



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

AMANDA ROMAGNOLI YU

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE DIFERENTES EXTRATOS
NATURAIS SOBRE CEPAS CLÍNICAS MULTIRRESISTENTES DE
*Acinetobacter baumannii***

2020

AMANDA ROMAGNOLI YU

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE DIFERENTES EXTRATOS
NATURAIS SOBRE CEPAS CLÍNICAS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter
baumannii***

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 do Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia/Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Coorientador: Prof. Dr. João Manoel Theotonio dos Santos

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Yu, Amanda Romagnoli

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de diferentes extratos naturais sobre cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* / Amanda Romagnoli Yu. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.

57 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge

Coorientador: João Manoel Theotonio dos Santos

1. Micro-organismos multirresistentes. 2. Extratos de plantas. 3. *Acinetobacter baumannii*. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso, orient. II. Santos, João Manoel Theotonio dos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Manoel Theotonio dos Santos (Coorientador)

Universidade Anhembi Morumbi
Campus de São Paulo e de São José dos Campos

Profa. Dra. Andrea Moreira Monteiro

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Campus de São Paulo

Profa. Dra. Adriana Bozzi

Universidade Estadual de Santa Cruz
Departamento de Ciências Biológicas
Campus de Ilhéus

Profa. Adjunta Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Instituto de Ciências e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Dra. Katia de Araujo Prado Ferreira Leite

Universidade Federal de São Paulo
Departamento de Patologia
Campus de São Paulo

São José dos Campos, 29 de Outubro de 2020.

DEDICATÓRIA

A minha mãe, **Miriam Romagnoli**, pela minha educação, e por sempre me mostrar que o conhecimento é a única coisa que se adquire que é só seu e ninguém tira, por toda minha infância, adolescência e vida adulta, por ser mãe, pai e amiga.

Ao meu marido e melhor amigo, **Vitor Yu**, pelo carinho, paciência e dedicação. Tê-lo ao meu lado tornou minha caminhada muito mais feliz, suave e me deu forças para seguir em frente.

A minha amiga, **Tânia Bontempo**, pelo carinho e apoio incondicional, sem o qual não seria possível superar os obstáculos que tive até chegar aqui.

Aos meus irmãos, **César** (*in memoriam*) e **Angélica**, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes. A vocês dedico minha vontade de viver intensamente.

A minha família, **Romagnoli**, a todos meus tios, primos e primas, por todo carinho e admiração, espero continuar a ser exemplo a minhas primas mais novas.

A professora, **Luciane Dias de Oliveira**, pelo carinho e apoio, sem o qual não seria possível superar mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À DEUS.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Aos discentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Lucas, Pâmela, Thaís, Karine e Marcela.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.

Ao Grupo Policlín, na pessoa do Prof. Dr. João Manoel Theotônio.

À Global diagnose, e aos meus colegas de serviço.

À equipe do controle de infecção hospitalar do Hospital Regional de São José dos Campos.

“Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo.” Fernando Pessoa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 PROPOSIÇÃO.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato.....	18
3.1.1 Cepas.....	18
3.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para os micro-organismos aeróbios.....	20
3.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sob biofilmes monotípicos.....	22
3.1.3.1 Tratamento.....	23
3.1.3.2 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT....	23
3.1.3.3 Cultivo celular	24
3.1.3.4 Teste de MTT.....	25
3.2 Análise Estatística.....	25
4 RESULTADO	26
4.1 Atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição em caldo (CIM e CMM).....	26
4.2 Atividade antibiofilme.....	30
4.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos por meio do teste de MTT...41	
4.3.1 Citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCat).....	41
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO.....	54

Yu RA. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de diferentes extratos naturais sobre cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos naturais de alecrim, bardana, romã e cavalinha, sobre oito cepas de micro-organismos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM); b) avaliar a atividade antibiofilme dos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana em cultura planctônica sobre cepas multirresistentes de *A. baumannii* no tempo de 5 minutos; c) avaliar a citotoxicidade das concentrações mais efetivas dos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana nos testes em cultura planctônica sobre queratinócitos, em ensaio da atividade mitocondrial celular pelo método MTT, no tempo de 5 minutos. Para a determinação da CIM e CMM dos extratos utilizou-se o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M27-A21 (CLSI, 2002) suplementada por M27-S4 (CLSI, 2012). Este teste foi realizado sobre 8 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e 4 extratos, perfazendo 32 grupos experimentais (n=8). Os extratos que apresentaram ação bacteriostática ou bactericida nos testes anteriores foram avaliados sobre biofilmes monomicrobianos (8 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*), no tempo de contato de cinco minutos. As concentrações dos extratos, que apresentaram ação anti-biofilme sobre as cepas bacterianas analisadas, foram submetidas à análise de citotoxicidade em queratinócitos humanos. A avaliação foi realizada por meio do teste colorimétrico MTT, que analisou a atividade mitocondrial celular, após contato dos extratos por 5 min. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA e Tukey Test, sendo considerada diferença estatística significativa quando $p \leq 0,05$. O extrato de romã apresentou CIM e CMM para todas as cepas analisadas, em quanto o extrato de alecrim apresentou CIM e CMM para 6 cepas das 8 analisadas, ambos apresentaram redução de biofilme, entretanto, romã foi o que apresentou as maiores reduções para a maioria das cepas. O extrato de romã apresentou viabilidade celular superior a 80% na maioria das concentrações e o alecrim apresentou viabilidade celular para 5 concentrações das 8 analisadas. Com isso pode-se concluir que o extrato de romã apresentou um melhor resultado comparado aos outros extratos, pois demonstrou uma significativa atividade antimicrobiana e antibiofilme e ausência de toxicidade conforme tempo de aplicação e concentração utilizada contra as cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, podendo ser considerado potencial agente terapêutico para o combate destes patógenos.

Palavras-chave: Micro-organismos multirresistentes. Extratos de plantas. *Acinetobacter baumannii*

Yu RA. *Antimicrobial activity and antibiofilm of different natural extracts on multidrug resistant Acinetobacter baumannii strains [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.*

ABSTRACT

The objective of the present work was: a) to evaluate the antimicrobial activity of the natural extracts of rosemary, burdock, pomegranate and horsetail on eight strains of multidrug resistant Acinetobacter baumannii microorganisms in planktonic culture, verifying the minimum inhibitory concentration and minimum microbicidal concentration (MIC) and CMM); b) evaluate the antibiofilm activity of extracts that showed antimicrobial activity in planktonic culture on multi-resistant strains of A. baumannii within 5 minutes; c) to evaluate the cytotoxicity of the most effective concentrations of the extracts that showed antimicrobial activity in the tests in planktonic culture on keratinocytes, in an assay of cellular mitochondrial activity by the MTT method, in 5 minutes. For the determination of the minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal (CMM) concentrations of the extracts, the broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standard M27-A21 (CLSI, 2002) supplemented by M27 was used. -S4 (CLSI, 2012). This test was performed on 8 clinical strains of Acinetobacter baumannii and 4 extracts, making 32 experimental groups (n = 8). The extracts that showed bacteriostatic or bactericidal action in the previous tests were evaluated on monomicrobial biofilms (8 clinical strains of Acinetobacter baumannii) at contact time of 5 minutes. The concentrations of the extracts, which showed anti-biofilm action on the bacterial strains analyzed, were submitted to cytotoxicity analysis in human keratinocytes. The evaluation was performed by the MTT colorimetric test, which analyzed the mitochondrial cellular activity, after contact of the extracts for 5 min. The results were statistically analyzed by ANOVA and Tukey Test, being considered statistically significant difference when $p \leq 0.05$. Pomegranate extract showed MIC and CMM for all strains analyzed, while rosemary extract showed MIC and CMM for 6 strains of the 8 analyzed, both showed reduced biofilm, however, pomegranate was the one that showed the greatest reductions for most of the strains. Pomegranate extract showed cell viability greater than 80% in most concentrations and rosemary showed cell viability for 5 concentrations of the 8 analyzed. Therefore it can be concluded that the pomegranate extract presented a better result compared to the other extracts, since it demonstrated a significant antimicrobial and antibiofilm activity and absence of toxicity according to the time of application and concentration used against the multidrug-resistant clinical strains of Acinetobacter baumannii, which can be considered a potential therapeutic agent to combat these pathogens.

Keywords: Multiresistant microorganisms. Plant extracts. Acinetobacter baumannii.

1 INTRODUÇÃO

A infecção relacionada a assistência à saúde é mais prevalente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), e é considerada um grave problema de saúde pública segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil, aproximadamente 10% dos pacientes hospitalizados infectam-se frequentemente em consequência de procedimentos invasivos ou de terapia imunossupressora (Candido et al., 2012).

A microbiota associada às infecções oportunistas e quadros sépticos em pacientes atendidos em UTIs é complexa e a boca pode desempenhar o papel de importante reservatório de micro-organismos oportunistas, em particular os membros da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. e *Moraxella* sp (Gaetti-Jardim et al., 2011), que apresentam rápida disseminação e resistência a diversos agentes antimicrobianos amplamente utilizados na área médica e odontológica (Kusahara et al., 2012), e podem estar envolvidos em quadros infecciosos periodontais, e infecções graves em pacientes mantidos em UTI (Pérez-Chaparro et al., 2014; Sopena et al., 2014).

A família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* vêm ganhando destaque na literatura sobre a microbiota periodontal (Zhuang et al., 2014), principalmente em países em desenvolvimento, onde os pacientes apresentam maior prevalência dessas espécies, o que pode estar associado ao maior emprego de antimicrobianos nessas populações, selecionando espécies microbianas menos susceptíveis a esses agentes ou deficiência de saneamento básico (Botero et al., 2007). Em função de sua elevada ocorrência na saliva, que muito provavelmente reflete a contaminação do biofilme microbiano e das mucosas, possivelmente constitua o veículo de disseminação desses micro-organismos (Gaetti-Jardim et al., 2013).

O Centro para Controle e Prevenção de Doenças – CDC/EUA estima que, anualmente, pelo menos dois milhões de doenças e 23.000 mortes são causadas por bactérias resistentes aos antibióticos nos Estados Unidos (Anvisa, 2017). Estas Infecções podem ser causadas por bactérias multirresistentes tais como os estafilococos resistentes à metilicina, enterobactérias e *Pseudomonas*.

