



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

ANA LUIZA DO ROSÁRIO PALMA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
EXTRATOS DE *Calendula officinalis*, *Capsicum annum* L e
Hamamelis virginiana L. SOBRE CEPAS CLÍNICAS
MULTIRRESISTENTES DE *Klebsiella pneumoniae* E *Pseudomonas
aeruginosa***

2022

ANA LUIZA DO ROSÁRIO PALMA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
EXTRATOS DE *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum* L e
Hamamelis virginiana L. SOBRE CEPAS CLÍNICAS
MULTIRRESISTENTES DE *Klebsiella pneumoniae* E *Pseudomonas
aeruginosa***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

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

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. 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).

Palma, Ana Luiza Do Rosário

Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana dos extratos de *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum* L e *Hamamelis virginiana* L. sobre cepas clínicas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* / Ana Luiza Do Rosário Palma. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

64 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, 2022.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. *Calendula officinalis*. 4. *Capsicum annuum* L. 5. *Hamamelis virginiana* L. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof Dr. Olavo Cardoso Jorge

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe Eduardo de Oliveira

Universidade Brás Cubas

Departamento de Odontologia

Campus Mogi das Cruzes

Profa Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Centro Universitário FUNVIC

Campus de Pindamonhangaba

São José dos Campos, 26 de janeiro de 2022.

DEDICATÓRIA

A **Deus**, meu esteio e fortaleza. Aquele que me deu o dom da vida e a saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, **Elenice do Rosário e Altair Dias Palma**. Dedico a minha mãe esta tese, pelo caráter e educação que me deu, dedicando os melhores anos da sua vida, sem você definitivamente eu não seria quem eu sou. Ao meu pai, que abdicou do crescimento das filhas para nos dar uma vida melhor, nos proporcionar o estudo, foi com o suor do seu rosto que essa tese também se escreveu.

A minha irmã **Iasmin Caroline do Rosário Farias**, minha melhor e eterna amiga, aquela que dividiu comigo vitórias, alegrias e tristezas. Obrigado por ter me dado o melhor presente de todos, nossa **Helena**, que assim como me esforcei a vida toda para ser o melhor modelo de irmã para você, que ela possa olhar para nós duas e ver que apenas o estudo transforma vidas.

As minhas amadas tias **Eliete do Rosário Silva e Ivonilda de Fátima do Rosário**, que me acompanharam desde a graduação e ajudaram minha mãe na minha criação, essa vitória é nossa! Obrigado por ser meu amparo nos caminhos da vida.

Por fim e lógico que não menos importante, o meu esposo **Ruan Araújo Ferreira da Silva**, que nos poucos anos de nossa vida juntos, me incentivou, motivou e acompanhou, nas idas para SP seja quando fui estudar ou dar aula. Obrigado por ter me escolhido para dividir a vida com você e entender que a minha vida é a docência e o estudo, pois eles são meus maiores combustíveis para viver. Te amo...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A minha orientadora Profa Assoc. Luciane Dias de Oliveira, pelo aceite de orientação que ocorreu a anos atrás quando cogitei voltar para o doutorado. Obrigado pela paciência e compreensão nos meus momentos de ansiedade e pressa gerados na pandemia.

Ao Prof. Dr. Olavo Cardoso Jorge, meu eterno agradecimento, foi o senhor que iniciou essa história comigo no mestrado e hoje estou aqui graças a primeira etapa que passamos juntos. Sempre terei lembranças e saudosismo ao falar do senhor.

As minhas amigas Aline Chiodi Borges e Cristiane Aparecida Pereira Correia, meus moldes e exemplo de microbiologistas, que me acompanharam em fases diferentes da vida e fazem parte dela até hoje.

Aos membros titulares dessa banca, que aceitaram dispor de sua tarde para auxiliar na melhora da minha tese.

