornaram o caminho mais leve e possível.

Por fim, dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam no poder transformador da **ciência e da educação**. Que este esforço não seja apenas um fim em si mesmo, mas uma semente de novas possibilidades, um passo a mais na construção de um futuro em que o conhecimento esteja a serviço da vida.

Esta tese é fruto de muitas mãos, de muitos corações e de inúmeras histórias entrelaçadas com a minha. A cada um que, de forma direta ou indireta, fez parte desta caminhada, dedico esta conquista com toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Profº Tit. Cesar Rogério Pucci** e da vice-diretora **Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira**.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, na pessoa de coordenador **Prof. Tit. Alexandre Luiz Souto Borges**.*

*À minha orientadora, **Profa. Tit. Luciane Dias de Oliveira**, deixo registrado não apenas minha gratidão acadêmica, mas também meu reconhecimento pessoal. Obrigada por me acolher com paciência, por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava da minha própria capacidade e por compartilhar não só conhecimento, mas também humanidade. Mais do que orientadora, foi inspiração e exemplo de profissional e de ser humano. Obrigada por tudo, Lu!*

*Ao **corpo docente** do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal pela dedicação, pelo empenho em transmitir conhecimento e pelo apoio durante toda a trajetória acadêmica. Cada disciplina cursada contribuiu de maneira significativa para a construção desta pesquisa. professoras com quem tive o prazer de trabalhar, desenvolver parcerias e receber tanto carinho e atenção. Obrigada.*

*À **Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro**, agradeço muito por poder conhecê-la, por seu profissionalismo, seu cuidado com as pessoas, sou muito grata por tudo que me ensinou e por todo suporte dado durante a execução do trabalho. Professora que é um exemplo para todos.*

À minha banca examinadora, **Profa. Dra. Adeline Lacerda Jorjão, Prof. Dr. Jonâtas Rafael de Oliveira, Profa. Dra. Camilla Magnoni Moretto Nunes, Profa. Dra. Karen Cristina Kazue Yui**, pela disponibilidade em avaliar este trabalho, pelas valiosas contribuições e pelo olhar atento, que certamente engrandeceram a qualidade desta pesquisa.

Aos **colaboradores técnicos e administrativos**, que muitas vezes, com gestos simples, auxiliaram de forma decisiva no andamento das atividades.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da Bolsa de Doutorado.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original".

Albert Einstein

RESUMO

Menezes RT. Citotoxicidade, genotoxicidade e efeito antimicrobiano dos extratos de própolis verde e casca de romã isolados e combinados frente cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias que têm grande resistência aos principais antimicrobianos. Extratos de plantas têm sido estudados como alternativa ao tratamento. O presente estudo teve como objetivo: I) produzir e avaliar fitoquimicamente os extratos de própolis verde (EHP) e romã (EHR); II) Avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme isoladamente e em combinação sobre cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*; III) avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos em linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT). Para tanto, os extratos foram preparados e caracterizados fitoquimicamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), a ação antioxidante foi avaliada e o teor de flavonoides e fenóis determinados. A atividade antimicrobiana foi analisada pelo teste de microdiluição em caldo (CLSI – M7-A9) para determinar concentração bactericida mínima (CBM). Para avaliar a combinação dos extratos foi utilizada a técnica “checkerboard” e adotado o Índice de Concentração Bactericida Fracionária (ICBF). As concentrações que se apresentaram sinérgicas e aditivas foram analisadas sobre biofilmes monotípicos utilizando o teste de MTT. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA e Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os queratinócitos humanos da linhagem HaCaT foram utilizados para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade, a partir do teste colorimétrico de Rezasurina e micronúcleos, respectivamente. A análise cromatográfica de EHR mostrou picos de punicalagina e em EHP mostrou ácido artepillin C. Para eliminar 50% dos radicais livres é necessário 8,66 µg/mL de EHR e 11,73 µg/mL de EHP. O teor de sólidos solúveis foi de 6,02% (EHR) e 8,04% (EHP), a concentração de flavonoides foi de 0,256 mg/mL (EHR) e 0,337 mg/mL (EHP), de fenóis foi de 1,227 mg/mL (EHR) e 1,130 mg/mL (EHP). Os extratos apresentaram ação bactericida sendo a CBM de EHR variando de 0,1% a 1,5% e a CBM de EHP variou de 0,2% a 2,01% para todas as cepas testadas. Os extratos em combinação apresentaram diferentes concentrações com efeito aditivo e sinérgico bem como apresentaram ação antibiofilme para todas as cepas testadas demonstrando semelhança ao digluconato de clorexidina ($p < 0,5$). Os extratos não foram citotóxicos e nem produziram alteração no material genético dos queratinócitos. Portanto é possível concluir que os extratos hidroalcoólicos de casca de romã e própolis verde brasileira possuem ação antimicrobiana e antibiofilme sobre *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, possui boa ação antioxidante e não é citotóxico, nem genotóxico para queratinócitos humanos (HaCaT).

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; Sinergismo; Biofilme; Citotoxicidade; Genotoxicidade.

ABSTRACT

Menezes RT. Cytotoxicity, genotoxicity and antimicrobial effect of green propolis and pomegranate peel extracts isolated and combined against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2025.

Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* are bacteria highly resistant to major antimicrobials. Plant extracts have been studied as alternative treatments. The present study aimed to: I) produce and phytochemically evaluate green propolis (EHP) and pomegranate (EHR) extracts; II) evaluate their antimicrobial and antibiofilm action, alone and in combination, on *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains; III) evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of the extracts in a human keratinocyte cell line (HaCaT). Therefore, the extracts were prepared and phytochemically characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD), their antioxidant activity was evaluated, and their flavonoid and phenol contents were determined. Antimicrobial activity was analyzed by the broth microdilution test (CLSI – M7-A9) to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). The checkerboard technique was used to evaluate the combination of extracts, and the Fractional Bactericidal Concentration Index (FCI) was adopted. Concentrations that were synergistic and additive were analyzed on monotypic biofilms using the MTT test. The results were statistically analyzed by ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). Human keratinocytes of the HaCaT lineage were used to evaluate cytotoxicity and genotoxicity, based on the colorimetric Rezasurin and micronucleus tests, respectively. Chromatographic analysis of EHR showed punicalagin peaks and in EHP it showed artepillin C acid. To eliminate 50% of the free radicals, 8.66 $\mu\text{g/mL}$ of EHR and 11.73 $\mu\text{g/mL}$ of EHP are required. The soluble solids content was 6.02% (EHR) and 8.04% (EHP), the flavonoid concentration was 0.256 mg/mL (EHR) and 0.337 mg/mL (EHP), and the phenol concentration was 1.227 mg/mL (EHR) and 1.130 mg/mL (EHP). The extracts showed bactericidal action, with the MBC of EHR ranging from 0.1% to 1.5% and the MBC of EHP ranging from 0.2% to 2.01% for all tested strains. The combined extracts showed additive and synergistic concentrations. They showed antibiofilm action for all tested strains, demonstrating similarity to chlorhexidine digluconate ($p < 0.5$). The extracts were not cytotoxic and did not produce alterations in the genetic material of keratinocytes. Therefore, it is possible to conclude that the hydroalcoholic extracts of pomegranate peel and Brazilian green propolis have antimicrobial and antibiofilm action on *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, have good antioxidant action and are not cytotoxic or genotoxic to human keratinocytes (HaCaT).

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; Synergism; Biofilm; Cytotoxicity; Genotoxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Bactérias multirresistentes: um desafio global à saúde pública.....	18
2.2 Fitoterapia como alternativa promissora contra infecções.....	22
3 PROPOSIÇÃO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Análises fitoquímicas	26
4.1.1 Preparação dos extratos e determinação do teor de sólidos solúveis	26
4.1.2 Avaliação da constituição fitoquímica dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	27
4.1.3 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante)	28
4.1.4 Determinação do teor de flavonoides totais	29
4.1.5 Determinação do teor de fenóis totais	29
4.2 Análises microbiológicas	31
4.2.1 Microrganismos utilizados	31
4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana com os extratos isolados em cultura planctônica.....	313
4.2.3 Método de microdiluição <i>checkerboard</i> dos extratos associados.....	316
4.2.4 Avaliação antibiofilme dos extratos isolados e em combinação	37
4.3 Análises em células HaCaT.....	38
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos.....	38
4.3.2 Avaliação da genotoxicidade da associação dos extratos (teste de micronúcleos)	39
4.4 Análise estatística.....	40
5 RESULTADO.....	41
5.1 Análises fitoquímicas.....	41
5.1.1 Determinação do teor de sólidos e solúveis	41
5.1.2 Determinação de flavonoides totais na amostra.	42

5.1.3 Determinação de fenóis totais na amostra.....	43
5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	44
5.1.5 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante).....	45
5.2 Análises microbiológicas.....	46
5.2.1 Determinação da Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima.....	46
5.2.2 Efeito antibacteriano com extratos em combinação pelo ensaio <i>Checkerboard</i>	47
5.2.3 Efeito antibiofilme dos extratos pelo tempo de contato de 5 minutos e 24 horas	50
5.3 Análises em células HaCaT.....	70
5.3.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos	70
5.3.2 Avaliação da genotoxicidade dos extratos	72
6 DISCUSSÃO.....	75
7 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

As bactérias multirresistentes têm sido consideradas como um desafio crescente para a saúde pública em escala mundial devido à sua resistência a uma variedade de antimicrobianos usados rotineiramente no tratamento de doenças infecciosas. Essa resistência está frequentemente relacionada ao uso inadequado ou excessivo de antibióticos, além da disseminação de genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas (Koong et al., 2025; Nau et al., 2024; Oliveira et al., 2023).

O gênero *Acinetobacter* spp. apresenta micro-organismos Gram-negativos que podem causar infecções graves e até mesmo letais apresentando propriedades multirresistentes aos antibióticos. *Acinetobacter baumannii* tem se destacado nas últimas décadas, surgindo mundialmente como um dos mais problemáticos patógenos, no qual, obtém notoriedade ao induzir a capacidade positiva de regular ou obter determinantes de resistência (Arshad et al., 2025; Iovleva et al., 2025; Kornelsen et al., 2021; Mukhopadhyay et al., 2024; Peleg et al., 2008). É caracterizada como ocasionadora de infecções nosocomiais graves, sendo os mais importantes as infecções da corrente sanguínea e pneumonia relacionada à ventilação, além disso, as infecções causadas por esta bactéria são geralmente associadas aos longos períodos de internações, ao sexo masculino e a pessoas com idade avançada (Chastre et al., 2020; Goldberg et al., 2021; Lucidi et al., 2024; Singh et al., 2024).

De acordo com uma lista emitida no documento “Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários da OMS de 2024” sobre bactérias que necessitam urgentemente de novos antibióticos, *A. baumannii* ocupa o primeiro lugar na lista sendo descrita como crítica (WHO, 2024). Além da capacidade de resistência aos antibióticos, *A. baumannii* exibe inúmeros fatores de virulência, entre eles, a eficácia na secreção de enzimas e toxinas extracelulares e a capacidade de se unir a superfícies bióticas e abióticas, compondo uma estrutura denominada biofilme (Azam, et al., 2019).

Biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos que se aderem a superfícies e produzem uma matriz protetora composta por substâncias como polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (Matuschek et al., 2018; Patra et al.,

2024; Puca et al., 2024; Saha et al., 2025; Upadhyay et al., 2025). Essa estrutura confere maior resistência aos microrganismos contra agentes antimicrobianos e ao sistema imunológico, tornando infecções associadas a biofilmes difíceis de tratar. Essa resistência se dá pela dificuldade de penetração de agentes antimicrobianos na matriz extracelular, taxa de crescimento microbiano acelerada e mudanças fisiológicas (Kornelsen et al., 2021).

Pseudomonas aeruginosa, assim como *A. baumannii*, também é uma bactéria Gram negativa e é encontrado em plantas, frutas, solo e ambientes aquáticos. *P. aeruginosa* pode ser um fator patogênico em infecções oportunistas em humanos. Infecta as vias respiratórias e as vias urinárias, causa infecções no sangue, e é a causa mais comum de infecções por queimaduras (Basseti et al., 2018; Rossi, et al., 2021; Santamarina-Fernández et al., 2012; Sousa et al., 2025). O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pode ser difícil devido à sua resistência natural e adquirida aos antibióticos (Behzadi, et al., 2021; Breidenstein et al., 2011; Sousa et al., 2025; WHO 2024).