A correta identificação do micro-organismo causador pode fornecer alguma indicação em relação à sua fonte, todavia, certos patógenos têm significado especial porque podem causar grandes surtos em todo hospital (Queiroz et al., 2012; Kannappan et al., 2019). Pacientes que tem longa permanência hospitalar, uso prévio de antibiótico, severidade das doenças de base (hipertensão arterial severa, diabete, infecção dos rins, nefrites, doenças hereditárias, pedra nos rins, obstruções), deficiência imunológica, queimaduras graves e cirurgia extensa, possuem alto risco para infecção ou colonização por bacilos Gram-negativos em função das altas taxas de resistência aos antimicrobianos de última geração disponíveis para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias (MacVane, 2017; Anvisa, 2017).

Os bacilos Gram-negativos multirresistentes são classificados em dois grandes grupos, o grupo dos Bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose geralmente relacionados a infecções do trato respiratório. São representados, principalmente, por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (Martins, Barth, 2013; El Chakhtoura et al., 2018).

A relação entre esses bacilos Gram-negativos e as enfermidades periodontais vem sendo realçada, principalmente para *A. baumannii*, sendo que tais patógenos apresentam amplo arsenal de virulência capaz de agredir os tecidos periodontais do hospedeiro, como enzimas proteolíticas, exotoxinas e endotoxina, além de grande capacidade de aderência, capacidade de invasão celular e resistência aos antimicrobianos (Antipa et al., 2014). Muitas UTIs brasileiras convivem com cepas de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis, representando um alto custo no tratamento dos pacientes infectados (Oliveira et al., 2019).

Os principais agentes do grupo de bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose são: *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e outros. Estão envolvidos em quase todas as infecções adquiridas em UTI, particularmente infecções respiratórias e infecções urinárias. São relatadas em muitos hospitais taxas de resistência elevada à quinolonas, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, em geral, por produção de beta-lactamases (Xiao, Hu, 2017).

Os micro-organismos Gram-negativos multirresistentes mais comumente encontrados na UTI do Hospital Particular de referência para este estudo em São José dos Campos, São Paulo, de Julho de 2015 a Junho de 2019 foram: *Klebsiella pneumoniae* (41,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (10%), *Escherichia coli* (8,4%), *Acinetobacter baumannii* (4,2%), *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella oxytoca* (ambos com 2,8%) e *Moraxella* spp (1,4%).

Nesse estudo pretende-se avaliar fundamentalmente cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, por ser um dos principais causadores destas infecções em UTIs brasileiras, segundo lista de micro-organismos críticos divulgada pela Organização Mundial da Saúde *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos está em primeiro lugar na prioridade crítica para novos antibióticos, por ser uma bactéria que pode causar infecções graves e frequentemente mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia (OMS, consulta em 25/06/2019). *Acinetobacter baumannii* é o patógeno humano mais relevante do gênero *Acinetobacter*, provoca infecções oportunistas, afetando mais frequentemente as vias respiratórias e o trato urinário, podendo causar pneumonias severas e infecções urinárias (ITU) de difícil controle, estando associada a uma elevada taxa (30%) de mortalidade (Chen et al., 2005).

As contaminações por cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* são um problema comum nos hospitais das regiões mais desenvolvidas do mundo, com destaque para a América do Norte e a Europa. Causam nos seres humanos uma ampla variedade de quadros infecciosos, razão pela qual a bactéria é considerada um importante agente patogénico afetando feridos, nomeadamente os feridos de guerra e vítimas de politraumatismo, nos quais provoca infecções graves, frequentemente fatais, entre elas a fasciite necrosante (Charnot-Katsika et al., 2009; Sullivan, Shields, Netzer, 2010). Em um estudo realizado em um hospital particular da Romênia o micro-organismo mais comumente isolado foi o *Acinetobacter baumannii* (22,2% no geral), isolado especialmente do trato respiratório e resistente a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos (Zaha et al., 2019).

A forma mais comum de entrada de *A. baumannii* no corpo humano é através de feridas abertas, sendo que em ambiente hospitalar as vias mais

comuns são os cateteres, sondas nasogástricas e tubos orotraqueais utilizados na intubação endotraqueal de pacientes. Sendo um patógeno oportunista, em geral infecta apenas indivíduos com sistema imunológico comprometido, tais como feridos com gravidade, idosos, crianças e portadores de doenças que deprimem o sistema imunológico (como a AIDS) (Patrice Nordmann et al., 2019).

A simples infestação não apresenta riscos particulares, já que a colonização não provoca morbidez em indivíduos que não estejam doentes. Por essa razão, profissionais de saúde e visitantes portadores assintomáticos da bactéria podem promover inadvertidamente a sua disseminação, provocando a infestação de hospitais, centros de saúde e outras estruturas frequentadas por indivíduos susceptíveis, o que faz da iatrogenia o mecanismo mais frequente de infecção (Silberman, 2017).

A primeira linha de tratamento é em geral a aplicação de um antibiótico do grupo dos carbapenêmicos, nomeadamente imipenem, embora a resistência a esse grupo de antibióticos seja cada vez mais comum, complicando assim seu tratamento. Outras opções de tratamento incluem administrar polimixinas, tigeciclina ou aminoglicosídeos (Bassetti et al., 2008, Carvalho et al., 2015, Vijayakumar et al., 2019).

O espectro de sensibilidade a antibióticos de cepas isoladas difere de acordo com os departamentos do hospital, os próprios hospitais e os países. Discrepâncias também existem em termo de uso de antibióticos e dosagem. A utilização de antimicrobianos em UTIs é muito maior em comparação as enfermarias médicas e cirúrgicas (Rocío et al., 2019).

Algumas medidas de prevenção são recomendadas, como: identificar precocemente o paciente colonizado ou com infecção, identificação do isolamento por meio de placa ilustrativa, higienização das mãos, usar avental limpo, respeitar as medidas de isolamento de contato preconizadas pela comissão do serviço de controle de infecção relacionada a assistência à saúde hospitalar (SCIRAS), dentre outras (CDC, acesso em 06/09/2016). Entretanto, apesar de todos os cuidados adotados, a prevalência destas infecções vem aumentando, seu tratamento é dispendioso podendo agravar substancialmente os custos das unidades de saúde contaminadas e fazer crescer significativamente as taxas de morbidade e mortalidade entre os pacientes

atendidos nas suas instalações. A antibioticoterapia tem sido, em muitas das vezes, ineficaz. Neste contexto a utilização de fitoterápicos para a prevenção destas infecções e, eventualmente, como coadjuvantes no tratamento, pode ter um importante papel.

O conhecimento histórico do uso de plantas medicinais demonstra ao longo da história da humanidade que, pela própria necessidade do homem, elas foram um dos primeiros recursos terapêuticos disponíveis, inclusive sendo utilizadas na arte de embalsamar cadáveres pelos antigos egípcios (Fluit et al., 2000). Tais plantas constituem uma imensa fonte de compostos de ampla atividade biológica e a utilização delas, principalmente no tratamento de doenças infecciosas, representa uma grande contribuição para a descoberta de novos agentes terapêuticos no combate de micro-organismos multirresistentes (Oliveira et al., 2002; Cheesman et al., 2017).

Vários extratos vêm sendo testados na forma farmacêutica, colutório para bochecho, e foi a partir de estudos científicos, iniciados com conhecimento popular, que pôde-se comprovar a eficácia clínica do uso de colutórios, que são soluções de aplicação local na cavidade bucal e na porção superior da laringe que contêm frequentemente substâncias antissépticas e que não devem ser engolidas (Marinho, Araujo, 2007; Vinagre, 2011).

A busca por novos fitoterápicos capazes de erradicar micro-organismos causadores de infecção está em ascensão, e os fitoterápicos conferem benefícios à saúde por apresentarem possibilidades de tratamento menos agressivos ao organismo e tendo sua ação potencializada, pois um mesmo fitofármaco pode possuir princípios ativos com atribuições diferentes (Vinagre, 2011).

Um estudo piloto realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade antimicrobiana de oito diferentes tipos de extratos glicólicos, sendo eles: *Gymnema sylvestre*, *Hamamelis virginiana* L, *Juglans regia* L, *Persea americana*, *Pfaffia paniculata* K, *Rosmarinus officinalis* L, *Stryphnodendron barbatiman* e *Thymus vulgaris*. Segundo resultados obtidos nesse estudo, os extratos glicólicos de *Persea americana* (extrato de abacateiro) e *Hamamelis virginiana* (extrato de hamamélis) obtiveram melhor ação

antimicrobiana contra a cepa-padrão e três cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* (Paula-Ramos et al., 2016).

Contudo, como são muitas as possibilidades terapêuticas dos extratos naturais, torna-se de grande interesse estudar seus efeitos antimicrobianos sobre o *Acinetobacter baumannii* que assumiu o primeiro lugar de micro-organismo crítico na tabela da OMS em busca de novos fármacos. Alguns extratos naturais de interesse para esse estudo são: *Equisetum arvense L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Arctium lappa L.*, *Punica granatum L.*

Equisetum arvense L., a cavalinha ou rabo de cavalo comum, é uma planta perene herbácea, equisetopsida, nativa em todas as regiões árticas e temperadas do hemisfério norte. Sua utilização vem da época de Cristo. Plínio (77 dC) já se referia a sua capacidade hemostática. Na idade média foi utilizada como cicatrizante e anti-inflamatório, tanto para uso interno como externo. No século XVIII, Hoffmann a preconizava para uso em pacientes com “pedra nos rins”. Remineralizante (utilizado em consolidações de fraturas e doenças reumáticas), diurético poupador de potássio, hipotensor, hemostático (reduz hemorragias), anti-inflamatório e cicatrizante (Alonso, 1998). Sua composição química é formada por grande quantidade de silício e quantidades menores de cálcio, ferro, magnésio, tanino, sódio, ácido caféico, ácido fenol-carboxílico, ácido gálico, ácido palmítico, ácido silícico, apigenina, equisetonina, espermidina, glicosídeos flavônicos, luteolina, nicotina, sacarídeos, sais de potássio, saponinas, taninos, tiaminase. É adaptada a solos úmidos e por ser agressiva e persistente, deve-se cuidar para que não se torne uma erva daninha (Lorenzi, 2017).

Um estudo clínico realizado em uma clínica especializada em urologia na República Eslovaca, demonstrou que, tratamento de 12 semanas com uma mistura de extrato da semente da cavalinha foi altamente eficaz na incontinência urinária de esforço com eventos adversos mínimos demonstrando assim que mais estudos podem ser necessários para determinar a eficácia deste fitoterápico em outras populações (Gazová et al., 2018).