A minha amiga de bancada, a segunda mão que fez toda essa tese comigo, Pâmela Beatriz do Rosário Estevam dos Santos. Tenho certeza de que sem sua orientação e seus ensinamentos essa tese não teria sido terminada, serei eternamente grata a tudo que você me ajudou na construção desse trabalho.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato	16
3.1.1 Cepas.....	16
3.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	17
3.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes monotípicos	19
3.1.4 Tratamento	19
3.1.5 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT	20
3.2 Análise estatística	20
4 RESULTADO	21
4.1 Determinação das concentrações inibitória (CIM) e microbicida mínima (CMM)	21
4.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos e tratamento no tempo de 5 minutos	22
4.3 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos e tratamento no tempo de 24 horas	36
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

Palma ALR. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos de *Calendula officinalis*, *Capsicum annum* L e *Hamamelis virginiana* L. sobre cepas clínicas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* E *Pseudomonas aeruginosa* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

O conhecimento dos efeitos dos extratos naturais de plantas vem cada vez mais se mostrando um campo promissor. Extratos de *Calendula officinalis*, *Capsicum annum* e *Hamamelis virginiana* apresentam propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e potencial antimicrobiano que deve ser aprofundado. Assim, o objetivo foi avaliar ação antimicrobiana dos extratos glicólicos em culturas planctônicas e biofilmes de cepas padrão e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi realizado o teste de microdiluição em caldo segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos. Foram realizados biofilmes monotípicos, nos tempos de contato de 5 min e 24 h, utilizando o teste de MTT. A CIM e CMM variaram de 1,56 a 50 mg/mL para todas as cepas avaliadas. *C. annum* (50 mg/mL) apresentou redução de 0,25% entre 8,60% para cepa ATCC de *P. aeruginosa* (5 min) e em 24 h redução de 99,89% entre 99,99%, destacando-se os extratos de *C. annum* (100 mg/mL) e os de *C. officinalis*. *C. annum* (200 mg/mL) apresentou redução de 18% de *K. pneumoniae* (ATCC 4352). Em 24 h houve redução de 8,86%-75,74%, para o extrato de *C. annum* (100 mg/mL). Os extratos apresentaram resultados mais satisfatórios quando expostos aos tratamentos de 24 horas. As cepas clínicas K1, K2 e K3 responderam ao tratamento de *C. annum* (50 e 100 mg/mL) ($p>0,05\%$). Para cepa clínica K4, os extratos de *C. annum* (50 e 100 mg/mL) e *C. officinalis* (12,5 mg/mL) promoveram redução de viabilidade semelhante a clorexidina 2% ($p>0,05\%$). O extrato de *C. annum* (50 e 100 mg/mL), promoveu a redução de viabilidade de P1 e P2, enquanto o extrato de *C. officinalis* (25 e 50 mg/mL), reduziu P1 ($p>0,05\%$). Para as cepas P3 e P4 o extrato de 50 e 100 mg/mL de *C. annum*, apresentaram resultados semelhantes a clorexidina. Conclui-se que todos os extratos apresentaram ação antimicrobiana em cultura planctônica, no entanto, o extrato de *C. annum* foi o que apresentou importante ação antibiofilme (24 h) sobre cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, podendo ser considerado um potencial agente antimicrobiano.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. *Pseudomonas aeruginosa*. Extrato Vegetal. *Calendula officinalis*. *Capsicum annum* L. *Hamamelis virginiana* L.

Palma ALR. *In vitro* Evaluation of antimicrobial activity of extracts from Calendula officinalis, Capsicum annuum L and Hamamelis virginiana L. on multiresistant clinical strains of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