P. aeruginosa é uma bactéria conhecida por produzir biofilmes robustos. Biofilmes de *P. aeruginosa* causam problemas graves em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com fibrose cística ou infecção da ferida. Além disso, as propriedades únicas do biofilme complicam ainda mais sua erradicação, levando ao desenvolvimento de infecções crônicas (Bisht et al., 2021; Hibbert et al., 2024; Kim et al., 2020). De acordo com a pesquisa realizada pelo US National Healthcare Safety (2007), de aproximadamente 28.000 casos de infecções nosocomiais de 463 hospitais em 22 períodos do mês, *P. aeruginosa* foi considerado o sexto patógeno que mais ocorre repetidamente, segundo mais frequente de pneumonia e a sétima causa mais comum da infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter (Hidron et al., 2007; Kerr et al., 2009; Lupo et al., 2018).

É importante ressaltar que durante a pandemia causada pelo COVID-19 (SARS-CoV-2), resultou-se a internação de muitas pessoas imunocomprometidas, no qual, alguns pacientes positivos para esta doença foram diagnosticados com infecções secundárias, obtendo assim evidências da participação das bactérias *A. baumannii* e *P. aeruginosa* entre outras bactérias multirresistentes participantes da coinfeção (Mirzaei et al., 2020).

A resistência microbiana compromete a eficácia das terapias disponíveis, tornando infecções comuns potencialmente letais e dificultando o controle de surtos em ambientes hospitalares e comunitários. Com isso, torna-se urgente o desenvolvimento de estratégias eficazes para prevenção, diagnóstico e tratamento dessas infecções, bem como políticas de conscientização e uso racional de antimicrobianos (Enioutina et al., 2017).

A utilização de plantas para tratamento medicinal tem ganhado notoriedade, assim, a fitoterapia se tornou uma alternativa terapêutica promissora contra microrganismos multirresistentes. Mediante a fitoterapia, a cultura popular faz da biodiversidade brasileira um campo de estudo científico, originando assim, grande parte dos medicamentos hoje disponíveis no mundo (ANVISA, 2011; Chandra et al., 2020; Shiekh et al., 2025). Os extratos naturais têm ganhado notoriedade na última década devido a suas propriedades antimicrobianas, antivirais, antibióticas entre outros se destacando até mesmo em benefícios psicológicos aos humanos, se destaca também por ser geralmente segura com efeitos adversos leves (Idris et al., 2021; Qahir et al., 2021; Suriyaprom et al., 2022).

Romã (*Punica granatum* L.) é uma fruta que tem sido estudada por apresentar propriedades antimicrobianas, especialmente nos extratos obtidos de sua casca, polpa e sementes. É uma das plantas medicinais mediterrâneas que tem sido usada no tratamento de úlceras, diarreia e infertilidade masculina e que contém componentes anti-sépticos. Rica em compostos bioativos, como taninos, flavonoides e ácidos fenólicos, a planta mostra-se eficaz contra diversas bactérias patogênicas, inclusive cepas resistentes a antibióticos convencionais (Lima et al., 2024; Maphetu et al., 2022; Noreen et al., 2025; Qahir et al. 2021). Estudos têm demonstrado sua eficácia tanto no uso isolado quanto sinérgico, com boa eficácia antimicrobiana e atividade antioxidante (Gharbani et al., 2023; Guiotti et al., 2016; Khursheed et al., 2024).

A própolis verde, uma variedade típica do Brasil obtida a partir da resina do alecrim-do-campo (de *Baccharis dracunculifolia*) possui notável atividade antibacteriana, atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, como o artepelin C e flavonoides (Aldana-Mejía et al., 2024; Barbosa et al., 2022; Gomes et al., 2024). Possui grande eficácia a saúde devido às propriedades antibacterianas, antifúngicas e uma grande atividade antioxidante, sendo também eficaz contra

bactérias multirresistentes. Na literatura existem diversos artigos que demonstram que seu extrato é eficaz contra diversas bactérias patogênicas, como no estudo de Meccatti et al. (2023) em que avaliaram a ação antibiofilme sinérgica dos extratos de canela (*Cinnamomum verum*) e própolis verde brasileira contra cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* e os extratos combinados foram eficazes na prevenção da formação de biofilmes e na redução dos biofilmes maduros da cepa clínica de *A. baumannii* em até 83,86% com desempenho comparável ao digluconato de clorexidina, que apresentou percentual de 90,29%.

Além disso, a própolis verde por ter se mostrado promissora no combate a cepas multirresistentes, tem sido estudada como alternativa ou complemento aos antibióticos tradicionais, especialmente em infecções cutâneas, orais e gastrointestinais. Seu uso em formulações farmacêuticas e produtos naturais reforça o potencial terapêutico desse composto como um agente antimicrobiano de origem natural (Ribeiro et al., 2024; Sá Assis et al., 2022; Santos et al., 2022; Silva et al., 2019; Souza et al., 2022; Vicã et al., 2021).

Diante disso, é de suma importância investigar a ação antimicrobiana dos extratos de própolis verde e casca de romã e o efeito sinérgico dos mesmos, em biofilmes monotípicos de cepas multirresistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, pode-se inferir que:

- a) foram desenvolvidos os extratos hidroalcoólicos de própolis verde e casca de romã, identificando a presença de flavonoides e fenóis bem como atividade antioxidante. Foi identificado ácido-gálico, α -punicalagina e β -punicalagina no EHR e ácido artepillin C, ácido p-cumarico e derivados do ácido cinâmico no EHP.
- b) os extratos demonstraram ação antibacteriana sendo a CBM de EHR variando de 0,1% a 1,5% e a CBM de EHP variando de 0,2% a 2,01% para todas as cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* testadas. Além disso, os extratos apresentaram 16 combinações com efeito aditivo e sinérgico. Constatou-se, também, redução da viabilidade dos biofilmes formados para todas as cepas testadas demonstrando diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo controle ($p < 0,5$).
- c) os extratos de romã e própolis verde de forma isolada e em combinação não foram citotóxicos e nem genotóxicos para as células HaCaT.

