



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

MARCELA DOS SANTOS OLIVEIRA

**AÇÃO DE EXTRATOS DE HAMAMÉLIS E DE ABACATEIRO SOBRE
CEPAS CLÍNICAS MULTIRRESISTENTES DE *Klebsiella*
pneumoniae E *Pseudomonas aeruginosa***

2018

MARCELA DOS SANTOS OLIVEIRA

**AÇÃO DE EXTRATOS DE HAMAMÉLIS E DE ABACATEIRO SOBRE
CEPAS CLÍNICAS MULTIRRESISTENTES DE *Klebsiella
pneumoniae* E *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, para obtenção do título de MESTRE, pelo 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 Theotônio dos Santos

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. 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).

Oliveira, Marcela dos Santos

Ação dos extratos de hamamélis e abacateiro sobre cepas clínicas resistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* / Marcela dos Santos Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: Antônio Olavo Cardoso Jorge

Coorientador: João Manoel Theotonio dos Santos

1. Micro-organismos multirresistentes . 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. Plantas Medicinais. 5. Ação Antimicrobiana. I. Jorge, Antônio 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. Tit. Antônio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Luciane Dias Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Fundação Universitária Vida Cristã - FUNVIC

Pindamonhangaba

São José dos Campos, 29 de novembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família!

A minha mãe Dalva, ao meu pai Hélio, as minhas irmãs Priscila e Ana Paula e ao meu sobrinho Lucas.

Ao meu filho Vitor e meu marido que entenderam minha ausência durante esse período.

Não tenho como agradecer por toda ajuda e incentivo nos momentos difíceis!

Eu não conseguiria vencer mais essa etapa sem vocês ao meu lado...

Amor sem limites!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos!

Ao meu orientador, Prof. Antonio Olavo, pelo exemplo de dedicação e cordialidade e a professa Adj. Luciane muito obrigada por confiar em meu trabalho e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal! Sem os seus ensinamentos, eu não teria conseguido!

Ao meu querido co-orientador, Dr. João Manoel Theotonio dos Santos, meu profundo agradecimento pelo incentivo e apoio que recebi durante toda a trajetória!

Ao diretor clínico do Hospital Policlin Dr. Carlos Eduardo da Rocha Santos minha eterna gratidão pela oportunidade concedida e pelo apoio incondicional durante esse processo.

Ao querido amigo Lucas de Paula, por me conceder a oportunidade de trabalhar junto e aprender muito com sua experiência!

Aos meus colegas da turma Mestrado UNESP 2016, por toda força e amizade que tivemos durante o tempo em que passamos juntos.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, ao diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT de São José dos Campos, Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara, e à vice-diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló.

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

Ao Hospital Policlin São José dos Campos pelo desenvolvimento de parte desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Atividade antibacteriana pelo teste de microdiluição em caldo	17
3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos	20
3.2.1 Avaliação da Biomassa pelo teste do cristal violeta	21
3.2.2 Viabilidade celular dos micro-organismos pelo teste de MTT	22
3.3 Análise estatística	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Atividade antibacteriana pelo teste de microdiluição em caldo	24
4.2 Avaliação da Biomassa pelo teste do cristal violeta	27
4.3 Viabilidade celular dos micro-organismos pelo teste de MTT	28
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	50
ANEXOS	81

Oliveira MS. Ação dos extratos de hamamélis e abacateiro sobre cepas clínicas resistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*[dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciências e Tecnologia; 2018.

RESUMO

A resistência adquirida pelas bactérias aos antibióticos de amplo espectro tornou-se uma ameaça à saúde global. A necessidade de encontrar fármacos que consigam combater micro-organismos multirresistentes tem se tornado um grande desafio. Neste cenário, as plantas medicinais são promissoras por terem propriedades antimicrobianas eficazes, devido à presença de compostos fitoquímicos com atividades biológicas diversas. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana dos extratos glicólicos de *Hamamelis virginiana* (hamamélis) e de *Persea americana* (abacateiro) sobre cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais foi realizada em sete cepas clínicas de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa*, em comparação com uma cepa de referência de *K. pneumoniae* (ATCC 4352) e de *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos extratos de abacateiro e de hamamélis foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo NCCLS. Após obtenção destes resultados, foi verificada a ação dos extratos sobre biofilmes monomicrobianos de oito cepas de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa* (1 cepa ATCC e 7 cepas clínicas resistentes). Após o período de 48 horas para a formação do biofilme, os extratos foram adicionados separadamente, pelo período de cinco minutos, na concentração efetiva pré-determinada (CBM) e concentrações superiores. Posteriormente, os biofilmes foram lavados e mensurados por dois diferentes testes, em que foram avaliadas a biomassa do biofilme pelo cristal violeta e a viabilidade dos micro-organismos pelo teste de MTT. Os experimentos foram realizados com n=10, utilizando duas repetições para cada cepa/extrato. Os dados foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA, complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Os resultados demonstraram uma significativa atividade antibacteriana de ambos os extratos contra a cepa-padrão e as cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Os extratos de abacateiro e de hamamélis, em todas as concentrações, demonstraram uma redução estatisticamente significativa na biomassa formada para pelo menos alguma das cepas clínicas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* testada. Para avaliação da viabilidade celular, ambos os extratos, na concentração de 200 mg/mL, demonstraram redução estatisticamente significativa nas cepas multirresistentes avaliadas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Como conclusão, os extratos glicólicos de *H. virginiana* e *P. americana* apresentaram ação antimicrobiana, resultando em concentrações com capacidade bactericida e significativa redução antibiofilme formados pelas cepas multirresistentes e ATCC de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Micro-organismos multirresistentes. *Klebsiella pneumoniae*. *Pseudomonas aeruginosa*. Plantas Medicinais. Ação Antimicrobiana.

Oliveira MS. Action of Hamamelis and Avocado extracts on clinical strains of resistant Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa [dissertation]. São José dos Campos(SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The resistance created by bacteria to broad-spectrum antibiotics has become a threat to global health. The need to find drugs that can combat multidrug-resistant microorganisms has become a major challenge. In this scenario, medicinal plants are promising because they have effective antimicrobial properties due to the presence of phytochemical compounds with diverse biological activities. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of the glycolic extracts of Hamamelis virginiana (hamamelis) and Persea americana (avocado) on multiresistant strains of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. The evaluation of the antimicrobial activity of the plant extracts was carried out in seven clinical strains of K. pneumoniae and P. aeruginosa, compared to a strain of K. pneumoniae (ATCC 4352) and P. aeruginosa (ATCC 15442). The broth microdilution method, according to NCCLS, was used to determine the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBM) concentrations of the extracts of avocado and witch hazel. After obtaining these results, the extracts on monomicrobial biofilms of eight strains of K. pneumoniae and P. aeruginosa (1 strain ATCC and 7 resistant clinical strains) were verified. After the 48 hour period for biofilm formation, the extracts were removed, with a five-minute interval, in the effective exercise session (MBC) and in the upper sets. Afterwards, the biofilms were washed and measured by two different testicles, in which the biofilm biomass was evaluated by the violet glass and the viability of the microorganisms by the MTT test. The experiments were performed with $n = 10$, using two replicates for each strain / extract. The data were analyzed statistically by the ANOVA method, complemented by the Tukey test, with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). The results demonstrated an antibacterial activity of both extracts against the standard strain and as the clinical strains of K. pneumoniae and P. aeruginosa. The extracts of avocado and witch hazel at all concentrations demonstrated a statistically significant reduction in the biomass formed for at least some of the clinical strains of K. pneumoniae and P. aeruginosa tested. For evaluation of cell viability, both extracts, at a concentration of 200 mg / mL, demonstrated a statistically significant reduction in the multiresistant strains evaluated for K. pneumoniae and P. aeruginosa. In conclusion, the glycolic extracts of H. virginiana and P. americana showed antimicrobial action, resulting in concentrations with bactericidal capacity and significant antibiofilm reduction formed by the multiresistant strains and ATCC of K. pneumoniae and P. aeruginosa.

Keywords: Multidrug-resistant microorganisms. Antimicrobial Action. Klebsiella pneumoniae. Pseudomonas aeruginosa. Medicinal Plants.

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da penicilina há quase 90 anos houve uma revolução no tratamento das doenças bacterianas. No entanto, o mau uso desses antibacterianos tem diminuído a sua eficácia. Em 2017 a Organização Mundial de Saúde fez um alerta sobre o surgimento de cepas resistentes a um número cada vez maior de antimicrobianos o que vem limitando seriamente a capacidade de tratamento de doenças bacterianas. Estima-se que em 2050 a cada três segundos um paciente vai morrer infectado por um patógeno multirresistente. No entanto, o uso de extratos de plantas ou compostos naturais puros ou em combinação com antibióticos convencionais tem se mostrado uma alternativa promissora para esse problema de saúde pública. (Cheesman et al., 2017).

Em 2016 ANVISA lançou um boletim com os principais microorganismos encontrados nos hospitais do Brasil e entre estas bactérias a *Klebsiella pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa* aparecem no segundo e terceiro lugar respectivamente, na lista com principais patógenos multirresistentes, só ficando atrás do *Acinetobacter* ssp. A *K. pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo da família Enterobacteriaceae que faz parte da microbiota intestinal humana residente e sua virulência está relacionada ao aparecimento de cepas produtoras de β -lactamase de espectro estendido (EBSLs) (Rahim et al., 2016; Bowers et al., 2016). Estas cepas têm comprometido o uso de penicilinas e cefalosporinas de largo espectro, o que conduz a um aumento da utilização terapêutica de carbapenêmicos, que ainda são estáveis contra a maioria das lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas, porém, Nicoletti et al. (2016), descreveram um aumento de lactamases capazes de hidrolisar carbapenêmicos.

Estudos apontam a relação entre infecções por bactérias resistentes a múltiplos fármacos como um preditivo para maior mortalidade, morbidade, maior tempo de internação e custos elevados para os hospitais e os sistemas de saúde (Chung, 2016; Osei et al., 2016; Rossi, 2016). Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos, principalmente, em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), onde o uso de antimicrobianos potentes e de largo espectro constitui prática comum e os

procedimentos invasivos fazem parte da rotina hospitalar (Du et al., 2016). A emergência de desenvolver substâncias que atuem inibindo a resistência microbiana ou seu aumento tem se tornado um desafio no mundo todo (Chukwujekwu, Van Staden, 2016).

K. pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC) rapidamente se espalhou pelas unidades clínicas em todo o mundo. Guo et al. (2016) investigaram o perfil epidemiológico e de resistência de *K. pneumoniae* isolados na China Central durante o período de 2009 a 2014, e verificaram que 20% das cepas isoladas eram resistentes ao carbapenem. Embora seja um colonizador comum da pele, do trato gastrointestinal e da nasofaringe é um risco para os pacientes hospitalizados por longos períodos e com sistema imunológico comprometido, sendo responsável por mais de 70% das infecções hospitalares em seres humanos.

Biofilmes são estruturas formadas por comunidades microbianas ligadas à superfície biótica ou abiótica envoltas em uma matriz de polímeros extracelulares constituída principalmente por carboidratos, hexossaminas, ácidos urônicos, proteínas e ácidos nucléicos. A capacidade de formar biofilmes é considerada um dos principais fatores de virulência de muitas espécies de bactérias e confere a estes micro-organismos várias vantagens, como maior proteção frente às defesas imunes do paciente e contra a ação de agentes antimicrobianos convencionais (Singh et al., 2017).

Quando organizados em biofilmes, os micro-organismos tornam-se extremamente resistentes, pois estes oferecem grande resistência à difusão de antimicrobianos (Munoz-Price et al., 2013; Chen et al., 2014; Pitout et al., 2015; Pleszczyńska et al., 2016), conseqüentemente resta pouca ou nenhuma opção de tratamento (Benthall et al., 2015). Ergönül et al. (2016) descreveram a prevalência da resistência aos antibióticos e os preditores de mortalidade ocasionadas por infecções da corrente sanguínea associada aos cuidados de saúde, sendo *K. pneumoniae* o principal patógenos resistentes aos carbapenêmicos encontrados.