Empirical knowledge of natural plant extracts is increasingly proving to be a promising field. Extracts of Calendula officinalis, Capsicum annuum and Hamamelis virginiana have analgesic, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potential that should be further developed. This research objective was to evaluate the antimicrobial action of glycolic extracts in planktonic cultures and biofilms of standard and clinical strains of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. The broth microdilution test was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute, to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicide Concentration (MMC) of the extracts. Tests were performed on monotypic biofilms, at contact times of 5 min and 24 h, using the MTT test. The MIC and CMM of the extracts ranged from 1.56 to 50 mg/mL for all strains evaluated. C. annuum (50 mg/mL) showed a reduction of 0.25% between 8.60% for the ATCC strain of P. aeruginosa (5 min) and in 24 h a reduction of 99.89% between 99.99%, highlighting extracts from C. annuum (100 mg/mL) and from C. officinalis. C. annuum (200 mg/mL) showed an 18% reduction in K. pneumoniae (ATCC 4352). In 24 h there was a reduction of 8.86% between 75.74% for the extract of C. annuum (100 mg/mL). The extracts showed more satisfactory results when exposed to 24-hour treatments. Clinical strains K1, K2 and K3 responded to the treatment of C. annuum (50 and 100 mg/mL) ($p > 0.05\%$). For clinical strain K4, extracts of C. annuum (50 and 100 mg/mL) and C. officinalis (12.5 mg/mL) promoted a reduction in viability similar to chlorhexidine 2% ($p > 0.05\%$). The extract of C. annuum (50 and 100 mg/mL), reduced the viability of P1 and P2, while the extract of C. officinalis (25 and 50 mg/mL), reduced P1 ($p > 0.05\%$). For strains P3 and P4, the extract of 50 and 100 mg/mL of C. annuum showed similar results to chlorhexidine. It is concluded that all extracts showed antimicrobial action in planktonic cultures, however, the extract of C. annuum was the one that showed an important antibiofilm action (24 h) on multiresistant clinical strains of K. pneumoniae and P. aeruginosa and can be considered a potential antimicrobial agent.

Keywords: Klebsiella pneumoniae. Pseudomonas aeruginosa. Plant Extracts. Calendula officinalis. Capsicum annuum L. Hamamelis virginiana L.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos um dos maiores problemas de saúde pública no mundo são os conhecidos micro-organismos multirresistentes, ou seja, bactérias que apresentam um perfil de resistência a diversos tipos de antibióticos. As chamadas bactérias multirresistentes ao longo dos anos adquiriram mecanismos capazes de driblar o sistema imune e agir contra a ação de antimicrobianos, considerado hoje um desafio para os médicos e demais profissionais da saúde que lidam com as hospitalizações em unidades de terapia intensiva. Dentre esses micro-organismos, destaca-se o grupo denominado ESKAPE, acrônimo para as seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp (Esposito, Simone, 2017).

O gênero *Klebsiella*, um dos membros dos chamado grupo das ESKAPE, juntamente com *P. aeruginosa* em 2017, foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como criticamente prioritárias para busca de novos fármacos (WHO, 2017). *K. pneumoniae* caracteriza-se por ser um gênero de patógenos oportunistas, Gram-negativos de crescimento anaeróbio facultativo, que causa uma grande gama de infecções, desde trato urinário, formação de abscessos e pneumonia (Podschun, Ullmann, 1991; Ullah et al., 2009; Avcioglu et al., 2016; Martin, Bachman, 2018; Wang et al., 2020). Carl Friedlander em 1882, foi o primeiro a descrever a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, proveniente de amostras do pulmão, de pacientes portadores de pneumonia. Com relação ao habitat são considerados ubiqüitários, ou seja, encontrados na natureza, em plantas, humanos e até mesmo animais (Friedlaender et al., 1882; Podschun, Ullmann, 1991; Wang et al., 2020).

Por pertencer a família Enterobacteriaceae, pode adquirir espectro estendido as β -lactamases e carbapenemases, sendo que os surtos de infecções causadas por *K. pneumoniae*, representam um risco crescente em especial aos pacientes hospitalizados (Podschun et al., 2001; Mandell et al., 2005; Lehloenya, Christians, 2012; Pereira et al., 2018).

K. pneumoniae além de apresentar, um perfil comum bacteriano de agente etiológico de doenças adquirida na comunidade ou hospital, pode vir a evoluir para o desenvolvimento de infecções do trato urinário e pneumonia, caracterizando-se pela

manifestação na forma de síndrome do abscesso hepático invasivo. Segundo Lee et al. (2019), o abscesso hepático invasivo é definido como um abscesso hepático com complicações de acometimento metastático, infecção essa que vem crescendo na região da Ásia e infectando pacientes diabéticos (Lee et al., 2019).