REFERÊNCIAS

- Abullais Saquib S, Abdullah AlQahtani N, Ahmad I, Arora S, Mohammed Asif S, Ahmed Javali M, Nisar N. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. *J Infect Dev Ctries*. 2021 Nov 30;15(11):1685-1693. doi: 10.3855/jidc.14904. PMID: 34898497.
- Afroze R, Saha SK, Banu LA, Ahmed AU, Shahidullah AS, Gani A, Sultana S, Kabir MR, Ali MY. Antibacterial Effect of *Curcuma longa* (Turmeric) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Mymensingh Med J*. 2015 Jul;24(3):506-15. PMID: 26329948.
- Aldana-Mejía JA, Ribeiro VP, Katragunta K, Avula B, Tatapudi KK, Bastos JK, Khan IA, Meepagala K, Ross SA. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of Green Propolis from the Brazilian Caatinga Biome. *Plants (Basel)*. 2024 Dec 21;13(24):3576. doi: 10.3390/plants13243576. PMID: 39771273; PMCID: PMC11677851.
- Ambigaipalan P, de Camargo AC, Shahidi F. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (peel, flowers and bark) and their bioactive properties. *J Agric Food Chem*. 2016;64(45):8565–73.
- Angelini P. Plant-Derived Antimicrobials and Their Crucial Role in Combating Antimicrobial Resistance. *Antibiotics*. 2024;13(8):746. doi:10.3390/antibiotics13080746.
- Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*. 2014 Aug;71(3):292-301. doi: 10.1111/2049- 632X.12125. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24376225.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.
- Assis, M. A., de Paula Ramos, L., Abu Hasna, A., de Queiroz, T. S., Pereira, T. C., Nagai de Lima, P. M., Berretta, A. A., Marcucci, M. C., Talge Carvalho, C. A., & de Oliveira, L. D. (2022). Efeito Antimicrobiano e Antibiofilme do Extrato Aquoso de Própolis Verde Brasileira contra Bactérias Anaeróbias Dentárias. *Moléculas (Basileia, Suíça)*, 27(23), 8128. <https://doi.org/10.3390/molecules27238128>
- Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP). (2023). Relatório anual de resistência bacteriana em hospitais brasileiros.
- Artawinata PC, Kim Y, Choi IY, Park MK. Broad Antibacterial Activity and Mechanism of Garlic (*Allium sativum* L. cv. Uiseong) Extracts against Cell Wall of

Aeromonas hydrophila. J Microbiol Biotechnol. 2025 Feb 24;35:e2410035. doi: 10.4014/jmb.2410.10035. PMID: 40016148; PMCID: PMC11896803.

Arshad N, Azzam W, Zilberberg MD, Shorr AF. *Acinetobacter baumannii* Complex Infections: New Treatment Options in the Antibiotic Pipeline. Microorganisms. 2025 Feb 7;13(2):356. doi: 10.3390/microorganisms13020356. PMID: 40005723; PMCID: PMC11858728.

Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. Drug Discov Today. 2019 Jan; 24(1): 350-9. doi: 10.1016/j.drudis.2018.07.003. PubMed PMID: 30036575.

Barbosa EV, Assumpção YM, Teixeira IM, Pereira RF, Ribeiro VP, Bastos JK, et al. In vitro comparison between antimicrobial and antibiofilm effects of Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* against *Staphylococcus pseudintermedius* isolate. An Acad Bras Cienc. 2022 Jun; 2794(3):e20211103. PubMed PMID: 35766601.

Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. Biofouling. 2013 Sep;29(8):929-37. doi: 10.1080/08927014.2013.820825. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23906229.

Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context. 2018 May 29;7:212527. doi: 10.7573/dic.212527. PubMed PMID: 29872449

Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics (Basel). 2021 Jan 4;10(1):42. doi: 10.3390/antibiotics10010042. PubMed PMID: 33406652.

Berretta AA, Arruda C, Rodrigues E, et al. Chemical profiling and antioxidant potential of Brazilian green propolis extracts obtained by different extraction methods. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1123.

Berretta AA, De Lima JA, Falcão SI, Calhelha R, Amorim NA, Gonçalves IS, Zamarrenho LG, Barud HDS, Bastos JK, De Jong D, Vilas-Boas M. Development and Characterization of High-Absorption Microencapsulated Organic Propolis EPP-AF[®] Extract (i-CAPs). Molecules. 2023 Oct 17;28(20):7128. doi: 10.3390/molecules28207128. PMID: 37894606; PMCID: PMC10609166.

Bisht K, Moore JL, Caprioli RM, Skaar EP. Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. NPJ Biofilms Microbiomes. 2021 Mar 16;7(1):22. doi: 10.1038/s41522-021-00194-8. PubMed PMID: 33727555.

Boyd S, Nseir S, Rodriguez A, Martin-Loeches I. Ventilator-associated pneumonia in critically ill patients with COVID-19 infection: a narrative review. *ERJ Open Res.* 2022;8(3):00046-2022. Published 2022 Jul 25. doi:10.1183/23120541.00046-2022.

Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011 Aug;19(8):419-26. doi: 10.1016/j.tim.2011.04.005. PubMed PMID: 21664819.

Breijyeh Z, Karaman R. Antibacterial activity of medicinal plants and their role in wound healing. *Futur J Pharm Sci.* 2024;10:68. doi:10.1186/s43094-024-00634-0.

Chandra G, Mukherjee D, Ray AS, Chatterjee S, Bhattacharjee I. Phytoextracts as Antibacterials: A Review. *Curr Drug Discov Technol.* 2020;17(4):523-533. doi: 10.2174/1570163816666191106103730. PMID: 31702527.

Chastre J, Trouillet JL, Vuagnat A, Joly-Guillou ML. Nosocomial Pneumonia Caused by *Acinetobacter* spp. *Acinetobacter*; 2020. 117-132, 2020. ISBN 9781003069263

Costa SF, Gales AC, Sader HS, et al. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz J Microbiol.* 2016;47(4):1005-1012. doi:10.1016/j.bjm.2016.05.004.

Costa LM. Teor de fenólicos e atividade antioxidante de própolis em áreas de floresta e savana de Roraima. *RCT-Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 2, n. 3, 2016.

Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*. 2020 Jan;166(1):30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860. Erratum in: *Microbiology (Reading)*. 2021 Aug;167(8). doi: 10.1099/mic.0.001073. PMID: 31597590; PMCID: PMC7273324.