Rosmarinus officinalis L., o alecrim, foi uma das primeiras ervas utilizadas com finalidade medicinal. Na tradição popular européia, era usado para espantar o demônio e proteger contra pragas, além de preservar e temperar a carne. Nas

civilizações antigas, o alecrim era considerado uma planta sagrada que podia trazer paz tanto aos vivos quanto aos mortos. Na época da peste, era levado em bolsas e no pescoço como proteção. O alecrim é uma erva aromática comum na região do Mediterrâneo ocorrendo preferencialmente em solos de origem calcária. Devido ao seu aroma característico, os romanos designavam-no como *rosmarinus*, que em latim significa orvalho do mar (Lawless, 2014). O Alecrim estimula a circulação e atua como um tônico para o sistema nervoso, a pele, o coração, fígado e visícula biliar. Refrescante, antisséptico e antibacteriano é também diurético e purificador de uso geral. Tem propriedades antidepressivas e antifúngicas. Previne e reduz espasmos, alivia a flatulência e regula a digestão. Elimina o catarro e a dor. A nível emocional, o óleo alivia a exaustão mental e ajuda na clareza da mente (Oliveira et al.,2017).

Arctium lappa L., a bardana é uma planta originária da Eurásia e difundida na América. Prolifera em baldios, bermas de caminhos, e próxima de zonas habitadas. A fama da bardana vem de muito tempo: os gregos a utilizavam como medicamento, e na Idade Média era incluída em várias formulações destinadas à cura. Algumas referências sugerem que o seu nome científico *Arctium lappa* deriva do grego "*arctos*" (urso) e "*lambanô*" (eu tomo), em alusão ao aspecto peludo que apresenta (Koskoka et al., 2002). Valorizada como medicinal desde a antiguidade, a bardana nunca teve essa fama contestada. Todas as partes da planta eram usadas de alguma forma como medicamento: as folhas, por exemplo, eram bem amassadas e aplicadas em cataplasmas para tratar inúmeras doenças de pele, em razão de sua ação bactericida. O uso atualmente tem respaldo científico: estudos comprovam as suas propriedades antissépticas. Também foram bem difundidos seus poderes contra picadas de insetos e aranhas por sua propriedade de acalmar a dor (ação anestésica) e evitar a tumefação do local (ação anti-inflamatória) (Dou et al., 2009; Bavia et al., 2019).

Punica granatum L., a romã, contém alcalóides como a pelieterina e isopelieterina; e os taninos gálicos. São famosas as romãs da Provença, de Malta, da Espanha, da Itália. O seu cultivo é realizado em mais de 100 países do mundo. Dos países do Mediterrâneo, atravessou o Atlântico e acabou aportando no Brasil (Oliveira et al., 2006)..

Estudos publicados em artigos apontam atividades antimicrobiana e anti-inflamatória na odontologia e em especialidades médicas (Werkman, 2008). Na Índia, um estudo realizado com a mistura de extrato de romã, em infecções de feridas causadas por diferentes micro-organismos multirresistentes, entre eles *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* spp e *Acinetobacter* spp, demonstrou ter potencial de atividade antimicrobiana contra essas cepas predominantes de feridas sépticas o que torna relevante testar esse extrato em micro-organismos de outras regiões (Pallavali et al., 2019).

O uso de plantas com finalidade terapêutica é significativo, dados da Organização Mundial de Saúde (Brasil, 2006) mostram que cerca de 85% da população mundial usou alguma planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (Oliveira et al., 2006). Desse total, somente 30% deu-se por indicação médica. O estudo de plantas medicinais tem recebido incentivos da Organização Mundial da Saúde. Segundo Yonath (2019) “se não criarmos novos antibióticos as pessoas morrerão aos 50 ou 60 anos, como antes”.

A disseminação de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos levou a um grande problema de saúde mundial. Por isso, é importante encontrar um ou mais extratos de plantas que tenha ação antimicrobiana sabendo a dose que é eficaz para fazer a inibição da bactéria sem ser tóxico para o organismo humano em associação para poder ser utilizado como ferramenta de tratamento confiável e rápido para combater cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e permitir uma recuperação bem-sucedida ao paciente.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas frente a cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos naturais de romã, alecrim, bardana e cavalinha. sobre cepas de micro-organismos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM);
- b) avaliar a atividade antibiofilme dos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana em cultura planctônica sobre cepas multirresistentes de *A. baumannii* no tempo de 5 minutos;
- c) avaliar a citotoxicidade das concentrações mais efetivas dos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana nos testes em cultura planctônica sobre queratinócitos, em ensaio da atividade mitocondrial celular pelo método MTT, no tempo de 5 minutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos os extratos glicólicos de *Arctium lappa* (Bardana), *Equisetum arvense* (Cavalinha), *Punica granatum* (Romã) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) (Mapric, São Paulo, SP), com os devidos laudos e especificações (Anexos A,B,C e D) atestando a veracidade das espécies vegetais.

O extrato de bardana foi formulado a partir da raiz da planta; enquanto o extrato de cavalinha foi obtido a partir do caule e parte áreas da planta; já o extrato de romã foi formulado a partir da casca da árvore; e por fim o extrato de alecrim foi obtido a partir das folhas da erva. Todos os extratos foram obtidos na concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol.

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato

3.1.1 Cepas

As oito cepas multirresistentes de *Acinetobacter Baumannii* utilizadas no presente trabalho, são provenientes da coleção de cepas do Laboratório particular que presta serviço a um Hospital particular de São José dos Campos, SP, utilizado como referência nesse estudo. O perfil de resistência de cada uma das cepas esta presente no quadro 1. Tanto a identificação como o antibiograma das cepas foram realizados pelo sistema semi-automatizado MicroSCAN 4. Trata-se de um método de microdiluição em caldo com reações bioquímicas e leitura óptica das placas. Para exclusão de contaminação das cepas, as mesmas foram semeadas em ágar MacConkey (bioMérieux Brasil) e incubadas por 24 h em estufa bacteriológica a 37°C. Passado o período de incubação foi verificada a coloração e morfologia das colônias além da coloração do meio de cultura, onde *A. baumannii* apresentou colônias levemente rosadas normalmente

cremosas mas que podem eventualmente ter aspecto mucoide, como mostra a figura 1.

Quadro 1 – Perfil de resistência dos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* frente a antimicrobianos convencionais

Antimicrobianos convencionais	<i>Acinetobacter baumani</i> (cepas: H718, H557, H652, HC656, H571, H6004, H6005 e H6006)
Amicacina	Sensível (S) ou Resistente (R)
Amp/Subactam	S ou R
Cefepime	S ou R
Cefoxitina	S ou R
Ceftazidima	S ou R
Ciprofloxacina	S ou R
Cloranfenicol	S ou R
Gentamicina	S ou R
Meropenem	Resistente (todas as cepas)
Imipenem	Resistente (todas as cepas)
Ertapenem	Resistente (todas as cepas)
Sulfazotrim	S ou R
Tetraciclina	S ou R

Legenda: Dados fornecidos pelo sistema MicroSCAN 4, provenientes do laboratório Particular, São José dos Campos – SP.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Cepa de *Acinetobacter baumannii* semeada em ágar MacConkey para exclusão de contaminação



Legenda: Na figura, observa-se colônias levemente rosadas e cremosas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para os micro-organismos aeróbios

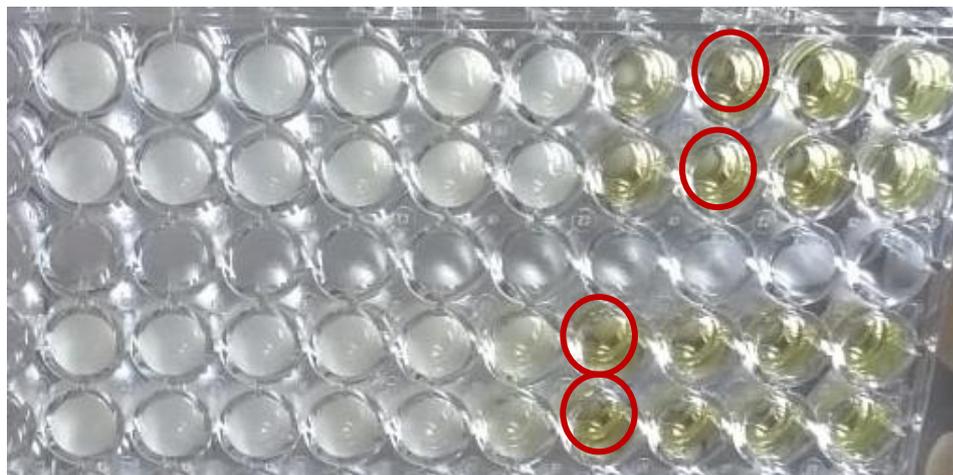
Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A6 (2012). Para isso as bactérias foram reativadas do congelamento a -80°C , em ágar *Brain Heart Infusion* (Himedia, Mumbai, Índia) com incubação de 24h/ 37°C . Após reativação das cepas foi realizado a preparação do inóculo, onde colônias isoladas foram transferidas para um tubo contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), posteriormente foi realizado o ajuste da turbidez desta solução, padronizando a solução em espectrofotômetro, densidade óptica de 625 nm (nanômetros), na concentração de 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil).

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), onde foram adicionados 100 μL do caldo *Mueller Hinton* (Himedia, Mumbai, India) em 10 poços por grupo teste. Após adição do meio de cultura, foi realizada a diluição dos extratos, para isso foram adicionados 100 μL dos

extratos apenas no primeiro poço da microplaca de cada grupo teste, de onde foi iniciada uma série de diluições (1:2) até a décima diluição. Todos os grupos experimentais foram testados em duplicata para cada cepa e extrato.

Após o preparo das diluições do extrato, foram adicionados os inóculos padronizados, inserindo 100 μL da suspensão de micro-organismo em cada poço da microplaca de 96 poços. A placa foi incubada em estufa bacteriológica por 24h/37°C, posteriormente foi realizada a determinação da CIM, sendo o poço com a menor concentração do extrato que não apresentou turvação, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Microplaca de 96 poços para determinação da CIM



Legenda: Círculos vermelhos indicam o poço com menor concentração do extrato que não apresentaram turvação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que a CMM dos extratos fosse determinada, foram semeados 10 μL da CIM, bem como 10 μL de uma concentração acima e de uma concentração abaixo dela em ágar Brain Heart Infusion Brot (BHI). Após 48h de incubação, a CMM foi determinada na menor concentração semeada que não apresentou crescimento de colônias, como mostra a figura 3.

Figura 3 – Placas após semeadura e incubação para verificação da concentração microbicida mínima (CMM)



Legenda: Traços em branco (números de 6 a 8) indicam o crescimento do micro-organismo nas respectivas concentrações do extrato aplicado a microplaca de 96 poços; os números de 1 a 5 representam as concentrações do extrato em que não houve crescimento das colônias, sendo 1 = 100 mg/mL, 2 = 50 mg/mL, 3 = 25 mg/mL, 4 = 12,5 mg/mL e 5 = 6,25 mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes monotípicos

A atividade antimicrobiana sobre biofilmes se baseou na triagem promovida pelo teste de microdiluição em caldo, onde dois extratos demonstraram valores de CIM e CMM, sendo eles *R. officinalis* (alecrim) e *P. granatum* (Romã), assim os dois extratos foram aplicados em diferentes concentrações sobre os biofilmes.