Outra bactéria preocupante de interesse nas infecções hospitalares é *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram-negativo aeróbio, ubíquo, não-esporulado, não-fermentador de glicose e móvel devido ao flagelo polar. Pertence à família Pseudomonadaceae e se apresenta na forma de bastonetes de 0,5 a 0,8 µm de largura por 1,5 a 3,0 µm de comprimento (Ferreira, Lala, 2010). Tem sido

considerado um patógeno oportunista porque, ocasionalmente, está associada a infecções comunitárias em indivíduos imunocompetentes (Abdi-ali et al., 2006). Raramente ocasiona doenças em indivíduos saudáveis (Hancock, Speert, 2000), no entanto, trata-se de uma das principais espécies bacterianas que causam infecção em pacientes hospitalizados (Goldberg, 2010) ou que estejam recebendo terapia antimicrobiana de amplo espectro ou terapia de combate às neoplasias (Utcharykiat et al., 2016).

P. aeruginosa é resistente a antimicrobianos de diferentes classes estruturais, por mecanismos intrínsecos ou por aquisição de plasmídeos de resistência genética. A maioria das linhagens é resistente à ampicilina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas de espectro-estendido (exceto ceftazidima e cefepima), tetraciclinas, macrolídeos, rifampicinas, clorafenicol e trimetoprim-sulfametoxazol. O seu espectro de resistência pode ainda aumentar por alterações na permeabilidade da membrana, aumento da atividade da bomba de efluxo, alterações no sítio de interação ou degradação enzimática (ex. enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e lactamases) (Utcharykiat et al., 2016). Siriyong et al. (2017) investigaram se a conessina, um componente encontrado em algumas plantas da família das apocináceas, conhecida por ser poder fungicida, poderia atuar como agente modificador de resistência contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e se a bomba de efluxo estava envolvida no mecanismo. Os resultados sugeriram que a conessina poderia ser aplicada como um novo inibidor da bomba de efluxo para restaurar a atividade antibiótica frente a *P. aeruginosa*.

A resistência aos antibacterianos é considerada um problema de saúde pública, com relatos de uma tendência crescente de resistência em isolados clínicos (Davidson et al., 2000). A aceitação da medicina tradicional como uma forma alternativa de cuidados de saúde e o desenvolvimento de resistência microbiana aos antibacterianos disponíveis reafirmaram a necessidade de investigar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos vegetais (Taylor, 2013). Oliveira et al. (2017) avaliaram a ação do extrato de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas ATCC de fungos e bactérias; Lee et al. (2017) avaliaram a ação do extrato de *Terminalia chebula* na prevenção da doença periodontal; Ramos et al. (2016) avaliaram a aplicação de oito extratos sobre cepa ATCC de *K. pneumoniae*; Jesus et al. (2015) avaliaram a ação

do extrato de *Persea americana* sobre cepa de *Candida albicans*; Amendola (2015) avaliou o extrato de *Hamamelis virginiana* sobre espécies de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e algumas espécies de levedura do gênero *Candida*. Apesar dos vários trabalhos relacionando os fitoterápicos muitas lacunas, ainda, são encontradas na literatura, seja pela espécie de planta ou mesmo pela aplicação de extratos sobre cepas multirresistentes (Farooqui et al., 2015; Rodríguez-Leguizamón et al., 2015).

As plantas medicinais são conhecidas por serem muito ricas em fitoquímicos com atividades biológicas diversas, como: alcaloides, flavonoides, taninos e compostos fenólicos. A terapia de combinação está se tornando um tema importante no estudo de doenças infecciosas e está sendo cada vez mais aceita como um redutor da resistência microbiana. Os estudos têm mostrado que os compostos que ocorrem, simultaneamente, em plantas medicinais desempenham um papel no aumento da biodisponibilidade e de distribuição de vários fitoquímicos, e a reversão de resistência bacteriana (Chukwujekwu, van Staden, 2016; Dzutam et al., 2016; Sakkas et al., 2016) .

O extrato glicólico de hamammélis, cujo nome científico é *H. virginiana* L., membro da família Hamamelidaceae, é nativa da América do Norte, mais especificamente da região do Estado da Virginia, nos Estados Unidos da América, local que lhe cedeu o nome. Trata-se de uma planta de pequeno porte, composta por folhas largas, parte utilizada nos extratos (Kiran et al., 2008). Possui dentre os princípios ativos, tanino pirogálico (hamamelitanino), óleo essencial, saponina ácida, colina, ácidos graxos, mucilagem e pectina, tendo ação adstringente, vasoprotetora, vasoconstritora, descongestionante e anti-acnêica.

O extrato glicólico de abacateiro, cujo nome científico é *Persea americana*, nativa da América Central, parte empregada no extrato são as folhas, possui dentre os princípios ativos, substâncias amargas (asocatina), flavonoides, quercetina, beta-sitosterol, hepta álcool, óleo essencial, tendo ação hidratante, calmante e suavizante.

Dos poucos estudos relacionados à aplicação de fitoterápicos em cepas multirresistentes, Brandelli et al. (2015) avaliaram 10 extratos aquosos de plantas medicinais do Sul do Brasil, contra isolados clínicos bacterianos produtores de carbapenemase. A maioria dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

(KPC), que mostraram forte capacidade de formar biofilme e um perfil de resistência a multifármacos, foi inibida por quatro extratos dos dez avaliados. Mesmo extratos que têm apresentado baixo potencial microbicida têm sido explorados como potenciais fármacos, isso se deve à combinação de terapias nas quais se investiga o potencial de extratos em combinação com fármacos antimicrobianos já conhecidos.

Os estudos têm mostrado que os compostos presentes em plantas medicinais desempenham um papel no aumento da biodisponibilidade e de distribuição de vários fitoquímicos e, muitas vezes, ajudam na reversão da resistência bacteriana (Chukwujekwu et al., 2015; Sakkas et al., 2016; Chukwujekwu, van Staden, 2016). Mukhopadhyay et al. (2016) analisaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas (*Aristolochia indica* e *Toddalia asiatica*) contra bactérias resistentes a multifármacos, incluindo *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Vibrio cholerae*. De acordo com os resultados, o extrato etanólico de *A. indica* demonstrou atividade significativamente maior que *T. asiatica* sobre as bactérias multirresistentes, demonstrando importante potencial antimicrobiano.

Seukep et al. (2016) afirmaram que a resistência das bactérias Gram-negativas a vários fármacos constitui um grande obstáculo na luta antibacteriana em todo o mundo. Os autores investigaram a capacidade dos extratos metanólicos das folhas de *Nauclea pobeguini* e *Nauclea pobeguini* de reverter a resistência antibacteriana e antibiótica de 29 bactérias Gram-negativas, incluindo fenótipos resistentes a múltiplos fármacos (MDR). Os autores concluíram que o estudo forneceu informações sobre o possível uso dos compostos dessas plantas no controle de infecções bacterianas Gram-negativas, incluindo fenótipos MDR. O estudo também indicou que podem ser usados como moduladores de resistência a antibióticos que ocorrem naturalmente para combater bactérias MDR.

Voukeng et al., (2017) pesquisaram 11 extratos de metanol de sete plantas medicinais da República de Camarões para testar sua atividade antibacteriana usando método de microdiluição de caldo contra 36 cepas bacterianas MDR incluindo *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos destacaram o potencial antibacteriano das plantas testadas e o possível uso de *Euphorbia prostrata* para combater infecções bacterianas, incluindo fenótipos MDR.

Arora e Sood (2017) analisaram *in vitro* o efeito antimicrobiano de folhas de *Gymnema sylvestre* contra 13 patógenos e verificaram que *G. sylvestre* pode ser uma fonte potencial de desenvolvimento de metabólitos contra patógenos de importância clínica como *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*. e, ainda, não foram nem mutagênicos nem citotóxicos, como revelado pelo ensaio Ames e MTT. Bahiense et al. (2017) avaliaram as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas *in vitro* de *Sambucus australis*. O extrato etanólico das folhas exibiu atividade antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* (MIC 250 µg / mL) e *K. pneumoniae* (MIC 250 µg / mL), bem como efeitos anti-inflamatórios relevantes. Rajasekharan et al. (2017) investigaram o efeito inibitório do extrato de raiz de bardana (BRE) e do ácido clorogênico (CGA, um componente de BRE) em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. BRE e CGA exibiram significativa atividade antibiofilme contra *K. pneumoniae* demonstrando potencial uso em estratégias antibiofilmes contra infecções persistentes por *K. pneumoniae*.

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*.

Diante do cenário mundial de resistência bacteriana, dos altos custos para o sistema de saúde e da pouca efetividade dos fármacos atuais surge uma demanda por estudos envolvendo extratos de plantas que têm demonstrado potencial antimicrobiano. Neste contexto, este estudo pretende explorar a ação dos extratos de *P. americana* e *H. virginiana* sobre formas plactônicas e biofilmes de cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana, dos extratos glicólicos de *Persea americana* (extrato de abacateiro) e *Hamamelis virginiana* (extrato de hamamélis) sobre formas planctônicas e biofilmes monotípicos de cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato natural de *Persea americana* e *Hamamelis virginiana* sobre cepa-padrão (ATCC) e cepas clínicas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* e de *Pseudomonas aeruginosa* em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CBM);
- b) avaliar a atividade antibiofilme dos extratos de hamamélis e de abacateiro sobre cepa-padrão (ATCC) e cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa*, no tempo de contato de cinco minutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos de *Persea americana* e *Hamamelis virginiana* foram adquiridos comercialmente das empresas Seiva Brasilis (São Paulo, São Paulo, Brasil) e Mapric (São Paulo, São Paulo, Brasil), com os devidos laudos e especificações. Os extratos foram preparados em propilenoglicol, na concentração de 200 mg/mL a partir dos talos e folhas do abacateiro e das folhas de hamamélis, respectivos laudos em anexo A e B.

As cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) de *K. pneumoniae* (ATCC 4352) e de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) são provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Curso de Odontologia – ICT/UNESP. As 8 cepas clínicas de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos convencionais (conforme indicado na Tabela 1) foram cedidas pelo Laboratório Médico do Grupo Policlín (Bioclin). 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 (Kasvi, Itália) 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 *K. pneumoniae* apresentou colônias róseas e *P. aeruginosa* apresentou colônias verdes esbranquiçadas, com alteração na coloração do meio, tornando-o amarelado devido a alteração de pH e sua incapacidade de fermentação da lactose, como mostra a Figura 1.

O perfil de resistência dos sete isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* está indicado no Quadro 1.

Quadro 1 – Perfil de resistência dos sete isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* frente a antimicrobianos convencionais

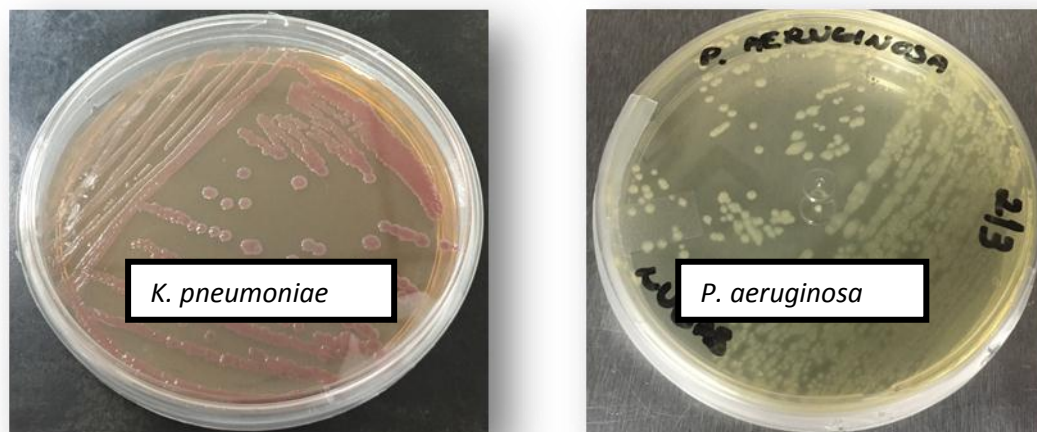
Antibióticos Convencionais	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	631439	493715
	714810	636344
	758663	136030
	820195	Cepa 3
	821924	Cepa 4
	884724	Cepa 7
	888251	Cepa 9
Amicacina	SEN	SEM
Ácido Clavulânico + Amoxicilina	RES	-
Ampicilina	RES	-
Ampicilina + Sulbactam	RES	-
Aztreonam	RES	RES
Cefepime	RES	RES
Cefotaxima	RES	-
Ceftazidima	RES	SEM
Cefuroxime	RES	-
Ciprofloxacina	RES	RES
Colistina	RES	SEM
Gentamicina	RES	SEM
Ertapenem	RES	-
Imipenem	RES	RES
Levofloxacino	RES	RES
Meropenem	RES	RES
Piperacilina + Tazobactam	RES	RES
Tigeciclina	SEN	-
Tobramicina	RES	SEM
Trimetropim/Sulfa	RES	-

Legenda: SEN – Sensível, INT – Intermediário e RES – Resistente. Dados fornecidos pelo sistema MicroSCAN 4, provenientes do laboratório Bioclin, São José dos Campos – SP.