Enioutina EY, Teng L, Fateeva TV, Brown JCS, Job KM, Bortnikova VV, Krepkova LV, Gubarev MI, Sherwin CMT. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2017 Nov;10(11):1203-1214. doi: 10.1080/17512433.2017.1371591. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28836870.

Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Prim Care.* 2017 Jun;44(2):217-227. doi: 10.1016/j.pop.2017.02.001. PMID: 28501226.

Ferreira KN, Nascimento YDB. Avaliação da eficácia antimicrobiana do extrato de própolis verde em bactérias causadoras de infecções respiratórias. <https://ric.cps.sp.gov.br/handle/123456789/31778>.

Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and

differently produced juices by HPLC–DAD–ESI/MSn. *Food Chem.* 2011;127(2):807-21.

Franchin M, Saliba ASMC, Sartori AG de O, Pereira Neto SO, Benso B, Ikegaki M, Alencar SM, Granato D. Food-grade delivery systems of Brazilian propolis from *Apis mellifera*: from chemical composition to bioactivities in vivo [Internet]. *Food Chemistry*. 2024 ; 432 1-14.[citado 2025 nov. 20] Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137175>

Gharbani P, Jam N, Doshmanfekan H, Mehrizad A. Optimization of synergic antibacterial activity of *Punica granatum* L. and *Areca nut* (P.G.L.A.N) extracts through response surface methodology. *Sci Rep.* 2023 Apr 13;13(1):6098. doi: 10.1038/s41598-023-32900-1. PMID: 37055420; PMCID: PMC1010224.

Grygiel I, Bajrak O, Wójcicki M, Krusiec K, Jończyk-Matysiak E, Górski A, Majewska J, Letkiewicz S. Comprehensive Approaches to Combatting *Acinetobacter baumannii* Biofilms: From Biofilm Structure to Phage-Based Therapies. *Antibiotics* (Basel). 2024 Nov 8;13(11):1064. doi: 10.3390/antibiotics13111064. PMID: 39596757; PMCID: PMC11591314.

Goldberg JA, Kumar V, Spencer EJ, Hoyer D. A γ -lactam siderophore antibiotic effective against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter* spp. *Eur J Med Chem.* 2021 Aug 5;220:113436. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113436. Epub 2021 Apr 8. PubMed PMID: 33933754.

Gomes KO, Messias da Silva LCF, Dos Santos RD, Prado BA, da Silva Montes P, Silva Rodrigues LF, de Araújo MO, Bilac CA, Freire DO, Gris EF, Rodrigues da Silva IC, de Sá Barreto LCL, Orsi DC. Chemical characterization and antibacterial activities of Brazilian propolis extracts from *Apis mellifera* bees and stingless bees (*Meliponini*). *PLoS One.* 2024 Jul 16;19(7):e0307289. doi: 10.1371/journal.pone.0307289. PMID: 39012879; PMCID: PMC11251613.).

Ghosh A, Saha S, Banerjee A, et al. A narrative review on bacterial biofilm: its formation, clinical aspects and inhibition strategies. *Future J Pharm Sci.* 2023;9(1):1-13. doi:10.1186/s43094-023-00499-9.

Guiotti BG, Cunha MB, Paulini MC, Goiato DM, Dos Santos C, et al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *J Prosthet Dent.* 2016 Jul;116(1):136-43. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.12.014. Epub 2016 Feb 26.

Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Feb;16(2):91-102. doi: 10.1038/nrmicro.2017.148. Epub 2017 Dec 18. PMID: 29249812; PMCID: PMC6571207.

Hibbert TM, Whiteley M, Renshaw SA, Neill DR, Fothergill JL. Emerging strategies to target virulence in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. Crit Rev Microbiol. 2024 Nov;50(6):1037-1052. doi: 10.1080/1040841X.2023.2285995. Epub 2023 Nov 24. PMID: 37999716.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC. NHSN annual update: antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008 Nov;29(11):996-1011. doi: 10.1086/591861. PubMed PMID: 18947320.

Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. Mol Biol Rep. 2021 Oct;48(10):6987-6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34460060; PMCID: PMC8403534.

Idris FN, Mohd Nadzir M. Comparative studies on different extraction methods of *Centella asiatica* and extracts bioactive compounds effects on antimicrobial activities. Antibiotics (Basel). 2021 Apr 17;10(4):457. doi: 10.3390/antibiotics10040457. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. 2009 Dec;73(4):338-44. doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020. Epub 2009 Aug 21. PubMed PMID: 19699552.

Iovleva A, Fowler VG Jr, Doi Y. Treatment Approaches for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. Drugs. 2025 Jan;85(1):21-40. doi: 10.1007/s40265-024-02104-6. Epub 2024 Nov 28. PMID: 39607595; PMCID: PMC11950131.

Jamwal V, Palmo T, Singh K. Understanding the mechanisms of antimicrobial resistance and potential therapeutic approaches against the Gram-negative pathogen *Acinetobacter baumannii*. RSC Med Chem. 2024;15:3925-3949. doi:10.1039/D4MD00449C.

Jam N, Hajimohammadi R, Gharbani P, Mehrizad A. Antibacterial activity of *Punica granatum* L. and *Areca nut* (P.A) combined extracts against some food born 33 pathogenic bacteria. Saudi J Biol Sci. 2022 Mar;29(3):1730-1736. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.10.057. Epub 2021 Oct 25. PMID: 35280537; PMCID: PMC8913389.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci. 2021 Mar 18;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128. PMID: 33803907; PMCID: PMC8003266.

Jentzen W, Richter M, Nagarajah J, Poeppel TD, Brandau W, Dawes C, et al.

Chewing-gum stimulation did not reduce the absorbed dose to salivary glands during radioiodine treatment of thyroid cancer as inferred from pre-therapy (124) PET/CT imaging. *EJNMMI Phys.* 2014 Dec;1(1):100. doi: 10.1186/s40658-014-0100-1.

Khan I, Rahman H, Abd El-Salam NM, Tawab A, Hussain A, Khan TA, Khan UA, Qasim M, Adnan M, Azizullah A, Murad W, Jalal A, Muhammad N, Ullah R. Punica granatum peel extracts: HPLC fractionation and LC MS analysis to quest compounds having activity against multidrug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med.* 2017 May 3;17(1):247. doi: 10.1186/s12906-017-1766-4. PMID: 28468660; PMCID: PMC5415797.

Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect.* 2009 Dec;73(4):338-44. doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020. Epub 2009 Aug 21. PubMed PMID: 19699552.

Kim S, Li XH, Hwang HJ, Lee JH. Thermoregulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2020 Oct 28;86(22):e01584-20. doi: 10.1128/AEM.01584-20. Print 2020 Oct 28.

Koong J, Hall RM, Hamidian M. Genomic characteristics of the multiresistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1 reference strain A297/RUH875. *J Antimicrob Chemother.* 2025 May 19;dkaf160. doi: 10.1093/jac/dkaf160. Epub ahead of print. PMID: 40387539.

Kornelsen V, Kumar A. Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Jun 17;65(7):e0051421. doi: 10.1128/AAC.00514-21. Epub 2021 Jun 17. PubMed PMID: 33903107.

Khursheed H, Qasim R. Synergistic antibiofilm activity of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Punica granatum* L., against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2024 Apr-Jun;36(2):245-250. doi: 10.55519/JAMC-02-12876. PMID: 39609958.

Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Mar 13;7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055. PMID: 28348979; PMCID: PMC5346588.

Lima Bezerra JJ, Domingos da Silva JM. Dental applications of *Punica granatum* L. in the treatment of gingivitis: A review of ethnomedicinal uses, randomized clinical trials, and antibacterial potential against *Porphyromonas gingivalis*. *J Ethnopharmacol.* 2025 Jan 10;336:118701. doi: 10.1016/j.jep.2024.118701. Epub 2024 Aug 15. PMID: 39153519.

Lucidi M, Visaggio D, Migliaccio A, Capecchi G, Visca P, Imperi F, Zarrilli R. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. *Virulence*. 2024 Dec;15(1):2289769. doi: 10.1080/21505594.2023.2289769. Epub 2023 Dec 6. PMID: 38054753; PMCID: PMC10732645

Lupo A, Haenni M, Madec JY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr*. 2018 Jun;6(3). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017. PubMed PMID: 30101740.

Macesic N, Uhlemann AC, Peleg AY. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet*. 2025 Jan 18;405(10474):257-272. doi: 10.1016/S0140- 6736(24)02081-6. PMID: 39826970.

Malcangi G, Inchingolo AM, Casamassima L, Trilli I, Ferrante L, Inchingolo F, Palermo A, Inchingolo AD, Dipalma G. Effectiveness of Herbal Medicines with Anti-Inflammatory, Antimicrobial, and Antioxidant Properties in Improving Oral Health and Treating Gingivitis and Periodontitis: A Systematic Review. *Nutrients*. 2025 Feb 21;17(5):762. doi: 10.3390/nu17050762. PMID: 40077632; PMCID: PMC11901544.

Manner C, Dias Teixeira R, Saha D, Kaczmarczyk A, Zemp R, Wyss F, Jaeger T, Laventie BJ, Boyer S, Malone JG, Qvortrup K, Andersen JB, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Hiller S, Drescher K, Jenal U. A genetic switch controls *Pseudomonas aeruginosa* surface colonization. *Nat Microbiol*. 2023 Aug;8(8):1520-1533. doi: 10.1038/s41564-023-01403-0. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37291227.

Maphetu N, Unuofin JO, Masuku NP, Olisah C, Lebelo SL. Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of *Punica granatum* L (pomegranate) plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022, p 153,113256.

Marina K. Exploring the antimicrobial properties of traditional medicinal plants: A comprehensive review. *J Pharmacogn Nat Prod*. 2024;10:294. doi:10.37421/24720992.2024.10.294.

Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin—evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Aug;24(8):865-870. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.020. Epub 2017 Dec 5. PubMed PMID: 32770825.

Mphahlele RR, Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Effect of extraction system and pomegranate cultivar on phenolic composition and antioxidant activity of pomegranate juice and peel. *Food Bioprocess Technol*. 2016;9(12):217–31.

Mea HJ, Yong PVC, Wong EH. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiol Res*. 2021 Jun;247:126722. doi: 10.1016/j.micres.2021.126722. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33618061.

Meccatti VM, Martins KMC, Ramos LP, Pereira TC, de Menezes RT, Marcucci MC, Abu Hasna A, de Oliveira LD. Synergistic Antibiofilm Action of *Cinnamomum verum* and Brazilian Green Propolis Hydroethanolic Extracts against Multidrug- Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* and Their Biocompatibility on Human Keratinocytes. *Molecules*. 2023 Oct 1;28(19):6904. doi: 10.3390/molecules28196904. PMID: 37836747; PMCID: PMC10574440.

Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019 Nov 7;35(11):178. doi: 10.1007/s11274-019-2739-1. PMID: 31701321; PMCID: PMC6838043.

Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*. 2020 Oct;72(10):2097-2111. doi: 10.1002/iub.2356. Epub 2020 Aug 8. PubMed PMID: 32770825.

Moser C, Jensen PØ, Thomsen K, Kolpen M, Rybtke M, Lauland AS, Trøstrup H, Tolker-Nielsen T. Immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Immunol*. 2021 Feb 22;12:625597. doi: 10.3389/fimmu.2021.625597. PMID: 33692800; PMCID: PMC7937708.

Moro C, Phelps C, Veer V, Jones M, Glasziou P, Clark J, Tikkinen KAO, Scott AM. Cranberry Juice, Cranberry Tablets, or Liquid Therapies for Urinary Tract Infection: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Eur Urol Focus*. 2024 Dec;10(6):947-957. doi: 10.1016/j.euf.2024.07.002. Epub 2024 Jul 18. PMID: 39030132.

Mukhopadhyay H, Bairagi A, Mukherjee A, Prasad AK, Roy AD, Nayak A. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A study on its pathogenesis and therapeutics. *Curr Res Microb Sci*. 2024 Dec 6;8:100331. doi: 10.1016/j.crmicr.2024.100331. PMID: 39802320; PMCID: PMC11718326.

Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*. 2014 Jul;68(1):1-12. doi: 10.1007/s00248-013-0297-x. Epub 2013 Oct6. PMID: 24096885; PMCID: PMC3977026.

Nau R, Seele J, Eiffert H. New Antibiotics for the Treatment of Nosocomial Central Nervous System Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2024 Jan 7;13(1):58. doi: 10.3390/antibiotics13010058. PubMed PMID: 38247617; PMCID: PMC10812395.