Outra bactéria Gram-negativa de interesse clínico é *P. aeruginosa*, que apresenta crescimento aeróbio, pertencente à família das Pseudomonadaceae. Ela é responsável por causar pneumonia, infecções do trato urinário, e bacteremias, bem como apresentar alto índice de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística, em detrimento de infecções crônicas que acarretam danos ao nível pulmonar e insuficiência respiratória (Shariati et al., 2018; Chegini et al., 2020).

Em todo o mundo infecções relacionadas a assistências à saúde, representam hoje um problema de saúde pública, visto que o mesmo afeta, desde os pacientes internados que estão expostos a infecção hospitalar, quanto os custos elevados pela internação prolongada (Chatzopoulou, Tsiakalou, 2019; Donlan, 2002; Watnick, Kolter, 2000).

Bactérias Gram-negativas como o gênero *Klebsiella* e *Pseudomonas*, destacam-se por sua multirresistência, sem uma previsão de novas classes de antibióticos que resolvam o panorama atual da área farmacológica (Pötgens et al., 2018; Tsala et al., 2018). Em 2011, a OMS expos em números que em uma população mista de pacientes, a prevalência dessas infecções hospitalares será de 10,1% em países de baixa e média renda e 7,6% em países de renda alta (WHO, 2011).

Em 27 de Maio de 2019, o El País um jornal diário espanhol fundado em 1976 de ampla circulação entre povos latinos, divulgou a seguinte declaração da ganhadora do Nobel de Química Ada Yonath: “Se não criarmos novos antibióticos, as pessoas morrerão aos 50 ou 60 anos, como antes”. Ada é uma pesquisadora Israelense na qual faz parte de um grupo de pesquisa que visa, o desenvolvimento de novos antibióticos que atuem apenas nas bactérias patogênicas, sem afetar o microbioma normal. Apesar da notícia ter circulado na imprensa leiga, nos alerta para o futuro com relação a resistência microbiana, justificando mais uma vez a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para combater os chamados “assassinos do século”, conforme mencionado na notícia (El País, 2019).

Os dados nos alertam para uma necessidade urgente, que é o desenvolvimento e exploração de métodos de combate alternativos, como o uso de extratos naturais de plantas. O Sistema único de saúde (SUS), divulgou por meio do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde uma lista de 71 plantas de interesse, usadas pela sabedoria popular e confirmadas cientificamente, para vários tipos de doenças (Agência de Saúde, 2009).

Vários estudos vêm sendo realizados com extratos naturais de plantas, com a finalidade de comprovar seu potencial antimicrobiano frente os mais diferentes tipos de cepas. O estudo realizado por Tóth et al. (2016) testou os efeitos antibacterianos do *Juncus inflexus* e o isolamento e identificação de seus compostos ativos contra *Staphylococcus aureus* MRSA, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores obtiveram atividade significativa (valor de CIM variando de 12,5 a 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) contra cepas de MRSA (Tóth et al., 2016).

Costa et al. (2017), avaliaram a atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana) de extratos aquosos e etanólicos de *R. echinus* contra cepas multirresistentes de bactérias (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e fungos (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) e concomitantemente com antibióticos como gentamicina, amicacina, imipenem e ciprofloxacina poderiam potencializar o efeito dos extratos. Os resultados apontaram que o extrato aquoso de *R. echinus* causou um aumento significativo na atividade dos antibióticos gentamicina e imipenem, enquanto o extrato etanólico intensificou fortemente a atividade antibiótica de gentamicina, amicacina, imipenem e ciprofloxacina contra *P. aeruginosa*.

Mostacero et al. (2019) verificaram a atividade antibacteriana de benzopiranos prenilados de *Peperomia obtusifolia*, uma planta herbácea perene nativa das Américas usada empiricamente para tratar picadas de cobra e na área cosmética como adstringente para pele. Os autores obtiveram como resultado que o composto estudado foi efetivo contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* MRSA e uma estirpe resistente à vancomicina de *Enterococcus faecalis*, apresentando valores de concentração inibitória (MIC) de 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (10,8 μM) e 8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (21,6 μM) respectivamente.