Em vermelho: microorganismo resistente aos carbapenêmicos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Cepa de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* semeadas em ágar MacConkey para exclusão de contaminação



Legenda: Na primeira figura, observa-se colônias mucoides róseas; Na segunda figura, observa-se colônias verdes esbranquiçadas com alteração da coloração do meio.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 Atividade antibacteriana pelo teste de microdiluição em caldo

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos foi realizada sobre cepa-padrão de *K. pneumoniae* (ATCC 4352) e cepa-padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 15442), bem como sobre 7 cepas clínicas multirresistentes de cada micro-organismo.

Para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos extratos de abacateiro e hamamélis foi adotado o método de microdiluição em caldo, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M07-A10 (M07-A10, 2015).

Primeiramente, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (ATCC e multirresistentes) foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (Himedia, Mumbai, Índia) por 24 h a 37°C. Em seguida, foi preparada uma suspensão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), cuja turbidez foi ajustada a 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) em espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brazil).

A microdiluição dos produtos vegetais foi realizada em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), onde cada extrato foi diluído em caldo Müller Hinton (Himedia, Mumbai, Índia). Para isso 100 µL de meio de cultura foram adicionados em 10 poços de cada grupo experimental, após 100 µL do respectivo extrato foi adicionado apenas no primeiro poço de cada grupo, de onde foi iniciada uma série de diluições (1:2) até a décima diluição. Todos os grupos experimentais foram testados em duplicata.

Após o processo de microdiluição, foi adicionado em todos os poços 100 µL da suspensão padronizada de micro-organismo, com a respectiva cepa teste. Com isso, o inóculo de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa* alcançou a concentração aproximada de 5×10^5 UFC/mL e a concentração do extrato foi diluída de 100 a 0,19 mg/mL. As concentrações em porcentagem (%) e miligrama por mililitro (mg/mL) utilizadas de cada extrato estão apresentadas na Quadro 2.

Quadro 2 – Concentrações dos extratos no teste de microdiluição em caldo

Concentrações testadas (%)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%	0,312%	0,156%	0,078%	0,039%	0,019%
100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml	3,12 mg/ml	1,56 mg/ml	0,78 mg/ml	0,39 mg/ml	0,19 mg/ml

Legenda: Os números de 1 a 10 representam os poços da microplaca seguido pelas respectivas concentrações do extrato aplicado. Os números em porcentagem indicam o percentual de concentração do extrato, aplicado no teste de microdiluição em caldo.

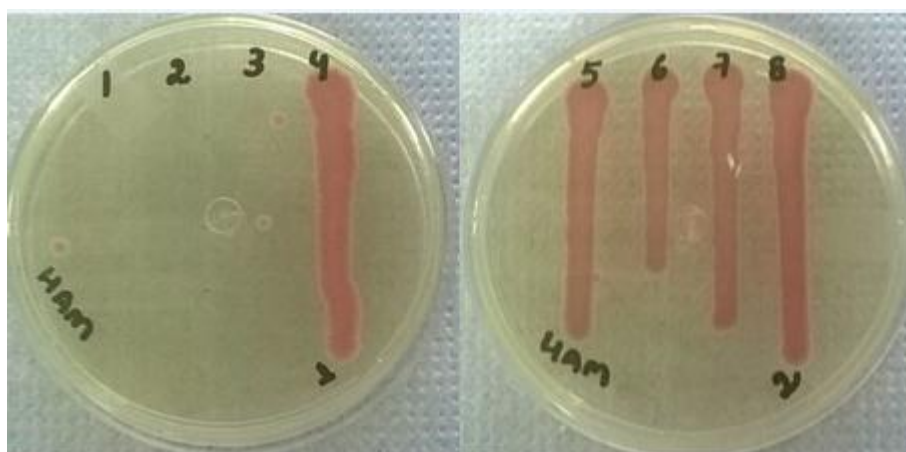
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após incubação de 24 h, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada na última diluição da microplaca, em que não foram observadas turvações.

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foram semeados 10 µL da CIM, bem como 10 µL de uma concentração acima e de uma concentração abaixo dela em ágar BHI, após as placas foram inclinadas para que as

gotas semeadas escorressem e formassem um rastro, para melhor visualização do crescimento das colônias. Após 48 h de incubação a 37°C, a CBM foi determinada na menor concentração em que não foi observado o crescimento de colônias (conforme demonstrado na Figura 2).

Figura 2 – Placas após semeadura e incubação para verificação da concentração bactericida mínima (CBM)



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos

A avaliação da atividade antibiofilme dos extratos foi realizada sobre 1 cepa-padrão de *K. pneumoniae* (ATCC 4352) e 1 cepa-padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 15442), bem como para 7 cepas clínicas multirresistentes de cada micro-organismo.

Inicialmente, as cepas foram cultivadas em ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia) por 24 h a 37°C cada. Após o período de incubação, algumas colônias foram transferidas para um tubo estéril com solução salina estéril a 0,9%, posteriormente a turbidez desta suspensão foi ajustada a 10^7 UFC/mL, com auxílio de espectrofotômetro (Micronal).

Após o preparo da suspensão padronizada de cada cepa, as mesmas foram

distribuídas em microplacas de 96 poços, no volume de 100 µL/poço, foram acrescidos, também, 100 µL/poço de caldo BHI (Himedia, Mumbai, Índia). A placa foi levada para incubação (37°C) sob agitação (75 rpm) por 48 h, e o meio de cultura foi substituído após 24 h de cultivo.

Após o período de 48 h para a formação de cada biofilme, este foi colocado em contato com os extratos de abacateiro e hamamélis, separadamente, pelo período de cinco minutos, na concentração efetiva predeterminada (CBM) e 2 superiores. Como controle negativo foi utilizado solução de clorexidina 0,12% e controle positivo solução salina estéril a 0,9%.

Posteriormente à aplicação dos extratos, os biofilmes foram lavados por 3 vezes com solução salina estéril (0,9%) e mensurados por dois diferentes testes, em que foi avaliada a biomassa do biofilme por meio do teste de cristal violeta e a viabilidade celular dos micro-organismos por meio do teste de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltrazolium bromide). Foram realizados dois experimentos independentes, com 5 repetições cada, totalizando n=10 para cada cepa/extrato.

3.2.1 Avaliação da Biomassa pelo teste do cristal violeta

Após aplicação dos tratamentos foram adicionados 200 µL/ poço de metanol por 20 min para fixação do biofilme, em seguida o metanol foi retirado e a placa foi incubada a 37°C por 24 h, para secagem. Após incubação, foram adicionados 200 µL/ poço de cristal violeta a 1% (V/V) por 5 min, o corante foi retirado, e a seguir foram realizadas lavagens para a retirada do corante em excesso. Para isso, foram intercaladas 2 lavagens com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e 1 lavagem com ácido acético a 33% (V/V). Em seguida, a placa foi lida em leitora de microplaca e as densidades ópticas convertidas na biomassa do biofilme.

3.2.2 Viabilidade celular dos micro-organismos pelo teste de MTT

Depois de submetido aos respectivos tratamentos o biofilme foi preparado para o teste de MTT (Figura 5). Para isso, foram adicionados 200 μ L da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), composta por 0,5 mg do sal para cada ml da solução. A placa foi incubada ao abrigo da luz em estufa a 37°C por 1 h. Passado o período de incubação, retirou-se a solução de MTT e foi adicionado 200 μ L de Dimetilsufóxido (DMSO), com nova incubação em estufa a 37°C por 10 min. Em seguida, a placa foi encaminhada para uma agitadora de microplaca por 10 min. Após esse processo, a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm.

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 5.0, em que foram submetidos ao teste de normalidade, cujos dados que obtiverem distribuição normal foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Os dados que não obtiveram uma distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn's ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antibacteriana pelo teste de microdiluição em caldo

O extrato de *P. americana* (abacateiro) teve ação antimicrobiana contra a cepa-padrão e 3 cepas clínicas de *K. pneumoniae* das 8 cepas avaliadas, e o extrato de *H. virginiana* (hamamélis) teve ação antimicrobiana contra a cepa-padrão e 4 cepas clínicas de *K. pneumoniae* (conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2).

O extrato de abacateiro para as cepas de *K. pneumoniae* 631439, 758663 e 821924 apresentou CIM de 100 mg/mL, para a cepa 888251 foi de 50 mg/mL e para cepa-padrão ATCC 4352 foi de 25 mg/mL. Esse extrato apresentou CBM de 100 mg/mL para as cepas 758663, 821924 e 888251, e para a cepa-padrão foi de 25 mg/mL (Tabela 1). Com relação ao extrato de hamamélis, este apresentou CIM de 100 mg/mL para as cepas 758663 e 821924, e de 50 mg/mL para a cepa-padrão ATCC 4352, e para as cepas 631439 e 888251. Esse extrato apresentou CBM de 100 mg/mL para as cepas 631439, 758663, 821924, 888251 e para a cepa-padrão de *K. pneumoniae* (Tabela 2).

Com relação as 8 cepas avaliadas de *P. aeruginosa*, o extrato de *P. americana* (abacateiro) teve ação antimicrobiana contra a cepa-padrão e 6 cepas clínicas, não demonstrando atividade somente contra a cepa 636344. Com relação ao extrato de *H. virginiana* (hamamélis), este teve ação antimicrobiana contra a cepa-padrão e 6 cepas clínicas, não demonstrando atividade somente contra a cepa 136030 (conforme descrito nas Tabelas 3 e 4).

O extrato de abacateiro apresentou CIM de 25 mg/mL para as cepas 493715 e cepa 9, foi de 50 mg/mL para as cepas 3, 4 e 7, e para a cepa-padrão ATCC 15442 de *P. aeruginosa*. A CBM foi de 50 mg/mL para as cepas 493715, cepa 9 e cepa-padrão, e foi de 100 mg/mL para as cepas 136030, cepa 3, 4 e 7 (Tabela 3). Com o extrato de *H. virginiana*, a CIM foi de 25 mg/mL para as cepas 493715 e cepa 4, foi de 50 mg/mL para a cepa 3, e de 100 mg/mL para as cepas 136030, 636344, cepa 7, 9 e cepa-padrão. A CBM foi de 25 mg/mL para a cepa 493715, foi de 50 mg/mL para a cepa 4, e de 100 mg/mL para as cepas 636344, cepa 3, 7, 9 e cepa-

padrão de *P. aeruginosa* (Tabela 4).