Para a montagem dos biofilmes foram adicionados em placas de microtitulação de 96 poços (TPP, Suíça) 200 μ L/poço de suspensões microbianas padronizadas em espectrofotômetro. Para isso, colônias das respectivas cepas foram diluídas em Caldo Brain Heart Infusion (Himedia, Mumbai, Índia), posteriormente a padronização foi realizada utilizando o comprimento de onda de 625 nm obtendo a densidade óptica de 0,080 (+ 0,010) (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) resultando na concentração de 10^7 UFC/mL. Após a placa foi incubada em estufa bacteriológica por 48h, com a substituição

do meio de cultivo em 24h, em seguida as placas foram encaminhadas para aplicação dos tratamentos.

3.1.3.1 Tratamento

Passado o período de formação de cada biofilme (8 cepas), este foi colocado em contato com os extratos separadamente, pelo período de 5 min, e 3 concentrações microbicidas pré-determinadas (CMM) e superiores, totalizando 48 grupos. Como controle foi utilizado o próprio meio de cultura (BHI). Posteriormente a aplicação dos extratos os biofilmes foram lavados com solução salina estéril 0,9%, para remoção das células bacterianas afetadas pelo tratamento, em seguida foram encaminhados para os testes de mensuração. A mensuração dos biofilmes foi através do teste de MTT, evidenciando a atividade metabólica dos micro-organismos. Foram realizados 2 experimentos independentes, com 6 repetições cada, totalizando n=12 para cada grupo experimental.

3.1.3.2 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT

Após submetido aos respectivos tratamentos o biofilme foi preparado para o teste de MTT, para isso foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), composta por 5 miligramas diluídas em 10mL de caldo BHI, em seguida a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 hora em estufa a 37°C, passado o período de incubação a solução foi descartada seguido pela adição de 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sobe agitação constante por 10 minutos. A placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm, e as densidades ópticas foram convertidas, por meio da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo:

% Atividade metabólica = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle)

3.1.3.3 Cultivo celular

A cultura de Queratinócitos Humanos (HaCat), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, em umidade atmosférica e com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e após obtenção do estágio de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as células foram encaminhadas ao teste de toxicidade celular. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio da enzima tripsina (Sigma-Aldrich, EUA), após as mesmas foram centrifugadas por 5 min à 3000 rpm, e resuspendidas em meio de cultivo. Foi aplicado o teste de exclusão com azul de Trypan, para ser quantificado o número de células viáveis.

Para a avaliação da citotoxicidade 4 x 10⁴ células/mL foram transferidas para os poços de microplacas de 96 poços, onde foram nutridas com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e incubadas por 24 horas para a aderência celular. Após, as células foram submetidas a aplicação de 10 diferentes concentrações dos extratos de *P. granatum* e *R. officinalis* pelo tempo de contato de 5 minutos. Como controle foi utilizado o próprio meio de cultivo celular. Após os tratamentos as células foram encaminhadas ao teste de MTT.

3.1.3.4 Teste de MTT

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi realizada por meio do teste colorimétrico de MTT, que analisou a atividade mitocondrial celular, para isso foram adicionados 200 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) em cada poço da microplaca, seguido pela incubação ao abrigo da luz por 1 hora em estufa a 37°C. Passado o período, a solução foi retirada e foram adicionados 200 µL de Dimetilsufóxido (DMSO), a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sobe agitação constante por 10 minutos. Após a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm e as densidades ópticas obtidas serão convertidas por meio da fórmula:

% Viabilidade = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle).

3.2 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 5.0, onde foram submetidos ao teste de normalidade, cujos dados obtiveram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADO

4.1 Atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição em caldo (CIM e CMM)

O extrato de *Rosmarinus officinalis* L. (extrato de alecrim) teve ação antimicrobiana em 6 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* das 8 cepas avaliadas. Para as cepas de *Acinetobacter baumannii* H718 e H557 apresentou CIM de 25 mg/mL, para a cepa H652, H6004, H6005 e H6006 foi de 12,5 mg/mL. Esse extrato apresentou CMM de 50 mg/mL para a cepa H718, CMM de 25 mg/mL para a cepa H557 e para as cepas H652, H6004, H6005 e H6006 foi de 12,5 mg/mL (Tabela 1).

O extrato de *Arctium lappa* L. (extrato de bardana) teve ação antimicrobiana em 5 cepas clínicas de *A. baumannii* das 8 cepas avaliadas. Para as cepas de *Acinetobacter baumannii* H718, H6004, H6005 e H6006 apresentou CIM de 50 mg/mL e para a cepa H557 foi de 25 mg/mL. Esse extrato apresentou CMM de 50 mg/mL para as cepas H718, H557, H6004, H6005 e H6006 (Tabela 2).

O extrato de *Equisetum arvense* L. (extrato de cavalinha) teve ação antimicrobiana em 6 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* das 8 cepas avaliadas. Para as cepas de *Acinetobacter baumannii* H571, HC656, H6004, H6005 e H6006 apresentou CIM de 50 mg/mL e para a cepa H652 foi de 25 mg/mL. Esse extrato apresentou CMM de 50 mg/mL para as cepas H6005 e H6006 (Tabela 3).

O extrato de *Punica granatum* L. (extrato de romã) teve ação antimicrobiana nas 8 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* das 8 cepas avaliadas. Para as cepas de *Acinetobacter baumannii* H718, H557, H652, H656, H6004, H6005 e H6006 apresentou CIM de 3,12 mg/mL e para a cepa H571 foi de 0,78 mg/mL. Esse extrato apresentou CMM de 3,12 mg/mL para as cepas H718, H557, H6004, H6005 e H6006, CMM de 12,5 mg/mL para a cepa H652, CMM de 6,12 mg/mL para a cepa HC656 e para a cepa H571 foi de 0,78 mg/mL (Tabela 4).

Tabela 1 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de alecrim para 8 cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, determinando CIM e CMM

CEPA	CIM	CMM
H718	25 mg/mL	50 mg/mL
H557	25 mg/mL	25 mg/mL
H652	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
HC656	Ausente	Ausente
H571	Ausente	Ausente
H6004	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
H6005	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
H6006	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL

Legenda: CIM = Concentração inibitória mínima; CMM = Concentração microbicida mínima

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de bardana para 8 cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, determinando CIM e CMM

CEPA	CIM	CMM
H718	50 mg/mL	50 mg/mL
H557	25 mg/mL	50 mg/mL
H652	Ausente	Ausente
HC656	Ausente	Ausente
H571	Ausente	Ausente
H6004	50 mg/mL	50 mg/mL
H6005	50 mg/mL	50 mg/mL
H6006	50 mg/mL	50 mg/mL

Legenda: CIM = Concentração inibitória mínima; CMM = Concentração microbicida mínima

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de cavalinha para 8 cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, determinando CIM e CMM

CEPA	CIM	CMM
H718	Ausente	Ausente
H557	Ausente	Ausente
H652	25 mg/mL	Ausente
HC656	50 mg/mL	Ausente
H571	50 mg/mL	Ausente
H6004	50 mg/mL	Ausente
H6005	50 mg/mL	50 mg/mL
H6006	50 mg/mL	50 mg/mL

Legenda: CIM = Concentração inibitória mínima; CMM = Concentração microbicida mínima

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de romã para 8 cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, determinando CIM e CMM

CEPA	CIM	CMM
H718	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL
H557	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL
H652	3,12 mg/mL	12,5 mg/mL
HC656	3,12 mg/mL	12,5 mg/mL
H571	0,78 mg/mL	0,78 mg/mL
H6004	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL
H6005	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL
H6006	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL

Legenda: CIM = Concentração inibitória mínima; CMM = Concentração microbicida mínima

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Atividade antibiofilme

Com base nos resultados obtidos na cultura planctônica foram escolhidos os extratos de *R. officinalis* (alecrim) e *P. granatum* (romã) para continuidade dos testes antibiofilme nas concentrações determinadas a partir do resultado da CMM para a forma planctônica de cada cepa. Foram utilizadas 3 concentrações microbicidas pré-determinadas (CMM) e superiores (Quadro 2).

Quadro 2 – Concentrações dos extratos utilizadas para tratamentos em biofilmes monotípicos de cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii*.

Cepas de <i>A. baumannii</i>	Concentração de extrato de <i>R. officinalis</i> (alecrim)			Concentração de extrato de <i>P. granatum</i> (romã)		
	0,76 mg/mL	3,12 mg/mL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
H557, H571, H652, H718, H6004, H6005, H6006, H6565						

Fonte: Elaborado pelo autor.

As porcentagens de redução de atividade metabólica em biofilmes monotípicos para cepas de *A. baumannii* podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Redução da atividade metabólica de *A. baumannii* após tratamento de 5 min

Cepas de <i>A. baumannii</i>	Redução da Atividade Metabólica (%)						
	Extrato de <i>R. officinalis</i> (alecrim)			Extrato de <i>P. granatum</i> (romã)			
Concentrações	0,76 mg/mL	3,12 mg/mL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	
H557	5,94%	20,6%	3,08%	12,3%	0,58%	87,8%	
H571	15,11%	29,8%	7,66%	33,8%	44%	94,9%	
H652	37,4%	40,4%	44,2%	21,1%	31,8%	74,6%	
H718	30,4%	35,5%	32,2%	31,6%	31,0%	71,4%	
H6004	+2,88%	14,8%	23,3%	33,8%	44,0%	94,9%	
H6005	+14,2%	+8,0%	19,3%	37,0%	43,3%	13,0%	
H6006	+56,3%	+27,2%	4,10%	33,2%	16,6%	+50,0%	
H6565	57,7%	55,5%	53,2%	39,9%	44,6%	84,5%	

Legenda: Médias de redução da atividade metabólica apresentadas pelos biofilmes monotípicos de cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* após o tratamento de 5 min com os extratos glicólicos de alecrim e romã com concentrações previamente determinadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as cepas de *A. baumannii* apresentaram distribuição normal em seus dados, sendo analisadas pelo método ANOVA com teste de Tukey.

Comparando os resultados de redução de atividade metabólica em biofilmes monotípicos de cepas clínicas de *A. baumannii*, é possível observar

que o extrato de alecrim apresentou reduções que variam entre 3,08% a 57,7%, apresentando maior redução para cinco cepas clínicas em relação ao controle (tabela 5). O extrato de romã apresentou reduções que variam entre 0,58% a 94,9%, apresentando maior redução para sete cepas clínicas em relação ao controle (tabela 5).