Noreen S, Hashmi B, Aja PM, Atoki AV. Phytochemicals and pharmacology of pomegranate (*Punica granatum* L.): nutraceutical benefits and industrial

applications: a review. *Front Nutr.* 2025 Mar 27;12:1528897. doi: 10.3389/fnut.2025.1528897. PMID: 40212725; PMCID: PMC11983554.

Novović K, Jovčić B. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: molecular mechanisms and epidemiology. *Antibiotics.* 2023;12(3):516. doi:10.3390/antibiotics12030516.

Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance—role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(2):61-74. doi:10.5603/FHC.a2016.0009.

Ng QX, Ong NY, Lee DYX, Yau CE, Lim YL, Kwa ALH, et al. Trends in *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) Bacteremia during the COVID-19 Pandemic: A Systematic Review. *Antibiotics.* 2023;12(2):409. doi: 10.3390/antibiotics12020409

Oancea OL, Ciurea CN, Mare AD, Man A, Stefanescu R, Rusu A. In Vitro Evaluation of the Antibacterial Effect and Influence on the Bacterial Biofilm Formation of Glutamic Acid and Some Structural Analogues. *Antibiotics (Basel).* 2025 Apr 19;14(4):415. doi: 10.3390/antibiotics14040415. PMID: 40298576; PMCID: PMC12024026.

Oliveira J, Reygaert WC. Gram-Negative Bacteria. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan—. PMID: 30855801.

Organización Mundial de la Salud [homepage na internet]. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [acceso em 05 de set de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/es/news/item/27-022017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Palanisamy B, Pachaiyappan SK, Subramanian M, et al. Unraveling the antimicrobial efficacy and chemical fingerprinting of medicinal plants against the WHO's prioritized pathogens. *Bull Natl Res Cent.* 2024;48(1):11. doi:10.1186/s42269-024-01166-6.

Patra S, Saha S, Singh R, Tomar N, Gulati P. Biofilm battleground: Unveiling the hidden challenges, current approaches and future perspectives in combating biofilm associated bacterial infections. *Microb Pathog.* 2025 Jan;198:107155. doi: 10.1016/j.micpath.2024.107155. Epub 2024 Nov 23. PMID: 39586337

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Ver.* 2008 Jul;21(3):538-82. doi: 10.1128/CMR.00058-07. PubMed PMID: 18625687.

Perez F, El Chakhtoura NG, Bonomo RA. Management of Severe Infections:

Multidrug-Resistant and Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Med Clin North Am.* 2025 May;109(3):735-747. doi: 10.1016/j.mcna.2025.01.003. Epub 2025 Feb 28. PMID: 40185559.

Picheta N, Piekarz J, Burdan O, Satora M, Tarkowski R, Kułak K. Phytotherapy of Vulvovaginal Candidiasis: A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 28;25(7):3796. doi: 10.3390/ijms25073796. PMID: 38612606; PMCID: PMC11012191.

Puca V, Marinacci B, Pellegrini B, Campanile F, Santagati M, Grande R. Biofilm and bacterial membrane vesicles: recent advances. *Expert Opin Ther Pat.* 2024 Jun;34(6):475-491. doi: 10.1080/13543776.2024.2338101. Epub 2024 Apr 5. PMID: 38578180.

Qahir A, Khan N, Hakeem A, Kamal R. The antioxidant, antimicrobial, and clinical effects with elemental contents of pomegranate (*Punica granatum*) peel extracts: A review. *Baghdad J. Biochem. Appl. Biol. Sci.* 2021 Mar. 31;2(01):21 8. doi.org/10.47419/bjbabs.v2i01.

Ramesh R, Rekha ND, Gopal S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: treatment strategies to combat infection. *Arch Microbiol.* 2025 May 10;207(6):141. doi: 10.1007/s00203-025-04346-8. PMID: 40348909.

Rani J, Singh S, Beniwal A. Pomegranate peel mediated silver nanoparticles: antimicrobial action against crop pathogens, antioxidant potential and cytotoxicity assay. *Discover Nano* **19**, 160 (2024). <https://doi.org/10.1186/s11671-024-04103-8>

Ribeiro IS, Muniz IPR, Galantini MPL, Gonçalves CV, Lima PHB, Silva NR, de Oliveira SL, Nunes MS, Novaes AKS, de Oliveira MES, Costa DJ, Amaral JG, da Silva RAA. Antimicrobial photodynamic therapy with Brazilian green propolis controls intradermal infection induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and modulates the inflammatory response in a murine model. *Photochem Photobiol Sci.* 2024 Mar;23(3):561-573. doi: 10.1007/s43630-024-00539-0. Epub 2024 Feb19.PMID: 38372844.

Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Front Pharmacol.* 2017 Apr 20;8:158. doi: 10.3389/fphar.2017.00158. PMID: 28473769; PMCID: PMC5397413.

Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol.* 2021 May;19(5):331-342. doi: 10.1038/s41579-020-00477-5. Epub 2020 Nov 19.

Sá Assis MA, de Paula Ramos L, Abu Hasna A, de Queiroz TS, Pereira TC, Nagai de Lima PM, Berretta AA, Marcucci MC, Talge Carvalho CA, de Oliveira LD. Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Brazilian Green Propolis Aqueous Extract

against Dental Anaerobic Bacteria. *Molecules*. 2022 Nov 22;27(23):8128. doi: 10.3390/molecules27238128. PMID: 36500223; PMCID: PMC9740127.

Saha S, Singh R, Tomar N, Gulati P. Biofilm battleground: Unveiling the hidden challenges, current approaches and future perspectives in combating biofilm associated bacterial infections. *Microb Pathog*. 2025 Jan;198:107155. doi: 10.1016/j.micpath.2024.107155. Epub 2024 Nov 23. PMID: 39586337.

Santamarina-Fernández R, Fuentes-Valverde V, Silva-Rodríguez A, García P, Moscoso M, Bou G. *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine Development: Lessons, Challenges, and Future Innovations. *Int J Mol Sci*. 2025 Feb 25;26(5):2012. doi: 10.3390/ijms26052012. PMID: 40076637; PMCID: PMC11900337.

Santos FF, Morais-Urano RP, Cunha WR, de Almeida SG, Cavallari PSDSR, Manuquian HA, Pereira HA, Furtado R, Santos MFC, Amdrade E Silva ML. A review on the anti-inflammatory activities of Brazilian green, brown and red propolis. *J Food Biochem*. 2022 Oct;46(10):e14350. doi: 10.1111/jfbc.14350. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35880944.