Tabela 1 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de abacateiro para 7 cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae*, determinando CIM e CBM

Extrato glicólico de Abacateiro (<i>Persea americana</i>)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIM	CBM
Kp 631439	100 mg/mL	Ausente
Kp 714810	Ausente	Ausente
Kp 758663	100 mg/mL	100 mg/mL
Kp 820195	Ausente	Ausente
Kp 821924	100 mg/mL	100 mg/mL
Kp 829339	Ausente	Ausente
Kp 888251	50 mg/mL	100 mg/mL
ATCC 4352	25 mg/mL	25 mg/mL

Nota: CIM = Concentração inibitória mínima; CBM = Concentração bactericida mínima.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de hamamélis para 7 cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae*, determinando CIM e CBM

Extrato glicólico de Hamamélis (<i>Hamamelis virginiana</i>)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIM	CBM
Kp 631439	50 mg/mL	100 mg/mL
Kp 714810	Ausente	Ausente
Kp 758663	100 mg/mL	100 mg/mL
Kp 820195	Ausente	Ausente
Kp 821924	100 mg/mL	100 mg/mL
Kp 829339	Ausente	Ausente
Kp 888251	50 mg/mL	100 mg/mL
ATCC 4352	50 mg/mL	100 mg/mL

Nota: CIM = Concentração inibitória mínima; CBM = Concentração bactericida mínima.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de abacateiro para 7 cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa*, determinando CIM e CBM

Extrato glicólico de Abacateiro (<i>Persea americana</i>)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIM	CBM
Pa 136030	100 mg/mL	100 mg/mL
Pa 493715	25 mg/mL	50 mg/mL
Pa 636344	Ausente	Ausente
Pa cepa 3	50 mg/mL	100 mg/mL
Pa cepa 4	50 mg/mL	100 mg/mL
Pa cepa 7	50 mg/mL	100 mg/mL
Pa cepa 9	25 mg/mL	50 mg/mL
ATCC 15442	50 mg/mL	50 mg/mL

Nota: CIM = Concentração inibitória mínima; CBM = Concentração bactericida mínima.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Resultados do teste de microdiluição com o extrato de hamamélis para 7 cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa*, determinando CIM e CBM

Extrato glicólico de Hamamélis (<i>Hamamelis virginiana</i>)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIM	CBM
Pa 136030	100 mg/mL	Ausente
Pa 493715	25 mg/mL	25 mg/mL
Pa 636344	100 mg/mL	100 mg/mL
Pa cepa 3	50 mg/mL	100 mg/mL
Pa cepa 4	25 mg/mL	50 mg/mL
Pa cepa 7	100 mg/mL	100 mg/mL
Pa cepa 9	100 mg/mL	100 mg/mL
ATCC 15442	100 mg/mL	100 mg/mL

Nota: CIM = Concentração inibitória mínima; CBM = Concentração bactericida mínima.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Avaliação da Biomassa pelo teste do cristal violeta

Após o tratamento com os extratos de abacateiro e de hamamélis, nas concentrações equivalentes a 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL, os resultados obtidos da avaliação da biomassa pelo teste do cristal violeta dos biofilmes formados pelas 8 cepas de *K. pneumoniae* foram demonstrados nas Figuras 6 a 13, e pelas 8 cepas de *P. aeruginosa*, nas Figuras 14 a 21.

O extrato de abacateiro, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução na biomassa formada pela cepa-padrão e por 6 das 7 cepas clínicas de *K. pneumoniae*, não demonstrando redução somente para a cepa 714810. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução de biomassa em 5 das 8 cepas avaliadas de *K. pneumoniae*, não demonstrando, portanto, redução na biomassa para as cepas 631439, 714810 e 829339. Os resultados encontrados para a concentração de 50 mg/mL foram semelhantes aos obtidos para a concentração de 100 mg/mL, porém não houve redução na biomassa formada também pela cepa padrão.

Já o extrato de hamamélis, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução na biomassa formada pela cepa-padrão e por 6 das 7 cepas clínicas de *K. pneumoniae*, não demonstrando redução somente para a cepa 714810, assim como os resultados obtidos para o extrato de abacateiro. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução de biomassa em 4 das 8 cepas avaliadas de *K. pneumoniae*, não demonstrando redução na biomassa para as mesmas cepas que não apresentaram redução também com o extrato de abacateiro (631439, 714810, 829339), e para a cepa 821924. Para a concentração de 50 mg/mL, esse extrato também demonstrou redução de biomassa em 4 das 8 cepas avaliadas de *K. pneumoniae*, não demonstrando redução para a cepa-padrão e para as cepas 631439, 714810 e 829339.

Conforme demonstrado pelas Figuras 14 a 21, o extrato de abacateiro, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução na biomassa formada pela cepa-padrão e por 6 das 7 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, não demonstrando redução somente para a cepa 636344. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato

demonstrou redução de biomassa em 6 das 8 cepas avaliadas, não demonstrando, portanto, redução na biomassa para a cepa-padrão e para a cepa 636344. Os resultados encontrados para a concentração de 50 mg/mL demonstraram redução de biomassa em apenas 3 das 8 cepas avaliadas, não demonstrando redução na biomassa formada pela cepa padrão e pelas cepas 636344, cepa 3, 7 e 9.

Já o extrato de hamamélis, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução na biomassa em todas as 8 cepas avaliadas de *P. aeruginosa*. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução de biomassa em 7 das 8 cepas avaliadas, não demonstrando redução na biomassa somente para a cepa 636344. Os resultados para a concentração de 50 mg/mL demonstraram redução de biomassa em 5 das 8 cepas avaliadas, não demonstrando redução na biomassa para as cepas 636344, cepa 7 e 9.

4.3 Viabilidade celular dos micro-organismos pelo teste de MTT

A avaliação da viabilidade celular das 8 cepas avaliadas de *K. pneumoniae* (Figuras 6 a 13), na presença dos extratos de abacateiro e de hamamélis, foi demonstrada pela relação entre a concentração dos extratos (mg/mL) e a porcentagem de células viáveis desses micro-organismos.

O extrato de abacateiro, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução na viabilidade celular em todas as cepas avaliadas de *K. pneumoniae*. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em somente 3 das 8 cepas avaliadas de *K. pneumoniae*, não demonstrando, portanto, redução para as cepas 758663, 820195, 821924, 829339 e 888251. Os resultados para a concentração de 50 mg/mL foram semelhantes aos obtidos para a concentração de 100 mg/mL, porém para essa concentração, também não houve redução de biomassa para a cepa 631439.

Já o extrato de hamamélis, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em todas as cepas avaliadas de *K. pneumoniae*. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em 5 das 8

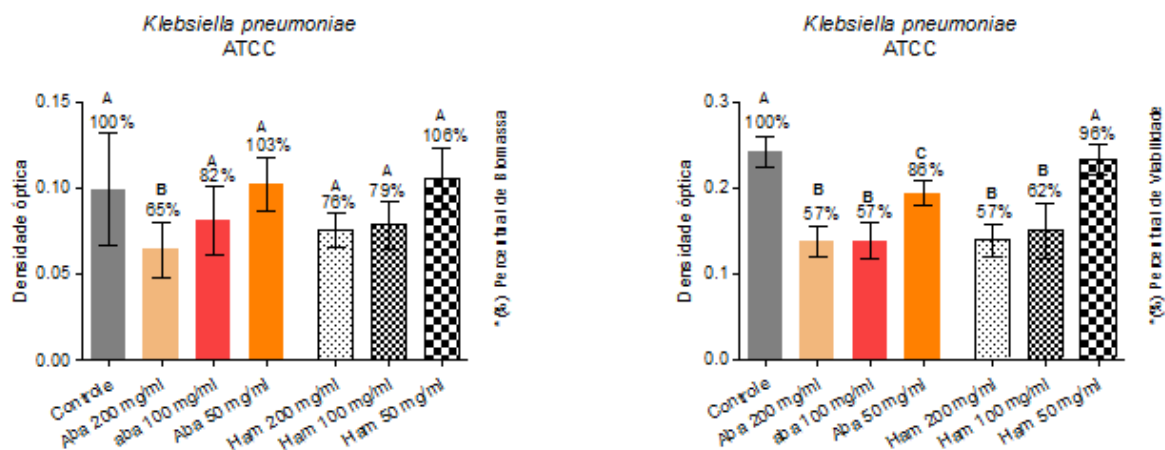
cepas avaliadas de *K. pneumoniae*, não demonstrando, portanto, redução para as cepas 631439, 758663 e 829339. Os resultados para a concentração de 50 mg/mL demonstraram redução na viabilidade celular em somente 2 das 8 cepas avaliadas de *K. pneumoniae*, não demonstrando, portanto, redução de biomassa para as cepas 631439, 714810, 758663, 820195, 821924 e 829339.

A avaliação da viabilidade celular das 8 cepas avaliadas de *P. aeruginosa* (Figuras 14 a 21), na presença dos extratos de abacateiro e de hamamélis, foi demonstrada pela relação entre a concentração dos extratos (mg/mL) e a porcentagem de células viáveis desses micro-organismos.

O extrato de abacateiro, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular na cepa-padrão e em 5 das 7 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, não demonstrando redução apenas para as cepas 7 e 9. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução de biomassa em 7 das 8 cepas avaliadas de *P. aeruginosa*, não demonstrando, portanto, redução na biomassa para a cepa 9. Os resultados para a concentração de 50 mg/mL foram semelhantes aos obtidos para a concentração de 100 mg/mL.

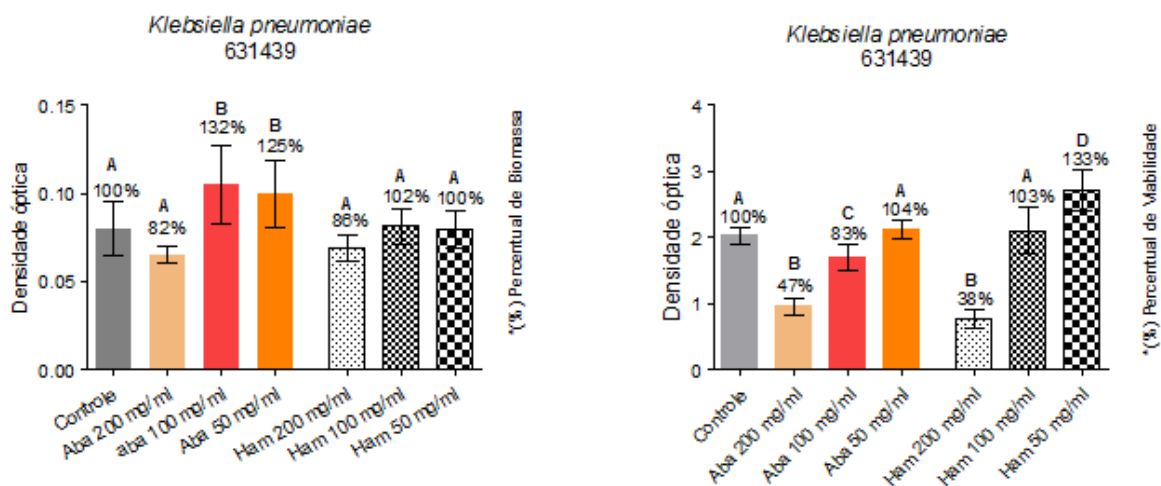
Já o extrato de hamamélis, na concentração de 200 mg/mL, demonstrou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em todas as cepas avaliadas de *P. aeruginosa*. Para a concentração de 100 mg/mL, esse extrato demonstrou redução de biomassa em 7 das 8 cepas avaliadas de *P. aeruginosa*, não demonstrando, portanto, redução na biomassa para a cepa 7. Os resultados para a concentração de 50 mg/mL demonstraram redução na viabilidade celular em 6 das 8 cepas avaliadas de *P. aeruginosa*, não demonstrando, portanto, redução de biomassa para as cepas 7 e 9.