Ambos os extratos apresentaram redução de atividade metabólica em biofilme significativa para todas as cepas, com resultados estatisticamente diferentes do controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$) (Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

Para a cepa H557, o tratamento com o extrato de alecrim na concentração de 3,12 mg/mL e com o extrato de romã na concentração de 50 mg/mL apresentaram redução significativa em relação ao controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$), sendo que o extrato de romã na concentração de 50 mg/mL apresentou uma redução significativamente maior do que a cepa de alecrim em relação ao controle ($p > 0,05\%$) (Figura 4).

O extrato de romã apresentou redução de atividade metabólica maior do que o controle para a cepa H571 em todas as diferentes concentrações, sendo semelhantes entre si nas concentrações de 12,5 mg/mL e 25 mg/mL, e superior a elas em comparação ao controle na concentração de 50 mg/mL ($p \leq 0,05\%$), no entanto, o extrato de alecrim demonstrou significativa redução para a cepa H571 em relação ao controle de crescimento para duas concentrações (3,12 mg/mL e 0,76 mg/mL) semelhantes entre si e superiores ao controle ($p \leq 0,05\%$) (Figura 5).

O extrato de alecrim apresentou redução significativa do biofilme para a cepa H652 em comparação ao controle de crescimento em duas concentrações (12,5 mg/mL e 3,12 mg/mL) semelhantes entre si e significativas em relação ao controle ($p \leq 0,05\%$), sendo que para o extrato de romã a redução foi semelhante ao extrato de alecrim e ao controle na concentração de 25 mg/mL ($p > 0,05\%$) e apresentou redução significativa em comparação ao controle na concentração de 50 mg/mL ($p > 0,05\%$) não apresentando redução na concentração de 12,5 mg/mL em relação ao controle ($p > 0,05\%$), (Figuras 6).

Ambos os extratos reduziram significativamente a atividade metabólica da cepa H718 sendo semelhantes entre si, com exceção a concentração de 50 mg/mL do extrato de romã que apresentou uma redução maior e significativa em comparação ao controle e as demais concentrações de ambos os extratos ($p > 0,05\%$) (Figura 7).

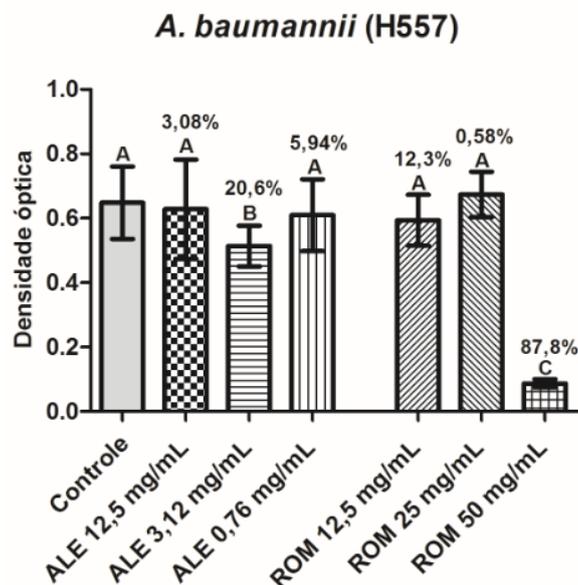
O extrato de romã apresentou redução significativa na atividade metabólica da cepa H6004 em todas as concentrações em comparação ao controle ($p > 0,05\%$) sendo que as concentrações de 12,5 mg/mL e 25 mg/mL apresentaram semelhanças entre si, e a concentração de 50 mg/mL apresentou redução superior as outras concentrações em relação ao controle ($p > 0,05\%$), no entanto o extrato de alecrim não apresentou redução na concentração de 0,76 mg/mL e nas concentrações de 3,12 mg/mL e 12,5 mg/mL apresentou semelhança ao controle ($p > 0,05\%$) (Figura 8).

O extrato de romã apresentou redução significativa do biofilme para a cepa H6005 em duas concentrações (12,5 mg/mL e 25 mg/mL) semelhantes entre si em relação ao controle e em uma concentração (50 mg/mL) apresentou semelhança ao controle ($p > 0,05\%$), o extrato de alecrim apresentou semelhança em relação ao controle em uma concentração (12,5 mg/mL) e não apresentou redução em relação ao controle em duas concentrações (0,76 mg/mL e 3,12 mg/mL) ($p > 0,05\%$) (Figura 9).

Ambos os extratos reduziram significativamente a atividade metabólica da cepa H6006 sendo que o extrato de alecrim apresentou semelhança entre as concentrações (0,76 mg/mL e 3,12 mg/mL) e redução significativa em comparação ao controle ($p > 0,05\%$) e para a concentração de 12,5 mg/mL apresentou semelhança em relação ao controle ($p > 0,05\%$), o extrato de romã apresentou redução significativa em todas as concentrações, porém na concentração de 25 mg/mL apresentou semelhança a concentração de 12,5 mg/mL e ao controle ($p > 0,05\%$) (Figura 10).

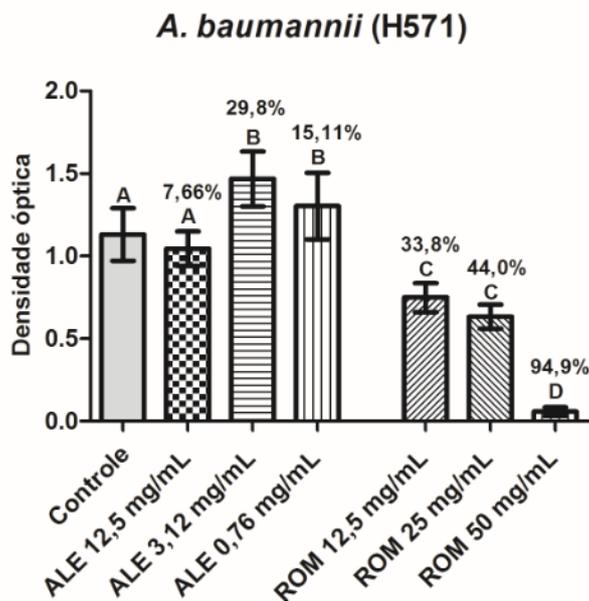
Ambos os extratos reduziram significativamente a atividade metabólica da cepa H6565 apresentando semelhança entre as concentrações e redução significativa em relação ao controle ($p > 0,05\%$), com exceção a concentração de 50 mg/mL do extrato de romã que apresentou uma redução maior do que as outras concentrações em relação ao controle ($p > 0,05\%$) (Figura 11).

Figura 4 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H557) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

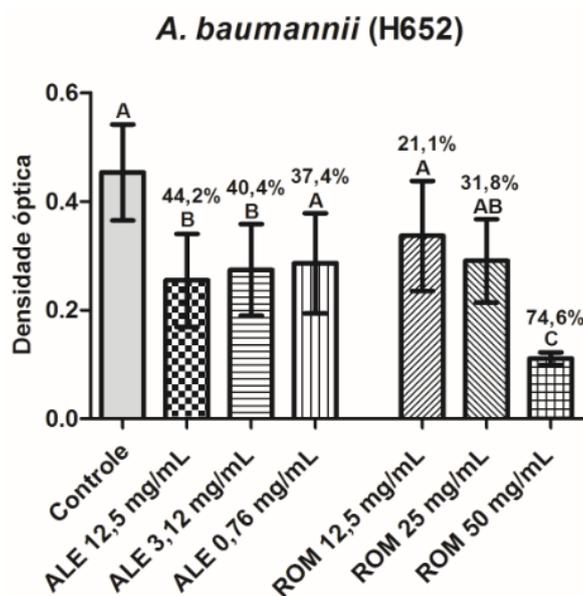
Figura 5 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H571) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c” e “D” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

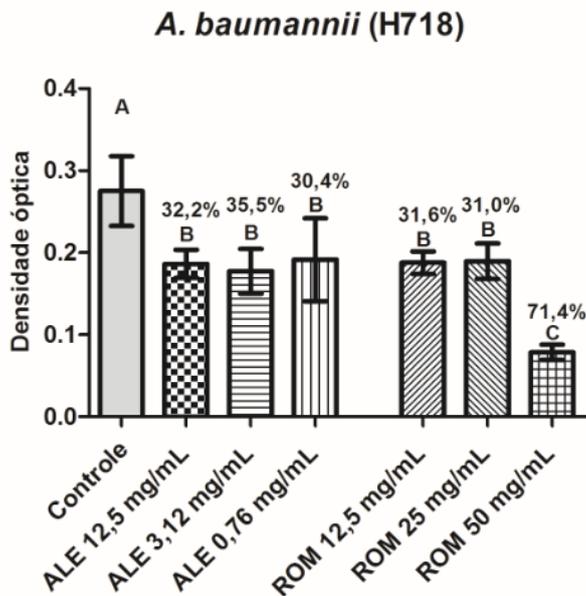
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H652) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



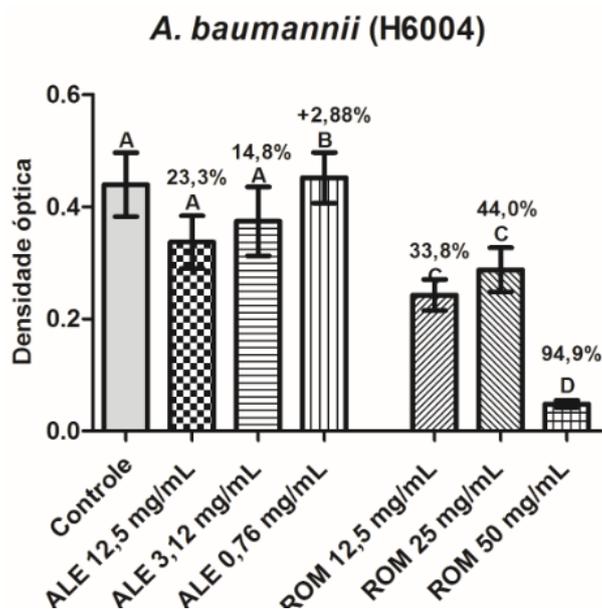
Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H718) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