Santos PBDRED, Ávila DDS, Ramos LP, Yu AR, Santos CEDR, Berretta AA, Camargo SEA, Oliveira JR, Oliveira LD. Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*. 2020 Aug;36(7):834-845. doi:10.1080/08927014.2020.1823972. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32954805.

Sawaya AC, Barbosa da Silva Cunha I, Marcucci MC. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Cent J*. 2011;5(1):27. Published 2011 Jun 1. doi:10.1186/1752-153X-5-27.

Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Aalinkeel R. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*. 2023;11(6):1614. doi:10.3390/microorganisms11061614.

Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*. 2014 Jan;42(1):1-7. doi: 10.1016/j.biologicals.2013.11.001. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24309094.

Sharifi-Rad M, Mnayer D, Morais-Braga MFB, Carneiro JNP, Bezerra CF, Coutinho HDM, Salehi B, Martorell M, Del Mar Contreras M, Soltani-Nejad A, Uribe YAH, Yousaf Z, Iriti M, Sharifi-Rad J. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytother Res*. 2018 Sep;32(9):1653-1663. doi: 10.1002/ptr.6101. Epub 2018.

Shiekh RAE, Atwa AM, Elgindy AM, Mustafa AM, Senna MM, Alkabbani MA, Ibrahim KM. Therapeutic applications of eucalyptus essential oils.

Inflammopharmacology. 2025 Jan;33(1):163-182. doi: 10.1007/s10787-024-01588-8. Epub 2024 Nov 5. PMID: 39499358; PMCID: PMC11799053.

Silva FRG, Matias TMS, Souza LIO, Matos-Rocha TJ, Fonseca SA, Mousinho KC. Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. Braz J Biol. 2019 Jul-Sep;79(3):452459. doi: 10.1590/1519-6984.182959. Epub 2018 Oct 29. PubMed PMID: 30379200.

Singh S, Trivedi M, Dwivedi M. An insight into MDR *Acinetobacter baumannii* infection and its pathogenesis: Potential therapeutic targets and challenges. Microb Pathog. 2024 Jul;192:106674. doi: 10.1016/j.micpath.2024.106674. Epub 2024 May5. PMID: 38714263

Sun S, Liu M, He J, Li K, Zhang X, Yin G. Identification and Determination of Seven Phenolic Acids in Brazilian Green Propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules*. 2019; 24(9):1791. <https://doi.org/10.3390/molecules24091791>

Suriyaprom S, Mosoni P, Leroy S, Kaewkod T, Desvaux M, Tragoolpua Y. Antioxidants of fruit extracts as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. Antioxidants (Basel). 2022 Mar; 11(3): 602. Published online 2022 Mar 21. doi: 10.3390/antiox11030602. PubMed PMID: 35326252.

Sousa T, Silva C, Igrejas G, Hébraud M, Poeta P. The Interactive Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Global Ecology. J Basic Microbiol. 2025 Apr;65(4):e70004. doi: 10.1002/jobm.70004. Epub 2025 Feb 19. PMID: 39972634.

Souza Silva T, Silva JMB, Braun GH, Mejia JAA, Ccapatinta GVC, Santos MFC, Tanimoto MH, Bastos JK, Parreira RLT, Orenha RP, Borges A, Berretta AA, Veneziani RCS, Martins CHG, Ambrósio SR. Green and Red Brazilian Propolis: Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria. Chem Biodivers. 2021 Aug;18(8):e2100307. doi: 10.1002/cbdv.202100307. Epub 2021 Jun 22. PMID: 34086414.

Sousa T, Hébraud M, Dapkevicius MLNE, Maltez L, Pereira JE, Capita R, Alonso-Calleja C, Igrejas G, Poeta P. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci. 2021 Nov 29;22(23):12892. doi: 10.3390/ijms222312892. PMID: 34884697; PMCID: PMC8657582.

Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. Emerg Microbes Infect. 2022 Dec;11(1):811-814. doi: 10.1080/22221751.2022.2048972. PMID: 35240944; PMCID: PMC8920394.

Thee S, Garcia-Prats AJ, Draper HR, McIlleron HM, Wiesner L, Castel S, et al. The

pharmacokinetics and safety of moxifloxacin in children with multidrug-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis. 2014 Oct 30. pii: ciu868. [Epub ahead of print]

Upadhyay A, Jaiswal N, Kumar A. Biofilm battle: New transformative tactics to tackle the bacterial biofilm infections. Microb Pathog. 2025 Feb;199:107277. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107277. Epub 2025 Jan 3. PMID: 39756524.

Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. Antibiotics (Basel). 2022 Aug 9;11(8):1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079. PMID: 36009947; PMCID: PMC9404765.

Vică ML, Glevitzky I, Glevitzky M, Siserman CV, Matei HV, Teodoru CA. Antibacterial activity of propolis extracts from the central region of Romania against neisseria gonorrhoeae. Antibiotics (Basel). 2021 Jun 8;10(6):689. doi: 10.3390/antibiotics10060689. PubMed PMID: 34201299.

Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020 Aug 28;17(17):6278. doi: 10.3390/ijerph17176278. PMID: 32872324; PMCID: PMC7503635.

WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1> Acesso em 19 mai 2025.

World Health Organization (WHO). (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.

Wu H-J, Xiao Z-G, Lv X-J, et al. Drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: From molecular mechanisms to potential therapeutics. Exp Ther Med. 2023;25(5):209. doi:10.3892/etm.2023.11908.

Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. Molecules. 2019 May 14;24(10):1849. doi: 10.3390/molecules24101849. PMID: 31091746; PMCID: PMC6572253.

Yu Z, Hong Y, Zhao S, Zhou M, Tan X. Antibacterial Effect of Fermented Pomegranate Peel Polyphenols on *Vibrio alginolyticus* and Its Mechanism. Biology (Basel). 2024 Nov 16;13(11):934. doi: 10.3390/biology13110934. PMID: 39596889; PMCID: PMC11591687.

Zouine N, el Ghachtouli N, El Abed S, Saad IK. A comprehensive review on

medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects. *Sci Afr.* 2024;26:e02395. doi:10.1016/j.sciaf.2024.e02395.