Figura 6 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* ATCC, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



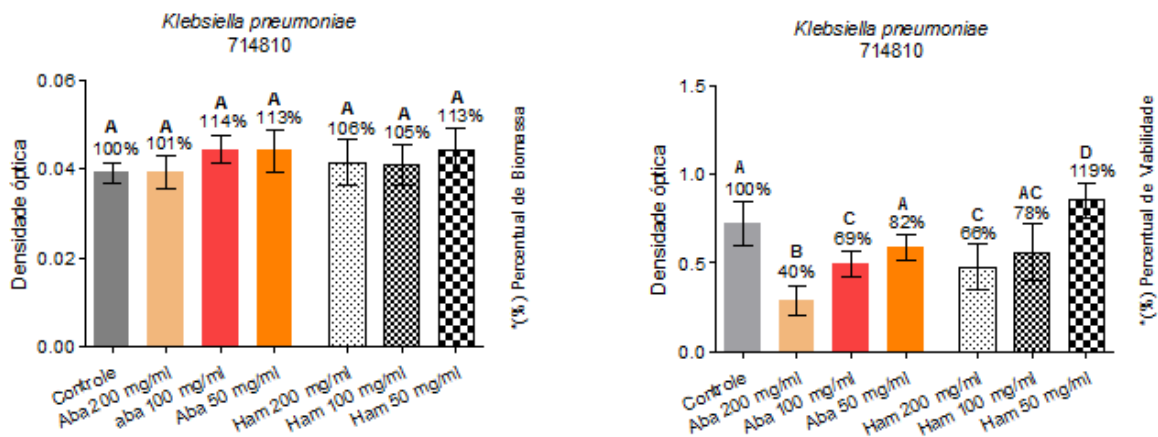
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 631439, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



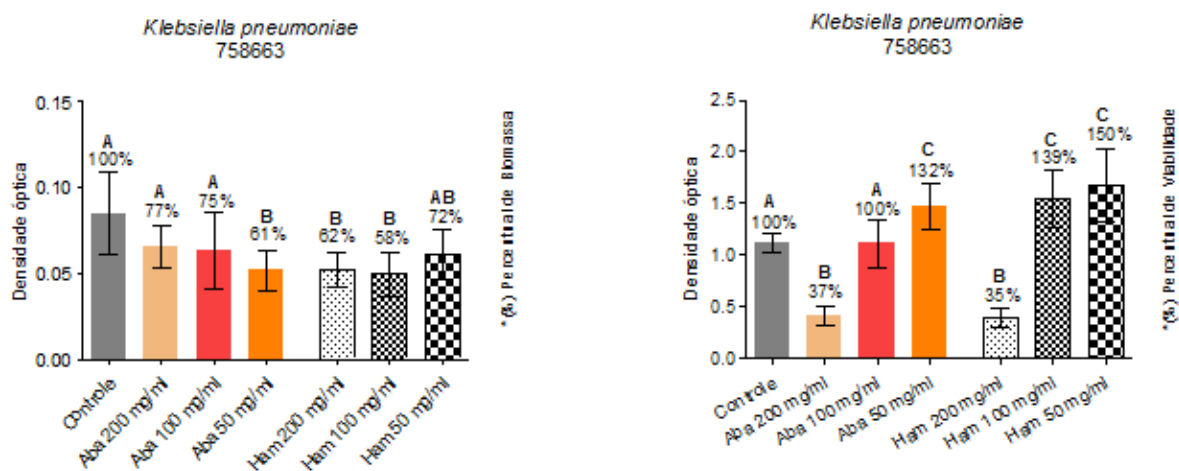
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 714810, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



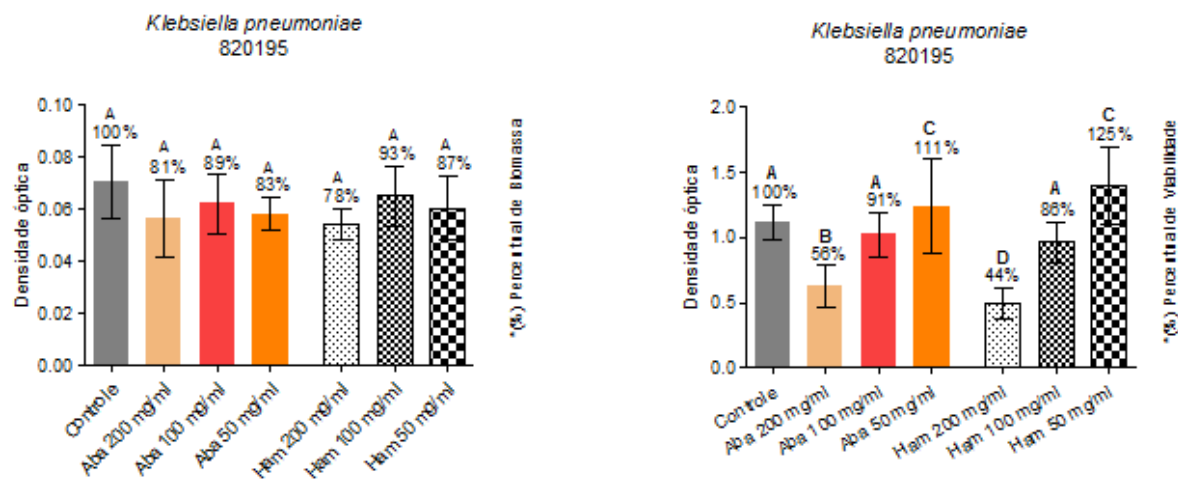
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 758663, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



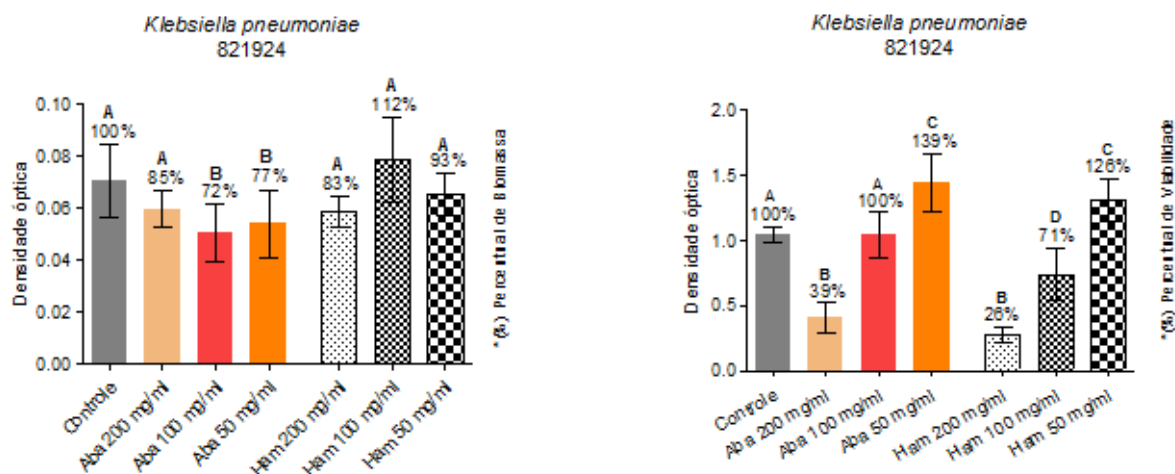
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 820195, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



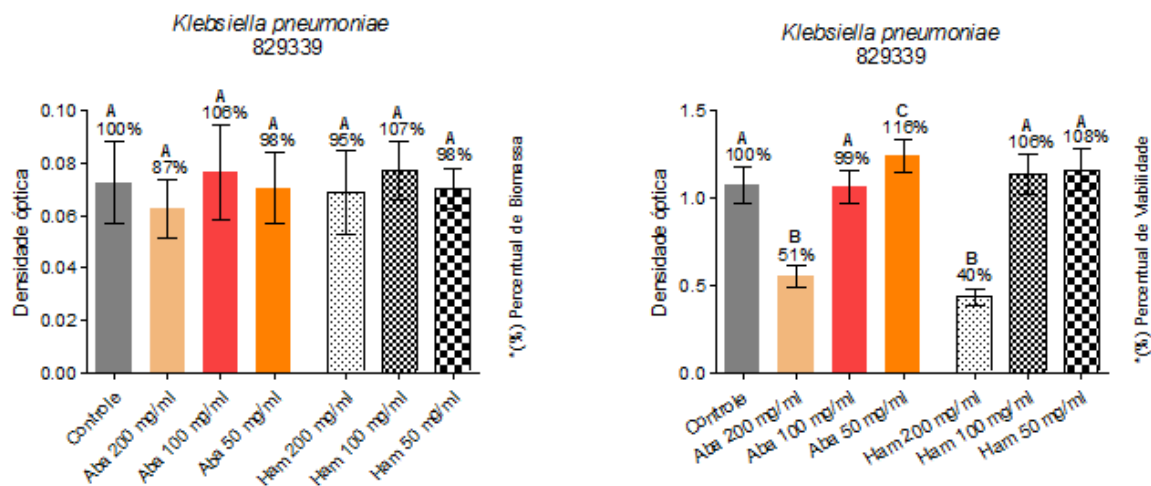
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 821924, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



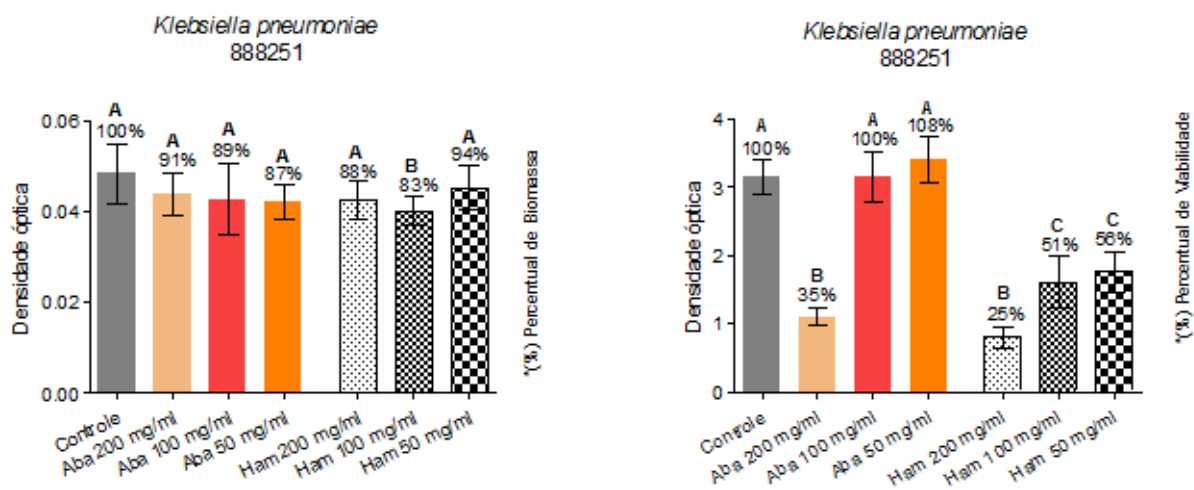
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 829339, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



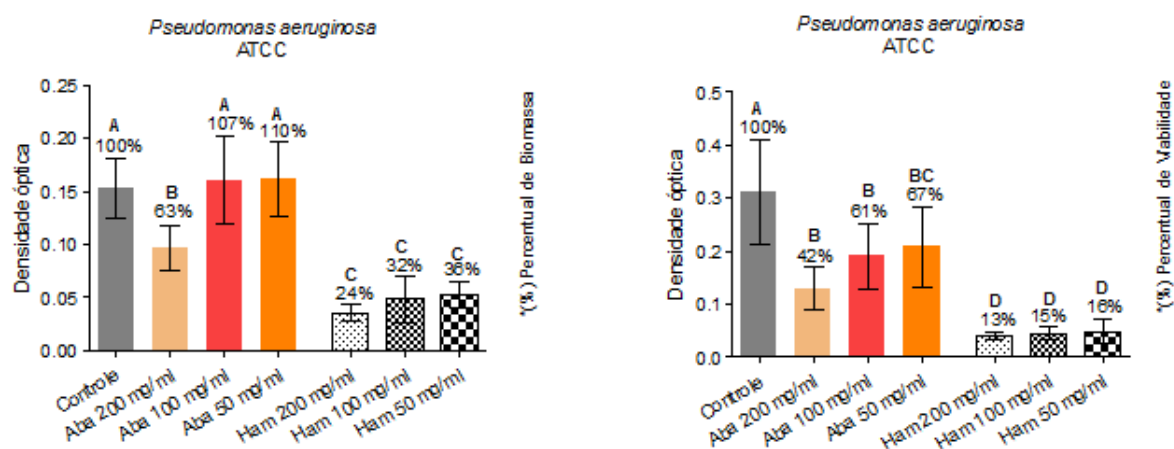
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *K. pneumoniae* 888251, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