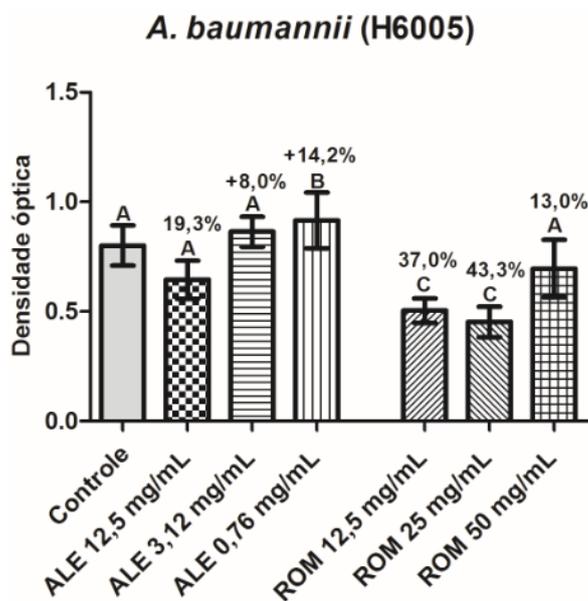
Figura 8 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H6004) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

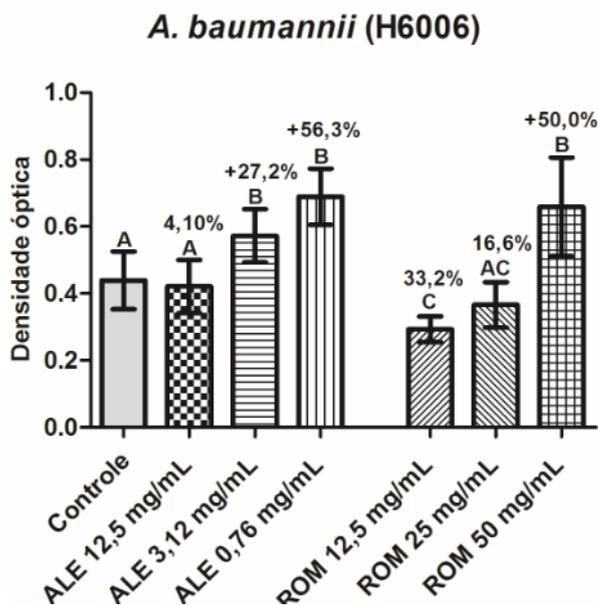
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H6005) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



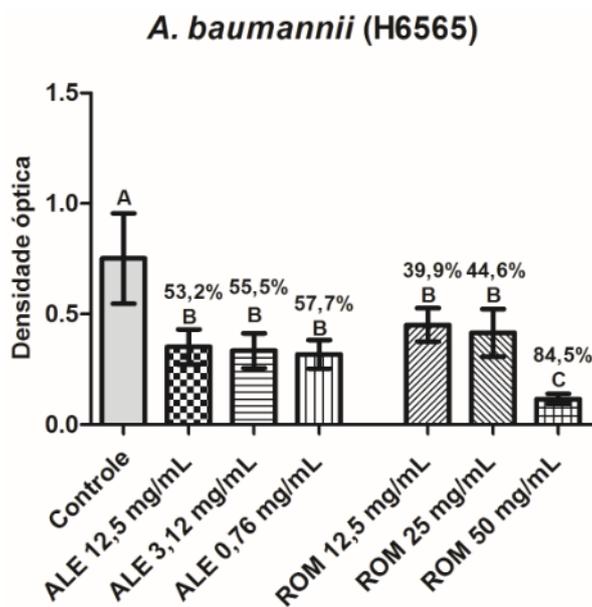
Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H6006) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b" e "c" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Demonstra a redução da viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* (cepa H6565) obtida em leitura de teste MTT após tratamentos de 5 min aplicados com as diferentes concentrações dos extratos de alecrim e romã



Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos por meio do teste de MTT

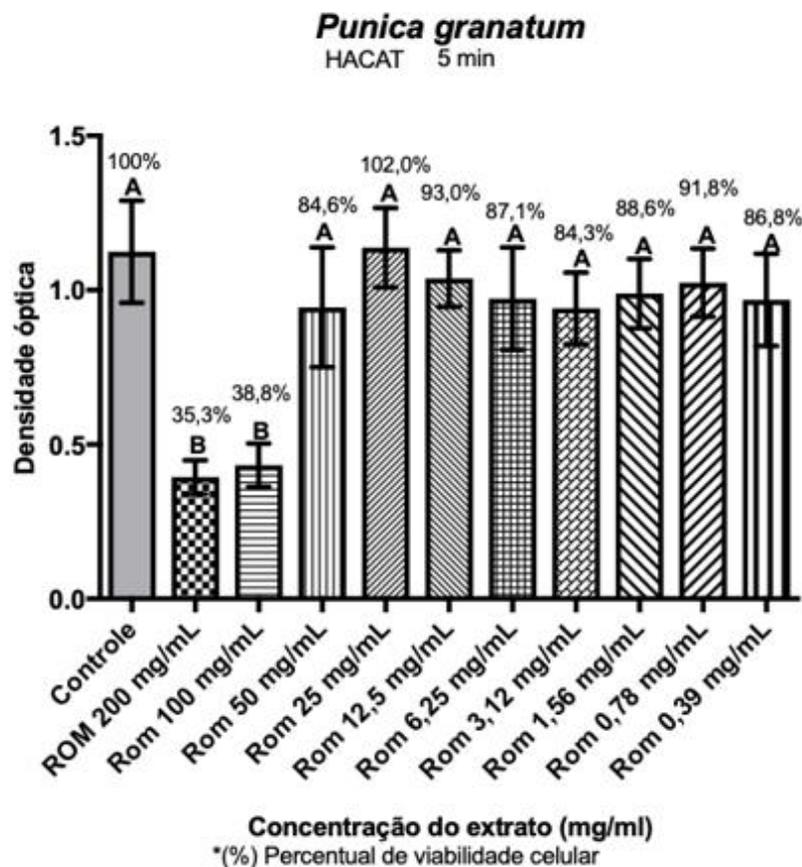
4.3.1 Citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCat)

O extrato de *P. granatum* aplicado por 5 min sobre os Queratinócitos humanos (HaCat) promoveu a viabilidade celular de 35,3%, 38,8%, 84,6%, 102,0%, 93,0%, 87,1%, 84,3%, 88,6%, 91,8% e 86,8% após contato com as concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 mg/mL. Todas as concentrações testadas do extrato de *P. granatum* demonstraram viabilidade celular, resultado este que também pode ser observado na análise estatística, 8 das 10 concentrações testadas do extrato de *P. granatum*

apresentaram semelhança entre elas e em relação ao controle (próprio meio de cultivo celular) (Figura 12).

O extrato de *R. officinalis* nas concentrações de 200; 100; 50; 25;12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 mg/mL obtiveram 20,4%, 12,3%, 20,0%, 54,4%, 65,5%, 57,3%, 55,0%, 44,5%, 52,8% e 41,4% de viabilidade celular. Todas as concentrações testadas do extrato de *R. officinalis* promoveram redução significativa em relação ao grupo controle, resultado este que também pode ser observado na análise estatística, 5 das 10 concentrações testadas do extrato de *R. officinalis* apresentaram redução significativa em relação ao controle (próprio meio de cultivo celular) (Figura 13).

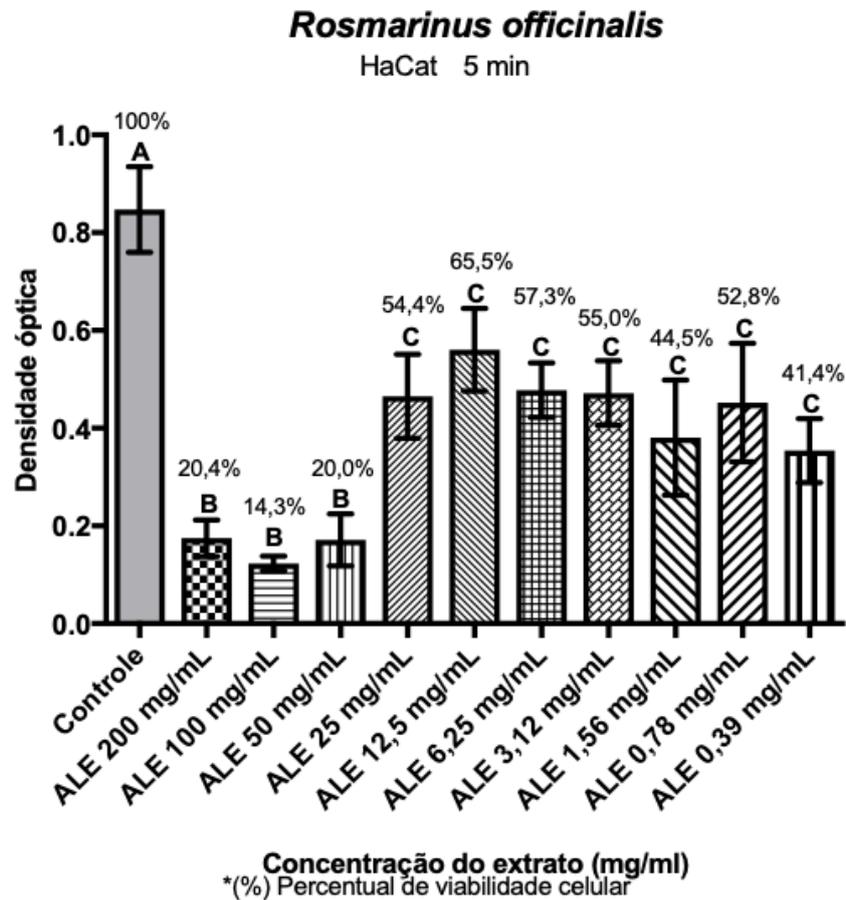
Figura 12 - Viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) após contato por 5 minutos com o extrato glicólico de *P. granatum*



Legenda: Letras (A e B) representam a diferença ou semelhança estatística entre os grupos, considerando sempre o grupo controle como letra A obtendo 100% de Viabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) após contato por 5 minutos com o extrato glicólico de *R. officinalis*



Legenda: Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística entre os grupos, considerando sempre o grupo controle como letra A obtendo 100% de Viabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A expansão do uso clínico de antibióticos naturais e sintéticos no tratamento de infecções clínicas. O uso excessivo de antimicrobianos levou ao aumento da resistência a diferentes antibióticos na maioria das bactérias. Essa foi uma das razões para o crescente uso de ervas como ingredientes naturais de baixo risco, preço acessível e baixo custo no tratamento de infecções bacterianas em comparação com antibióticos sintéticos. As plantas contribuem para uma variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobiana e pesquisa científica para determinar a terapêutica potencial dessas substâncias é relevante para possíveis propriedades antibióticas contra patógenos resistentes.