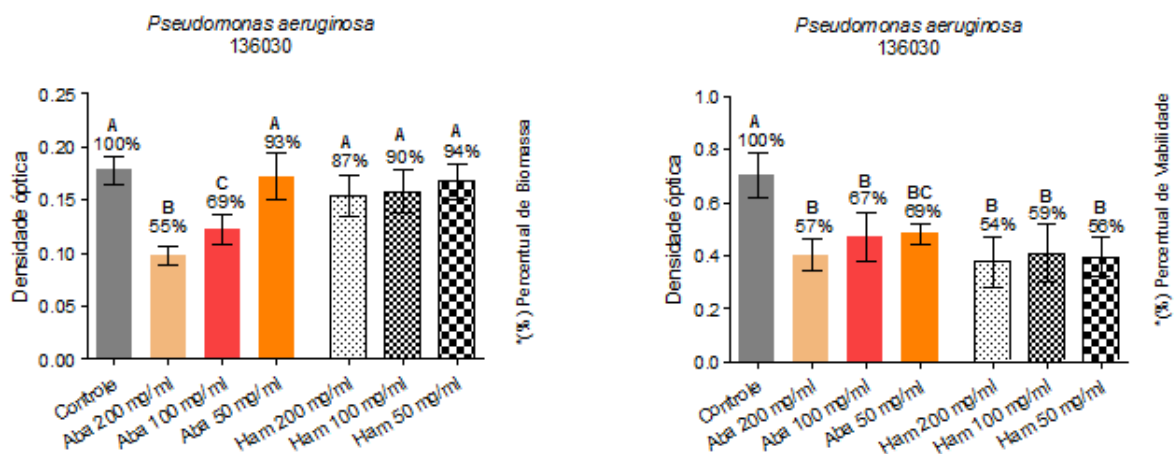
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* ATCC, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



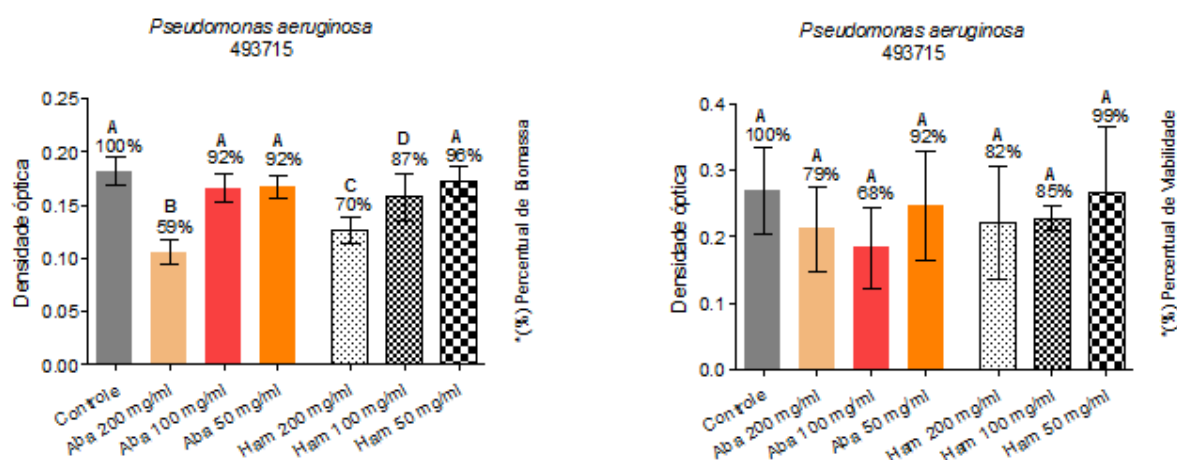
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* 136030, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



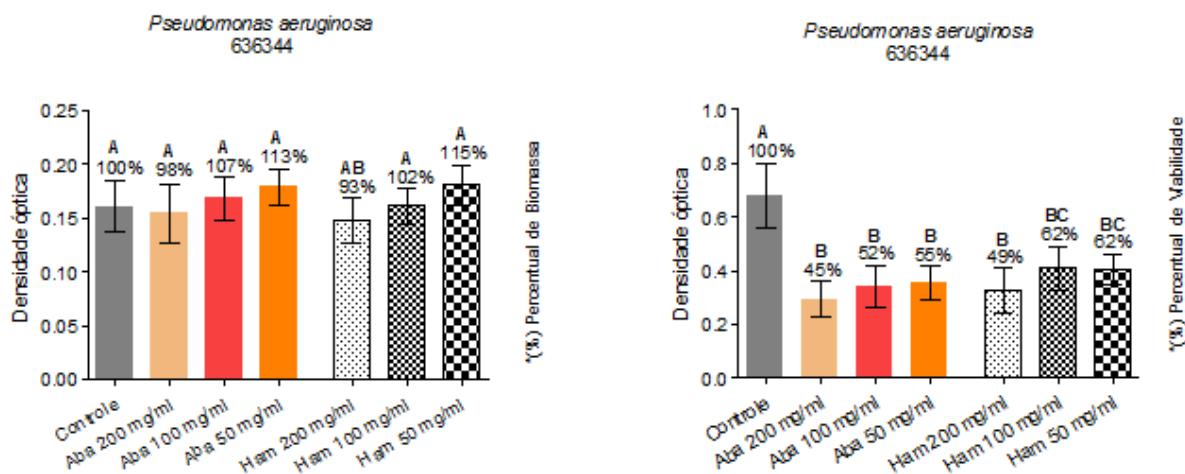
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* 493715, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



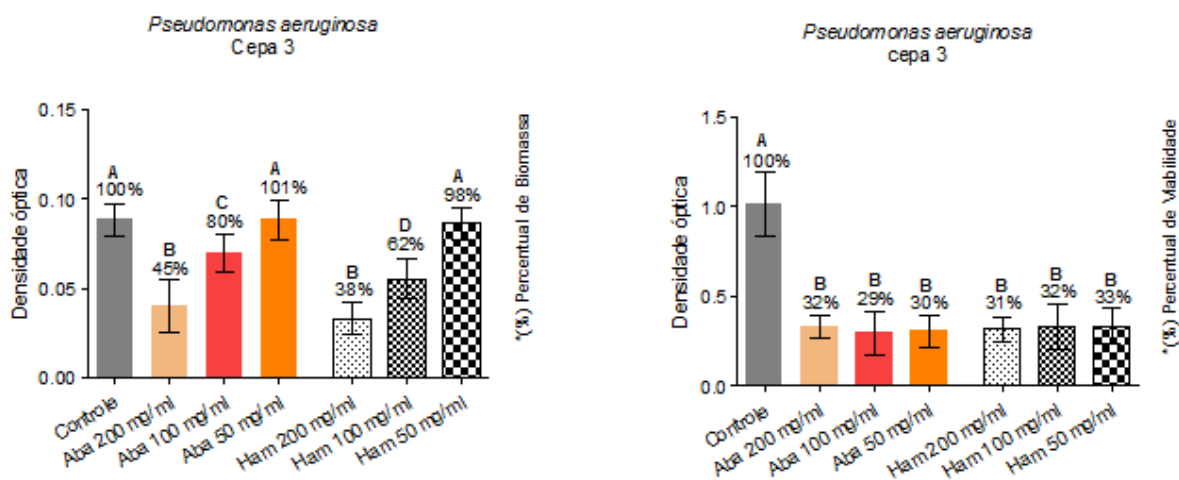
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* 636344, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



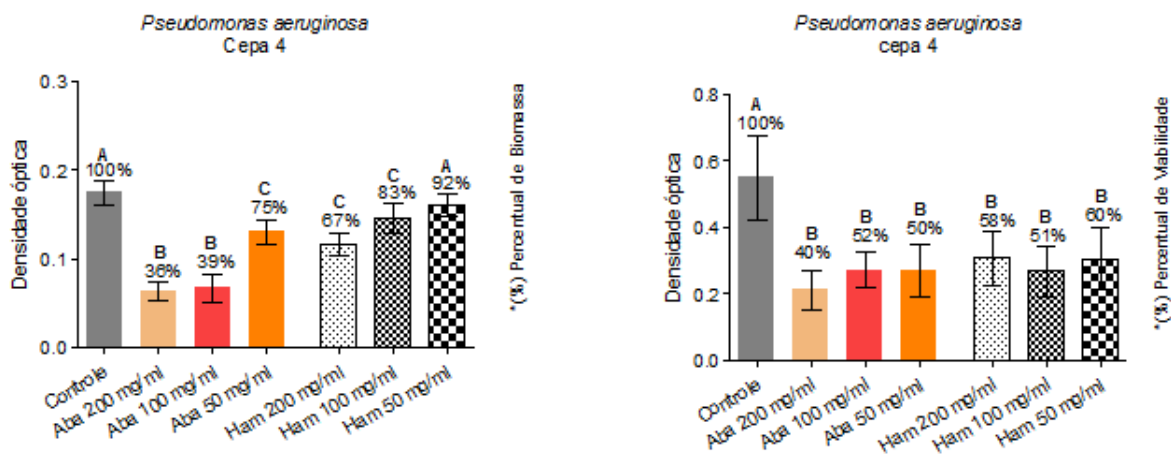
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* cepa 3, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



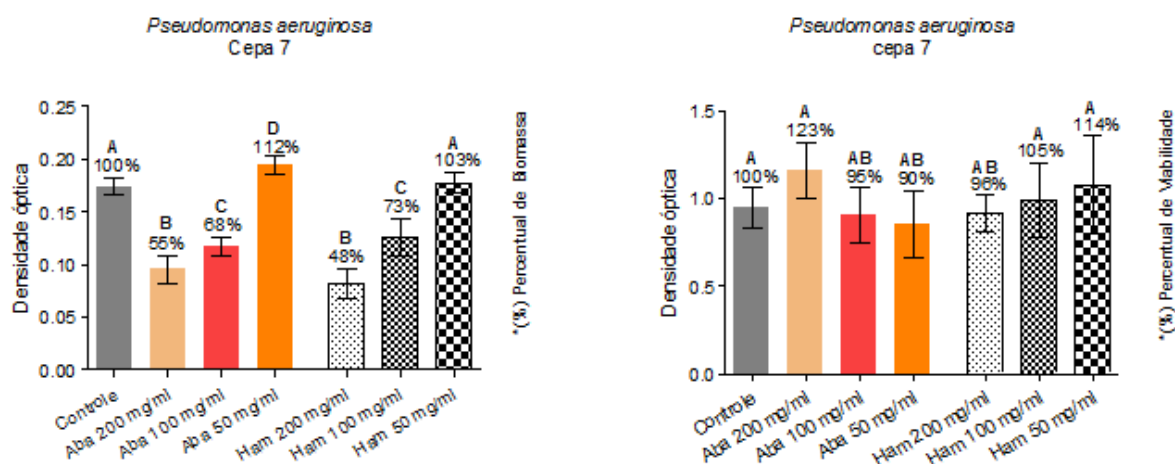
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* cepa 4, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



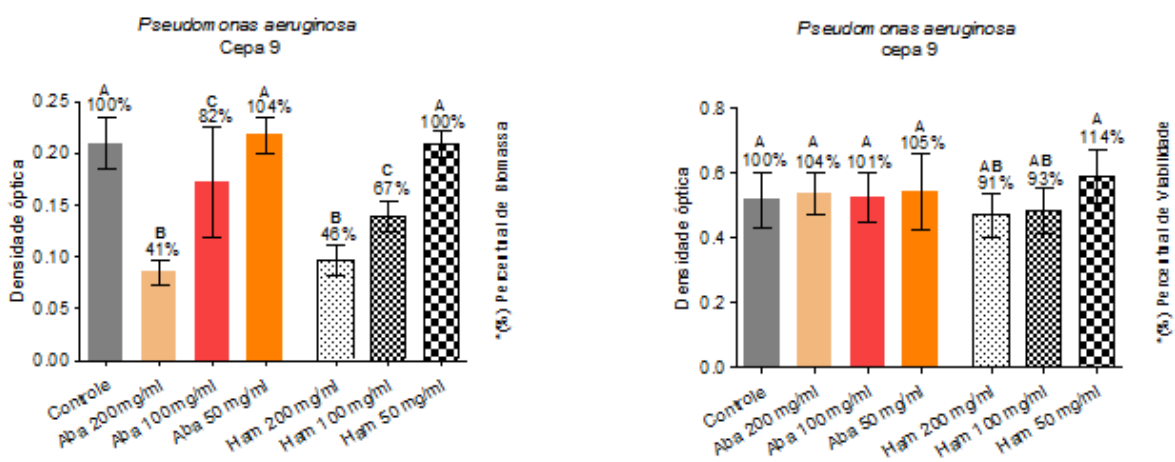
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* cepa 7, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Avaliação da biomassa (%) em biofilme e da viabilidade celular de *P. aeruginosa* cepa 9, após tratamento com os extratos de Abacateiro e de Hamamélis



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Apesar de compor a microbiota residente do trato gastrointestinal, a espécie *Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno oportunista Gram-negativo, causando principalmente infecções do trato urinário, infecções respiratórias e bacteriemia, além dos elevados índices de resistência aos fármacos antimicrobianos convencionais (Bowers et al., 2016; Rahim et al., 2016). Essa problemática mundial pode ser observada no trabalho de Guo et al. (2016) em que foi constatado que 20% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* já são resistentes aos antibióticos disponíveis. Diante desse cenário, os extratos naturais têm mostrado importante papel antimicrobiano, seja por sua ação isolada ou concomitante à administração de antibióticos já existentes (Hemaiswaryaa et al., 2008; Hong et al., 2015).