Observou-se que dos 4 extratos avaliados apenas o extrato de romã apresentou CIM e CMM para todas as cepas clínicas multirresistentes analisadas sendo seguido pelo extrato de alecrim que apresentou CIM e CMM para 6 das 8 cepas clínicas multirresistentes analisadas. Os extratos de bardana e cavalinha apresentaram CIM e CMM para poucas cepas clínicas multirresistentes analisadas. Comparando essas análises, a romã e o alecrim apresentaram os melhores resultados de CIM e CMM e, portanto, foram selecionados para dar continuidade as análises de biofilme e citotoxicidade.

Considerando os resultados do teste de microdiluição, verifica-se que o extrato de romã apresenta melhor efeito de microbicida para cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*. Em estudo similar, extratos foram testados contra dois painéis de bactérias e fungos patogênicos. Os resultados mostraram que o extrato de *Pimenta dioica* foi o mais eficaz para matar cinco cepas, incluindo *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e levedura *C. albicans*, com CIM variando entre 0,5 e 2mg/mL. A cepa bacteriana *E. coli* foi resistente às concentrações testadas neste estudo. O extrato de alecrim foi capaz de inibir o crescimento de *A. baumannii* em concentrações de CIM de 0,5 mg/mL, mas não foi capaz de inibir o crescimento do restante das cepas bacterianas testadas (Lorenzo-Leal et al., 2019).

Não são encontrados na literatura estudos sobre o extrato de romã em *A. baumannii* no entanto nossos resultados concordam com Nozohour et al.,

(2018) que avaliaram o extrato de romã sobre cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, as CIM dos extratos de casca e semente de romã foram 12,5 e 25,0mg/mL, respectivamente. Além disso, as CMM de casca de romã e extratos de sementes foram de 25,0 e 50 mg/mL, respectivamente. Em todos os isolados bacterianos estudados, os valores de CIM e CMM para o extrato de semente de romã foram significativamente maiores do que os do extrato de casca de romã ($P < 0,05$). Os valores de CMM foram bem parecidos com nosso estudo, no entanto, esse trabalho citado não foi estudado com cepas multirresistentes e o grande diferencial do nosso trabalho é descobrir o efeito do extrato de romã sobre cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

As 8 cepas clínicas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* conforme dados fornecidos pelo sistema MicroSCAN 4, provenientes do laboratório Particular, São José dos Campos – SP, são resistentes aos carbapenêmicos. (ver quadro 1). Por várias décadas, grandes proporções de isolados de *A. baumannii* dos centros de saúde exibiram resistência aos antibióticos mais usados, incluindo aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de amplo espectro, a maioria dos aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol. Como consequência, os carbapenêmicos (especialmente imipenem e meropenem) têm sido a base do tratamento para infecções por *A. baumannii*. No entanto, relatos de resistência a carbapenêmicos têm se acumulado em todo o mundo, com alguns isolados sendo resistentes a todos os antibióticos convencionais. *A. baumannii* parece ser particularmente hábil em adquirir e expressar novos mecanismos de resistência em resposta ao desafio com novos antibióticos (Towner et al., 2011).

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos sobre biofilmes de cepas multirresistentes de *A. baumannii* no tempo de 5 minutos. Ambos os extratos apresentaram redução significativa de atividade metabólica em biofilme para todas as cepas, com resultados estatisticamente diferentes do controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$).

Comparando os resultados de redução de atividade metabólica em biofilmes de cepas clínicas de *A. baumannii*, é possível observar que o extrato de alecrim apresentou reduções que variam entre 3,08% a 57,7%, para cinco cepas e o extrato de romã apresentou reduções que variam entre 0,58% a 94,9%, apresentando maior redução para sete cepas clínicas.

Todos os extratos foram obtidos na concentração de 200 mg/mL em propileno glicol. O extrato etanólico e o óleo essencial de *R. officinalis* contêm uma variedade de compostos, a maioria com atividade antimicrobiana intrínseca, outras sem atividade antimicrobiana. Após determinar o CIM, pode haver aplicação de uma variedade de métodos para elucidar o modo de ação dos compostos resultantes do metabolismo secundário de uma planta contra células microbianas. O estabelecimento de um mecanismo de ação deve enfatizar a importância de conhecer as interações moleculares entre a substância estudada e os alvos específicos da célula hospedeira (Marinescu et al., 2015).

Na avaliação a citotoxicidade das concentrações mais efetivas dos extratos naturais de alecrim e romã em cultura de queratinócitos, em ensaio da atividade mitocondrial celular pelo método MTT, no tempo de 5 minutos. Observou-se que ambos os extratos promoveram redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas em relação ao grupo controle, resultado este que também pode ser observado na análise estatística, sendo que para o extrato de *R. officinalis* 5 das 10 concentrações testadas apresentaram viabilidade celular acima de 50%.

O extrato de *P. granatum* apresentou os melhores resultados de viabilidade celular, 8 das 10 concentrações testadas apresentaram médias acima de 80 % similares ao grupo controle. Verifica-se que essas concentrações são adequadas e não apresentaram citotoxicidade. Em estudo similar foi avaliado a atividade antimicrobiana do extrato vegetal *P. granatum* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, e analisada a citotoxicidade desse extrato em macrófagos murinos cultivados (RAW 264.7) onde a viabilidade celular foi de 76% (Oliveira et al., 2013). Os valores de viabilidade celular foram bem parecidos com nosso estudo, no entanto, esse trabalho citado não foi estudado com cepas multirresistentes e o grande diferencial do nosso trabalho é descobrir o efeito do extrato de romã sobre cepas multirresistentes de *A. baumannii*, que é um grande avanço, uma grande contribuição para área.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

- a) o extrato de romã apresentou CIM e CMM para as 8 cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes avaliadas, sendo seguido pelo extrato de alecrim que apresentou CIM E CMM sobre 6 cepas clínicas. Os extratos de bardana e cavalinha não apresentaram CIM e CMM para todas as cepas avaliadas.
- b) o extrato de romã apresentou uma melhor ação antibiofilme comparado ao extrato de alecrim no tempo de 5 minutos promovendo redução significativa da atividade metabólica para todas as cepas.
- c) na avaliação a citotoxicidade das concentrações mais efetivas dos extratos de alecrim e romã, verifica-se que o extrato de romã foi o extrato que apresentou os melhores resultados frente as cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii*, pois apresentou redução de biofilme, principalmente na concentração de 50mg/mL (cepas: H557, H571, H652, H718, H6004, H6565) e teve uma viabilidade celular acima de 80% na mesma concentração (50mg/mL), podendo ser considerado um potencial agente terapêutico para o combate destes patógenos.

REFERÊNCIAS*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plano nacional para prevenção e o controle da resistência microbiana nos serviços de saúde. May.2017.

Antipa C, Dascalu L, Chifiriuc MC, Lazar V, Bleotu C, Ruța SM. Isolation, identification and antibiotic susceptibility profiles in bacterial strains isolated from periodontal lesions. *Ann Biol Res.* 2014;5:22-6.

Bassetti M, Righi E, Esposito S, Petrosillo N, Nicolini. Drug treatment for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Future Microbiol.* 2008,3(6):649-60.

Bavia L, Fontana PD, Bovo F, de Souza ARC, Corazza ML, Messias-Reason IJ. Inhibitory effect of supercritical extracts from *Arctium lappa L.* on the Lectin pathway of the complement system. *Chem Biodivers.* 2019Dec;16(12):e1900401. doi: 10.1002/cbdv.201900401. Epub 2019 Dec 4.

Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol.* 2007;78:696-704.

Candido RB, Souza WA, Podesta MH, Rocha JR, Siqueira VM, Souza WC, et al. Avaliação das infecções hospitalares em pacientes críticos em um centro de terapia intensiva. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde,* 2012;10(2):148-63.

Carvalho MR, Moreira IC, Amorim FL, Guimarães MS, Viana VG, Oliveira FW. Incidência de bactérias multirresistentes em uma unidade de terapia intensiva. 2015;8(2).

Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B, Cock IE. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Rev.* 2017 Jul-Sep; 11(22):57-72.

Chen HP, Chen TL, Lai CH, Fung CP, Wong WW, Yu KW, et al. Predictors of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38 (2):127-36.

Dou D, Kang TG, Xu L, Xie CX, Chang Y, LY Z, et al. Ecological Suitability of *Arctium Lappa L.* and its Suitable cultivation Regions in China. *Planta Med* 2009;75:22.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chakhtoura NG, Saade E, Iovleva A, Yasmin M, Wilson B, Perez F, et al. Therapies for multidrug resistant and extensively drug-resistant non-fermenting gram-negative bacteria causing nosocomial infections: a perilous journey toward molecularly targeted therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Feb;16(2):89-110.

Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Susceptibilidade antimicrobiana e frequência de ocorrência de isolados clínicos no sangue na Europa a partir do programa de vigilância antimicrobiana. 1997 a 1998. *Clin Infect Dis* 2000;30:454-60.

Gaetti-Jardim Jr E, Avila-Campos MJ, Ciesielski FIN, Sousa FRN. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *Braz J Microbiol*. 2011; 42:1047- 55.

Gaetti-Jardim Jr E, Lins SA, Pereira MF, Coclete GA, Schweitzer CM. Saliva contamination by opportunistic microorganisms in drug addiction females. *Arch Health Invest*. 2013;2:3-10.

Gažová A, Valášková S, Žufková V, Castejon AM, Kyselovič J. Clinical study of effectiveness and safety of CELcomplex® containing Cucurbita Pepo Seed extract and Flax and Casuarina on stress urinary incontinence in women. *J Tradit Complement Med*. 2018 May 3;9(2):138-42.

Kannapan A, Srinivasan R, Nivetha A, Annapoorani A, Pandian SK, Ravi AV. Anti-virulence potential of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its clinical isolates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Aug;103(16):6747-6758.

Kusahara DM, Peterlini MAS, Pedreira MLG. Oralcare with 0.12% chlorhexidine for the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill children: randomised, controlled and double blind trial. *Int J Nurs Stud*. 2012;49:1354-63.

Kokoska L, Polesnv V, Rada A, Nepovim T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 2002;2(1):51-3.

Lawless J, *Encyclopedia of Essential Oils: The complete guide to the use of aromatic oils in aromatherapy, herbalism, health and well-being*, Front Immunol. 2014 Nov 27;5:611.

Lorenzi H. Curriculum - Harri Lorenzi [internet] Nova Odessa: Instituto Plantarum [cited 2017 sept 20]. Available from: www.bdpa.cnptia.embrapa.br

Lorenzo-Leal AC, Palou E, López-Malo A, Bach H. Antimicrobial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils. *Hindawi. Biomed Res Int*. 2019 May 7;2019:1639726. doi.org/10.1155/2019/1639726

- MacVane SH. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections. *J Intensive Care Med.* 2017 Jan;32(1):25-37.
- Marinescu F, Marutescu L, Savin I, Lazar V. Antibiotic resistance markers among Gram-negative isolates from wastewater and receiving rivers in South Romania. *Romanian Biotechnological Letters.* 2015;(20)1.
- Marinho BVS, Araujo ACS. O uso dos enxaguatórios bucais sobre gengivite e o biofilme dental. *Int J Dent, Recife* 2007;6(4):124-31.
- Martins AF, Barth AL. Acinetobacter multirresistente: um desafio para saúde pública. *Scientia Medica.* 2013;23(1):56-62.
- Nozohour Y, Golmohammadi R, Mirnejad R, Fartashvand M. Antibacterial Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Seed and Peel Alcoholic Extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Health Centers. *J Appl Biotechnol Rep.* 2018 Mar;5(1):32-6.
- Oliveira CM. Abrodagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas na: França SC. *Farmacognosia - da planta ao medicamento.* 4^o edição, Ed. Da UFSC, p.105-120, 2002.
- Oliveira JR, Jesus D, Figueira LW, Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SE, Jorge AO, Oliveira LD. Biological activities of *Rosmarinus officinalis L.* (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017 Mar;242(6):625-34.
- Oliveira JR, Castro VC, Vilela PGF, Camargo SEA, Carvalho CAT, Jorga AOC, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med.* 2013 Aug.15;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208.
- Oliveira MJR, Simões MJS, Sassi CRR. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais,* 2006;8(2):39-41.
- Oliveira IC, Pereira NF, Conceição OC, Costa BS, Andrade E, Rocha CM, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015). *Infect Genet Evol.* 2019 May 20;73:411-5.
- Pallavali RR, Avula S, Degati VL, Penubala M, Damu AG, Durbaka VRP. Data of antibacterial activity of plant leaves crude extract on bacterial isolates of wound infections. *Data Brief.* 2019;22:24.

Patrice Nordmanna, Julien Perlera, Nicolas Kieffera, Laurent Poirela. In-vitro evaluation of a dual carbapenem combination against carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*. J Infect. 2020 Jan;80(1):121-142. doi: 10.1016/j.jinf.2019.10.003. Epub 2019 Oct 11.

Paula-Ramos L, da Rocha Santos CE, Camargo Reis Mello D, Nishiyama Theodoro L, De Oliveira FE, Back Brito GN, et al. *Klebsiella pneumoniae* Planktonic and Biofilm Reduction by Different Plant Extracts: In Vitro Study. ScientificWorld Journal. 2016:3521413.

Pérez-Chaparro P-J, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. J Dent Res. 2014 Sep;93(9):846-58. doi:10.1177/0022034514542468. Epub 2014 Jul 29.

Queiroz GM, Silva LM, Pietro RC, Salgado HR. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. Rev Bras Clin Med. São Paulo, 2012 Mar-Apr;10(2):132-8.

Rocío Á, Dolores N, Oriol G, Rodríguez-Martínez JM, Rosario GCM, Contreras L, et al. A prospective, multicenter case control study of risk factors for acquisition and mortality in Enterobacter species bacteremia. J Infect. 2020 Feb;80(2):174-181. doi: 10.1016/j.jinf.2019.09.017. Epub 2019 Oct 1.

Sopena N, Heras E, Casas I, Bechini J, Guasch I, Pedro-Botet ML, et al. Risk factors for hospital-acquired pneumonia outside the intensive care unit: a case-control study. Amer J Infect Control. 2014; 42:38-42.

Sullivan DR, Shields J, Netzer G. Fatal case of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* necrotizing fasciitis. The American Surgeon. 2010;76(6):651-3.

Towner KJ, Evans B, Villa L, Levi K, Hamouda A, Amyes SGB, et al. Distribution of Intrinsic Plasmid Replicase Genes and Their Association with Carbapenem-Hydrolyzing Class D -Lactamase Genes in European Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, May 2011;2154–9. doi:10.1128/AAC.01661-10.

Vijayakumar S, Mathur P, Kapil A, Das BK, Ray P, Gautam V, et al. Molecular characterization & epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter*. Indian J Med Res. 2019 Feb;149(2):240-6.

Vinagre NPL. Efetividade clínica de um enxaguatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. Revista de Odontologia da UNESP, 2011;40(1):30-5.

Xiao YH, Hu YJ. The reliability of using imipenem, meropenem, cefoperazone-sulbactam and piperacillin-tazobactam to treat nosocomial Gram-negative bacterial infections with Monte Carlo simulation. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 2017 Aug 1;56(8):595-600.

Werkman C, Granato DC, Kerbauy WD, Sampaio FC, Brandão AAH, Rode SM. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum L.* (romã). Rev. Bras. Pl. Med. 2008;10(3):104-11.

El Pais [Internet]. Madri. Yonath A. Prêmio Nobel de Química [cited 2019 May 27]. Available from:
https://brasil.elpais.com/brasil/2019/05/23/ciencia/1558635795_212524.html

Zaha DC, Bungau S, Aleva S, Tit DM, Vesa CM, Popa AR, et al. What antibiotics for what pathogens? The sensitivity spectrum of isolated strains in an intensive care unit. Sci Total Environ. 2019 Jun 7;687:118-127.

Zhuang LF, Watt RM, Steiner S, Lang-Hua BH, Wang, R.; Ramseier CA, et al. Subgingival microbiota of Sri Lankan tea labourers naïve to oral hygiene measures. J Clin Periodontol. 2014; 41:433-41.

ANEXO A -Laudo do Extrato Glicólico de Alecrim



EXTRATO GLICOLICO DE ALECRIM (HG)

Nome Científico: *Rosmarinus officinalis L.* / Labiatae

INCI: Rosmarinus Officinalis Extract

Nº CAS: 57-55-6; 64-17-5; 7732-18-5; 26172-55-4/2682-20-4; 99-76-3

Parte Utilizada: Folha

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Óleo essencial constituído de derivados terpênicos (pineno, canfeno, borneol livre e como acetato, cineol, cânfora); sesquiterpenos; ácido oleanólico; pouco tanino; substâncias amargas; saponina ácida; e compostos glucosídicos.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Alecrim tem ação demopurificante, tonificante, estimulante celular, antioxidante, protetor de tecidos e ativador da circulação periférica. Pode ser usado em preparações para o couro cabeludo, estimulando a circulação e o crescimento capilar. Tem ação anticasca, previne a queda e confere brilho aos cabelos.

Usado também em preparações para pele acnêmica, comedogênica e atônica.

Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho, loção de limpeza e outros produtos cosméticos.

Atenção: O Extrato Glicólico de Alecrim deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

Indicado somente para uso externo em concentração - 0,5 a 10%.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

ANEXO B - Laudo do Extrato Glicólico de Bardana



EXTRATO GLICÓLICO DE BARDANA (HG)

Nome Científico: *Arctium lappa L.* / Compositae

INCI: Arctium Lappa Root Extract

Nº CAS: 84012-13-5

Parte Utilizada: Raiz

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Inulina (polissacarídeo); óleo etéreo; fitosterina; ácido cafeico; mucilagem; terpenos; taninos e sais minerais.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Bardana tem ação: adstringente, emoliente, remineralizante, suavizante, anti-inflamatória, anti-séptica (bactericida e fungicida), antiacne, anti-comedogênico, hidratante. Usado em preparações para psoríase, pruridos, acne, furunculose, seborréia, ulcerações, picadas de insetos e para queda de cabelo.

Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho, loção de limpeza, tônicos capilares e outros produtos cosméticos.

Indicado somente para uso externo em concentrações de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Bardana deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45º C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.

ANEXO C -Laudo do Extrato Glicólico de Romã



EXTRATO GLICÓLICO DE ROMÃ (HG)

Nome Científico: *Punica granatum L. / Punicaceae*

INCI: Punica Granatum Bark Extract

Nº CAS: 84961-57-9

Parte Utilizada: Casca

PRINCÍPIOS ATIVOS

Contêm alcalóides (como a pelieterina e isopelieterina) e os taninos gálicos.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

Possui efeito adstringente e anti-séptico proporcionado pelos taninos gálicos, sendo muito utilizado em produtos para o tratamento de acne e de seborréia, além de regular a oleosidade da pele e dos cabelos.

DOSAGEM

Em cremes, géis e loções – 2 a 10%.

Em shampoos, condicionadores e sab. – 1 a 5%

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balmé, F.; Plantas Mediciniais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cravo, A.B.; Frutas e Ervas que Curam – Panacéia Vegetal. Ed. Helmus, 1995.

Encyclopédie des Plantes Médicinales. Ed. Larousse-Bordas, 1997.

Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.

Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais. Reader's Digest, 1998.

ANEXO D -Laudo do Extrato Glicólico de Cavalinha



EXTRATO GLICÓLICO DE CAVALINHA (HG)

Nome Científico: *Equisetum arvense* L.

INCI: Equisetum Arvense Extract

Nº CAS: 71011-23-9

Parte Utilizada: Partes aéreas / Caule

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular:N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Ácido silício (fonte de silício e compostos hidrossolúveis de sílica), taninos, saponinas, flavonóides, Vitamina C, alcalóides, compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, substâncias amargas e triglicerídeos.

PROPRIEDADES

Glicosídeos flavônicos, saponinas, ácido gálico, potássio e sílica são os constituintes responsáveis pela sua atividade diurética e remineralizante, permitindo a eliminação de substâncias tóxicas. Os taninos são os principais responsáveis por sua ação adstringente, que auxiliam em conjunto com substâncias coagulantes a melhorar os transtornos circulatórios. Atua como homeostático.

Apresenta propriedades em mineralizantes atribuídas ao silício, que também tem a capacidade de ligar-se a mucopolissacarídeos e glicoproteínas da estrutura do tecido conectivo, estimulando a biossíntese de fibras colágenas e elastina, preservando a elasticidade e tonicidade do tecido cutâneo.

Age sobre as fibras elásticas das artérias, diminuindo o risco de ateromatose. Estimula o metabolismo cutâneo, acelera a cicatrização e aumenta a elasticidade de peles secas e senis, atuando como hidratante profundo.

Por suas propriedades adstringentes e detergentes (saponinas) pode atuar como coadjuvante no tratamento externo da acne.

O Extrato Glicólico de Cavalinha possui ação remineralizante, seboestática, antiinflamatória, antiacne, vulnerária, tonificante, cicatrizante, adstringente genito-urinário e revitalizante.

Indicado somente para uso externo em concentração de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Cavalinha deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor. Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação. **Obs.:**

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações de cor são esperadas por modificação dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.