As infecções nosocomiais causadas por *Pseudomonas aeruginosa* são frequentemente difíceis de serem tratadas, devido à resistência intrínseca da espécie (Strateva, Yordanov, 2009). Relatos mundiais têm documentado a problemática de isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistente aliada a elevados índices de morbidade e mortalidade (Neves et al., 2011).

Os resultados desse estudo demonstraram que os extratos naturais possuem atividade antimicrobiana contra *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, patógenos que apresentam grandes resistência a diferentes antibióticos (Hemaiswaryaa et al., 2008; Hong et al., 2015). É notável que esse seja um estudo pioneiro, uma vez que verifica a ação antimicrobiana dos extratos de Hamamelis e Abacateiro sobre cepas que demonstraram um poder de resistência para os carbapenêmicos testados.

No presente estudo, o extrato de *H. virginiana* (hamamélis) apresentou ação antimicrobiana contra a cepa-padrão e 4 cepas clínicas de *K. pneumoniae*. Apesar de ser considerado um antisséptico, poucos estudos até o momento avaliaram a atividade antimicrobiana deste extrato. Com relação ao extrato de *P. americana* (abacateiro), este teve ação antimicrobiana contra a cepa-padrão e 3 cepas clínicas de *K. pneumoniae* das 8 cepas avaliadas. Poucos trabalhos avaliaram a ação desse extrato sobre cepas clínicas resistentes de *K. pneumoniae*, como realizado em nosso estudo. Nas concentrações testadas, estudos mostram que

tanto os extratos de Hamamélis quanto de Abacateiros não apresentam citotoxicidade para as células (Amendola et al., 2015; Jesus et al. 2015).

Segundo achados de Akinpelu et al. (2015) e Jesus et al., (2015) o extrato de *P. americana* demonstrou potencial atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas de *Bacillus cereus* e atividade antibiofilme de *Candida albicans*, respectivamente, corroborando com nosso trabalho que apesar de não serem o mesmo microorganismos, também demonstrou uma significativa redução de biomassa do biofilme, bem como diminuição na atividade metabólica do microorganismo.

Estudos realizados por Falodun et al. (2014) revelaram as atividades antibacteriana e antiplasmodial *in vitro* para três extratos vegetais testados, dentre eles o de abacateiro. O extrato demonstrou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e também demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* (MRSA). Embora sejam microorganismos diferentes dos testados no nosso trabalho, ambos tiveram resultados que corroboram com os resultados encontrados no nosso trabalho.

Idris et al. (2009) verificaram que o extrato de *P. americana* a base de metanol obtiveram valores de concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas clínicas de *K. pneumoniae*, sendo seu crescimento inibido com 30 mg/mL desse extrato. No presente estudo, verificamos a ação bactericida do extrato glicólico de *P. americana* sobre a cepa-padrão e algumas cepas clínicas de *K. pneumoniae* e de *P. aeruginosa*, tanto nas concentrações de 200 mg/mL, como nas de 100 mg/mL e de 50 mg/mL de extrato.

A ação dos extratos de *Pfaffia paniculata* K., *Juglans regia* L. e *Rosmarinus officinalis* L. foi avaliada contra a forma planctônica e em biofilme de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) a uma concentração de 200 mg/mL. Esses extratos demonstraram ação microbicida na forma planctônica, mas apenas *P. paniculata* K. e *R. officinalis* L. foram eficazes contra o biofilme formado pela cepa-padrão de *K. pneumoniae* (Ramos et al., 2016). Esses resultados corroboram os resultados obtidos no nosso estudo, em que os extratos de abacateiro e hamamélis, nessa concentração, demonstram ação microbicida e atividade antibiofilme tanto pela cepa-padrão, como pelas cepas clínicas de *K. pneumoniae*, porém em nosso estudo os extratos de hamamélis e abacateiro também apresentaram ação microbicida e antibiofilme nas concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL.

O trabalho desenvolvido por Tchana et al. (2014), cujo objetivo foi avaliar as atividades antibacterianas *in vitro* de algumas plantas medicinais da República de Camarões contra bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR), demonstrou fraca atividade antibacteriana pela maioria das plantas estudadas, dentre elas o extrato de *Persea americana*. Segundo os autores, os resultados podem ter ocorrido devido às características de resistência das cepas bacterianas estudadas. No entanto, nosso estudo obteve resultados significativos com relação a atividade antimicrobiana demonstrada por esse extrato contra cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, tanto na avaliação da redução de biomassa, como na redução da viabilidade celular desses micro-organismos.

A atividade antibacteriana de extratos vegetais da família *Lamiaceae* foi avaliada contra isolados clínicos de bactérias Gram-negativas multirresistentes pela técnica de microdiluição em caldo, cujos resultados demonstraram tal atividade contra, pelo menos, duas espécies bacterianas avaliadas (Assis et al., 2018), entre as espécies estudadas estão *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, resultados que se assemelham aos encontrados em nosso estudo.

O extrato hamamélis tiveram ação antimicrobiana contra cepa-padrão e 6 cepas clínicas de *P. aeruginosa* das 8 cepas avaliadas, indicando bons resultados antimicrobianos. Estes resultados concordam com Lauk et al. (2003) que embora tenha analisado o extrato metanólico de hamamélis sobre bactérias anaeróbias e aeróbias facultativas presentes em doenças periodontais, demonstraram atividade inibitória, sendo capaz de diminuir significativamente os patógenos residentes na cavidade bucal, cujos micro-organismos apresentam resistência intrínseca a vários antibióticos usados na odontoterapia.

Rocalbas et al. (2013) avaliou hidrogéis constituídos por compostos fenólicos presentes na planta *Hamamelis virginiana* e os resultados demonstraram atividade antibacteriana contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Em nosso estudo, avaliou-se o extrato glicólico de *H. virginiana*, porém também observamos atividade antibacteriana contra cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa*.

O objetivo dos estudos de Khan et al. (2018) foi avaliar o potencial anti-infeccioso *in vitro* de nove plantas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias contra espécies multirresistentes (MDR), como *E. faecium*, *S. aureus*,

K. pneumoniae, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter*. Os extratos foram avaliados quanto à inibição do crescimento desses patógenos e à atividade antibiofilme. Cinco das nove plantas medicinais avaliadas nesse estudo exibiram atividade antibacteriana contra, pelo menos, um patógeno MDR, em concentrações não prejudiciais aos queratinócitos humanos, apesar de utilizarem nesse estudo *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* o trabalho não avaliou nenhum dos extratos presentes em nosso estudo, mas assim como no nosso trabalho também obtiveram resultados positivos com os extratos testados, diante do cenário mundial com a grande preocupação em encontrar fármacos para combater esses patógenos multirresistentes, as plantas medicinais mostram-se promissoras no combate a micro-organismos, por apresentarem propriedades antimicrobianas eficazes, o que reitera a proposta do nosso estudo.

A manutenção da arquitetura de biofilmes pode ser assegurada pela formação de canais e colunas, que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio para toda a comunidade microbiana (Xavier, 2005), em nosso estudo os extratos de hamamélis e abacateiro foram capazes de reduzir a biomassa do biofilme de 3 cepas clínicas multirresistentes e 1 cepa ATCC de *K. pneumoniae* e 6 cepas clínicas multirresistentes e 1 cepa ATCC de *P. aeruginosa*. Demonstrando um resultado significativo, especialmente diante do impacto negativo que a infecção por esses microorganismos causam por estarem associados ao aumento da mortalidade.

Estudos de Mouchrek Junior et al. (2015) avaliaram a atividade antibiofilme de vários enxaguatórios bucais comerciais, em que *H. virginiana* demonstrou significativa redução do biofilme dentário. No entanto, não foram descritas as espécies de micro-organismos que sofreram este efeito, sendo avaliado apenas, o aspecto clínico do biofilme formado. Poucos estudos demonstraram uma atividade antimicrobiana de amplo espectro nos enxaguatórios bucais, eficazes tanto contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como contra o gênero *Mycobacterium*, bactérias anaeróbias, esporos e fungos do gênero *Candida* (Bugno et al., 2007).

O fato de algumas cepas não apresentarem redução da biomassa do biofilme pode estar associada à capacidade de aderência dessas bactérias em dispositivos médicos, que são necessários para a manutenção da vida na grande maioria dos pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (Du et al., 2016). Porém apesar desse fato, houve uma redução acentuada do percentual de

viabilidade celular em todas as cepas utilizadas de *K. pneumoniae* e 4 cepas clínicas multirresistentes e 1 cepa ATCC de *P. aeruginosa* na presença de ambos os extratos utilizados no trabalho.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os extratos glicólicos de *H. virginiana* (hamamélis) e *P. americana* (abacateiro) apresentaram ação antimicrobiana, resultando em concentrações com capacidade bactericida e significativa redução dos biofilmes formados pelas cepas multirresistentes e ATCC de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS *

- Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2006 Mar;27(3):196-200.
- Akinpelu, DA, Aiyegoro, AO, Akinpelu, OF, Okoh, AI. Stem Bark Extract and Fraction of *Persea americana* (Mill.) Exhibits bactericidal activities against strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning. Molecules. 2015;20:416-29.
- Amendola I. Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* Linnaeus [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2015.
- Arora DS, Sood H. In vitro antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R.Br. leaves and their biosafety evaluation. AMB Expr. 2017;7:115. doi 10.1186/s13568-017-0416-z.
- Assis FV, Siqueira FL, Gonçalves IE, Lacerda RP et al. Antibacterial activity of Lamiaceae plant extracts in clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. An Acad Bras Cienc. 2018 Apr-Jun;90(2):1665-70. doi: 10.1590/0001-3765201820160870.
- Bahiense JB, Marques FM, Figueira MM, Vargas TS, Kondracyuk TP, Endringer DC et al. Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. Pharm Biol. 2017;55(1):991-7.
- Benthall G , Rebecca E. Touzel, Charlotte . Hind, Richard W. Titball, J Mark Sutton, Rachael J. Thomas et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in Galleria Mellonella. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(5):538-45.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127-52. Review. PubMed PMID: 16216776.
- Bowers JR, Lemmer D, Sahl JW, Pearson T, Driebe EM, Wojack B, et al. KlebSeq: A diagnostic tool for surveillance, detection, and monitoring of *Klebsiella pneumoniae*. JCM J Clin Microbiol 2016;54(10):2582-96. doi:10.1128/JCM.00927-16.
- Brandelli CL, Ribeiro VB, Zimmer KR, Barth AL, Tasca T, Macedo AJ. Medicinal plants used by a Mbyá-Guarani tribe against infections: activity on KPC-producing isolates and biofilm-forming bacteria. Nat Prod Commun. 2015;10(11):1847-52.

* 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.

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Antimicrobial efficacy of Curcuma zedoaria extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. Braz J Microbiol. 2007 Sept;38(3):440-5.

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 KH, Chen LR, Wang YK. Contamination of medical charts: an important source of potential infection in hospitals. Plos One. 2014;9(2):e78512.

Chukwujekwu JC, Touani FK, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Dschang, 2016.

Chukwujekwu JC, van Staden J. In vitro antibacterial activity of *Combretum edwardsii*, *Combretum krausii*, and *Maytenus nemorosa* and their synergistic effects in combination with antibiotics. Front Pharmacol. 2016 Jul 15;7:208. doi:10.3389/fphar.2016.00208.

Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. FEMS Microbiol Lett. 2016 Oct;363(20):219. doi: 10.1093/femsle/fnw219.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A10 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. 30th ed. Wayne (PA):CLSI; 2015. ISBN 1-56238-988-2 Electronic.

Davidson EA, Trumbore SE, Amundson R. Biogeochemistry: Soil warming and organic carbon content. Nature. 2000 Dec 14;408: 789-90. doi: 10.1038/35048672.

Du J, Cao J, Shen L, Bi W, Zhang X, Liu H, et al. Molecular epidemiology of extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Wenzhou, Southern China. J Med Microbiol. 2016 Aug 65(10):1111-8. doi: 10.1099/jmm.0.000338.

Dzotam JK, Touani FK, Kuete V. Atividades antibacterianas do metanol extratos de *Canarium schweinfurthii* e outras quatro plantas alimentares camaroneses contra bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplas drogas. Saudi J Biol Sci. 2016 Set; 23 (5): 565-70. doi: 10.1016 / j.sjbs.2015.06.006. Epub 2015 jun 17. PubMed PMID: 27579004; PubMed Central PMCID: PMC4992100.

Ergönül Ö, Aydin M, Azap A, Başaran S, Tekin S, Kaya S. Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. J of Hospital Infection. 2016;94(4):381-5. doi:10.1016/j.jhin.2016.08.012 Reference: YJHIN 4893.

Falodun A, Imieje V, Erharuyi O, Ahomafor J, Jacob P, Khan SI, et al. Evaluation of three medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum* and selected microorganisms. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014 Jun 4;11(4):142-6.

Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic Antimicrobial Activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against Multidrug-Resistant Bacteria. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118431. doi:10.1371/journal.pone.0118431.

Ferreira H, Lala ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. *Rev Panam Infectol*. 2010;12(2):44-50.

Gayani B, Dilhari A, Wijesinghe GK, Kumarage S, Abayaweera G, Samarakoon SR, Perera IC, Kottegoda N, Weerasekera MM. Effect of natural curcuminoids - intercalated layered double hydroxide nanohybrid against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterococcus faecalis*: A bactericidal, antibiofilm, and mechanistic study. *Microbiologyopen*. 2018 Sep 17:e00723. doi: 10.1002/mbo3.723.

Goldberg JB. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. In: Ramos J-L, Filloux A. *Pseudomonas*: Molecular microbiology, infection and biodiversity. New York: Springer, 2010. p. 141-176.

Guo X, Cao Z, Dai Z, Li Y, He X, Hu X, Tian F, Ren Y. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Central China. *Jpn J Infect Dis*. 2016;70(3):229-34.

Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*. 2000 Aug; 3(4):247-55. doi: 10.1054/drup.2000.0152.

Hong SB, Rhee MH, Yun BS, Lim YH, Song HG, Shin KS. Synergistic anti-bacterial effects of *Phellinus baumii* Ethyl Acetate extracts and β -Lactam antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Lab Med*. 2016;36(2):111-6. doi: 10.3343/alm.2016.36.2.111.

Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res*. 2003;17: 599-604. doi: 10.1002/ptr.1188.

Idris S, Ndukwe GI, Gimba CE. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of seed extracts of *Persea americana* (Avocado Pear), Bayero. *J Pure Appl Sci*. 2009;2(1):173-6. doi: 10.4314/bajopas.v2i1.58538.

Jesus D, Oliveira JR, Oliveira FE, Higa KC, Junqueira JC, Jorge AO, Back-Brito GN, Oliveira LD. *Persea americana* glycolic extract: in vitro study of antimicrobial activity against *Candida albicans* biofilm and cytotoxicity evaluation. *Scientific World Journal*.

2015;2015:531972. doi: 10.1155/2015/531972. Epub 2015 Oct 29. PubMed PMID: 26605376.

Khan MF, Tang H, Lyles JT, Pineau R, Mashwani ZU, Quave CL. Antibacterial properties of medicinal plants from Pakistan against multidrug-resistant ESKAPE pathogens. *Front Pharmacol*. 2018 Aug 2;9:815. doi: 10.3389/fphar.2018.00815.

Lee J, Nho YH, Yun SK, Hwang YS. Use of ethanol extracts of *Terminalia chebula* to prevent periodontal disease induced by dental plaque bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17:113. doi 10.1186/s12906-017-1619-1.

Mouchrek Junior JC, Nunes LH, Arruda CS, Rizzi Cde C, Mouchrek AQ, Tavares RR. Effectiveness of oral antiseptics on tooth biofilm: a study in vivo. *J Contemp Dent Pract*. 2015;1:16(8):674-8. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1739

Mukhopadhyay R, Roy S, Venkatadri R, Su Y-P, Ye W, Barnaeva E, et al. Efficacy and mechanism of action of low dose emetine against human cytomegalovirus. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):e1005717. doi:10.1371/journal.ppat.1005717.

Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep;13(9):785–96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7.

Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47:4. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442011000400004>.

Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Sep;59(9):5159-64. doi: 10.1128/AAC.00158-15.

Nunes TRS, Cordeiro MF, Beserra FG, de Souza ML, Silva WAV, Ferreira MRA, et al. Organic Extract of *Justicia pectoralis* Jacq. Leaf inhibits interferon- γ secretion and has bacteriostatic activity against *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018 Aug 23;2018:5762368. doi: 10.1155/2018/5762368.

Oliveira JR, Jesus D, Figueira LW, Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SE, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(6):625-34. doi: 10.1177/1535370216688571.

Osei SJ. Current State of Resistance to Antibiotics of Last-Resort in South Africa: A Review from a Public Health Perspective. *Front Public Health*. 2016 Sep 30;4:209.

Pitout F, Marchaudon A, Blelly P-L, Bai X, Forme F, Buchert SC, et al. Swarm and ESR observations of the ionospheric response to a field-aligned current system in the high-latitude midnight sector. *Geophys Res Lett*. 2015;42(11):4270-9. doi: 10.1002/2015GL064231.

Pleszczyńska M, Wiater A., Siwulski M, Lemieszek MK, Kunaszewska J, Kaczon J, et al. Cultivation and utility of *Piptoporus betulinus* fruiting bodies as a source of anticancer agents. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32:151. doi:10.1007/s11274-016-2114-4.

Rahim K, Qasim M, Rahman H, Khan TA, Ahmad I, Khan N, et al. Antimicrobial resistance among aerobic biofilm producing bacteria isolated from chronic wounds in the tertiary care hospitals of Peshawar, Pakistan. *J Wound Care*. 2016 Aug; 25(8):480-6. doi: 10.12968/jowc.2016.25.8.480.

Rajasekharan S, Martens L, Domingues L, Cauwels R. SCN9A channelopathy associated autosomal recessive congenital indifference to pain. a case report. *Eur J Paediatr Dent*. 2017;18(1):66-8.

Ramos LP, Santos CER, Mello DCR, Theodoro LN, Oliveira FE, Back Brito GN, et al. *Klebsiella pneumoniae* planktonic and biofilm reduction by different plant extracts: in vitro study. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016:3521413. doi: 10.1155/2016/3521413.

Rocasalbas G, Francesko A, Tourino S, Fernández-Francos X, Guebitz GM, Tzanov T. Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. *Carbohydr Polym*. 2013 Feb 15;92(2):989-96. doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.045.

Rodríguez-Leguizamón G, Fiori A, Lagrou K, Gaona MA, Ibáñez M, Patarroyo MA, Dijck PV, et al. New echinocandin susceptibility patterns for nosocomial *Candida albicans* in Bogotá, Colombia, in ten tertiary care centres: an observational study. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15:108. doi: 10.1186/s12879-015-0840-0.

Rossi GI, Ferreira ML, Araujo BF, Campos PA, Royer S, Batistão DW, et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2016;94(4):322-9. doi: 10.1016/j.jhin.2016.08.019.

Sakkas H, Gousia P, Economou V, Sakkas V, Petsios S, Papadopoulou C. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016 May 30;5(3):212-8. doi: 10.5455/jice.20160331064446.

Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*. 2010;6:16. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>.

Seukep JA, Sandjo LP, Ngadjui BT, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-resistance modifying activity of the extracts and compounds from *Nauclea pobeguini* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:193. doi 10.1186/s12906-016-1173-2.

Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J*. 2017;11:53–62. Published online 2017 Apr 28. doi: 10.2174/1874285801711010053.

Siriyong T, Srimanote P, Chusri S, Yingyongnarongkul Boon-ek, Suaisom C, Tipmanee V & Voravuthikunchai SP. Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17:405. doi 10.1186/s12906-017-1913-y.

Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58:1133-48. doi:10.1099/jmm.0.009142-0.

Taylor RM. Ethical principles and concepts in medicine. *Handb Clin Neurol*. 2013;118:1-9. doi: 10.1016/B978-0-444-53501-6.00001-9.

Tchana ME, Fankam AG, Mbaveng AT, Nkwengoua ET, Seukep JA, Tchouani FK, et al. Activities of selected medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria in Cameroon. *Afr Health Sci*. 2014 Mar;14(1):167-72. doi: 10.4314/ahs.v14i1.25.

Utcharykiat I, Surassmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:158. Published online 2016 Jun 1. doi: 10.1186/s12906-016-1134-9.

Voukeng IK, Beng VP, Kuete V. Multidrug resistant bacteria are sensitive to *Euphorbia prostrata* and six others Cameroonian medicinal plants extracts. *BMC Res Notes*. 2017;10:321. doi 10.1186/s13104-017-2665-y.

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

Xavier JB, Piciooreanu C, Van Loosdrecht MC. A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms. *Environ Microbiol*. 2005 Aug;7(8):1085-103. PubMed PMID: 16011747.

ANEXO A – Laudo do Extrato Glicólico de Hamamélis



EXTRATO GLICÓLICO DE HAMAMÉLIS (HG)

Nome Científico: *Hamamelis virginiana L.* / Hamameliaceae

INCI: Hamamelis Virginiana Leaf Extract

Nº CAS: 84696-19-5

Parte Utilizada: Folhas

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Tanino pirogálico (hamamelitanino); pouco óleo essencial; saponina ácida; colina; ácidos graxos; mucilagem e pectina.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS:

O Extrato Glicólico de Hamamélis tem ação adstringente, vasoprotetora, vasoconstritora, descongestionante, antioleosidade, anti-acnêica. Indicado nas afecções venosas como varizes, flebites, hemorróidas; em preparações para oleosidade excessiva da pele e do couro cabeludo. Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, sabonetes, máscaras faciais, loções de limpeza, produtos pós-barba e outros produtos cosméticos em concentrações de até 10%. Uso Externo.

Atenção: O Extrato Glicólico de Hamamélis 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 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.

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3ª edição, 1985.

ANEXO B – Laudo do Extrato Glicólico de Abacateiro



EXTRATO GLICÓLICO DE ABACATEIRO (HG)

Nome Científico: *Persea Gratissima* Gaertner

INCI: Persea Gratissima Leaf Extract

N.º CAS: 84695-98-7

Parte Utilizada: Talo e Folhas.

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Substâncias amargas (asocatina); flavonóides; quercetina; beta-sitosterol; hepta álcool (perseitol, do qual D-perseitol é o princípio ativo); óleo essencial (estragol e anetol).

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Abacateiro tem ação hidratante, calmante e suavizante. É também indicado para peles e cabelos secos e ressecados. Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, cremes para banho e outros produtos cosméticos.

Indicado para uso externo em concentração de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Abacateiro 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 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.

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

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3º edição, 1985.

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