O extrato de butanol da fruta *C. annuum* revelou uma grande atividade antimicrobiana apontada no estudo realizado por Careaga et al. (2003). Os autores obtiveram através do extrato alcoólico (100 mg/mL) de *C. annuum* uma atividade antimicrobiana relativamente grande contra *Micrococcus* sp. (20 mm), *Bacillus* (10 mm), *E. coli* (17 mm), *Pseudomonas* sp (16 mm) e *Citrobacter* sp. (15 mm) (Careaga et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa em 2019 publicou um estudo sobre os efeitos terapêuticos de outro extrato de planta conhecido de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) uma planta medicinal nativa que é proveniente da região do Mediterrâneo, entretanto é cultivada no mundo todo. Possui moléculas bioativas que são chamados de fitocompostos, possuindo atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiproliferativa, antitumoral e protetora, inibitória e atenuante. O alecrim é eficaz para redução da formação do biofilme, um dos mecanismos de fator de virulência mais importante quando se trata de bactérias multirresistentes (de Oliveira et al., 2019).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), contém plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao sistema único de saúde, como a *Calendula officinalis* que ocupa a posição 13^o das plantas de importância (Agência de Saúde, 2009). *Calendula officinalis* é pertencente da família Asteraceae, conhecida de forma popular como margarida ou mal-me-quer (Efstratiou et al., 2012). Usada em tratamento de infecções e em cosmetologia por auxiliar na reparação e cicatrização tecidual. Composta de saponinas, carotenoides, mucilagem e fitoesteróis, a flor é originada do mediterrâneo (Brown et al., 1998; lauk et al., 2003; Eva et al., 2006; Fonseca et al., 2010).

Outras plantas medicinais têm sido alvo de testes na literatura para comprovar o seu potencial antimicrobiano, frente a micro-organismos multirresistentes como o *Capsicum annuum* e *Hamamelis virginiana*.

Hamamelis virginiana L. é uma árvore pequena ou arbusto, pertencente da família Hamamelidaceae, encontrada frequente em bosques úmidos, localizados na zona norte e oriental dos Estados Unidos da América e do Canadá, apesar de ser planta nativa da região canadense, ela é cultivada em alguns países da Europa (Sauer et al., 2021). Sabe-se que as infusões e destilações das folhas e da casca

são ricas em flavonóides (compostos com ação anti-inflamatória e antioxidante, que promovem o aumento da resistência dos capilares) e taninos (substâncias que atuam como antidiarreicos, antimicrobianos e cicatrizantes), entre eles o hamamelitanino e várias proantocianidinas, componentes este apontados como responsáveis pelas propriedades adstringentes da *H. virginiana* L. (Deters et al., 2001; Wolff, Kieser, 2007).

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e compreende cinco espécies domesticadas de pimenteiras que são comercializadas em todo o mundo: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens*. É uma planta nativa da América tropical na qual é cultivada como hortaliça e condimento em todos os países que apresentam o clima tropical e temperado (Govindarajan, Salzer, 1986; Menichini et al., 2009). Sempre foi muito conhecida por seu uso no combate de dores músculo esqueléticas crônicas, por possuir capsaicina (composto com ação anti-inflamatória e analgésica) e flavonoides (composto com ação anti-inflamatória e antioxidante). Suas sementes possuem uma mistura de óleo e saponinas. Entretanto, estudos tem apontado sua ação antimicrobiana (Bosland, 1996; Careaga et al., 2003; Shayan, Saeidi, 2013), na qual nos chama a atenção para potencial novo antimicrobiano (Batiha et al., 2020).

Conforme a literatura exposta, os extratos naturais de plantas apresentam um futuro promissor no combate microbiano. Entretanto, ainda existem poucos estudos que demonstrem o real efeito que eles provocam nas bactérias de âmbito hospitalar, tornando-se de interesse avaliar o potencial de diferentes extratos naturais de plantas sobre as cepas clínicas multirresistentes.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de extratos glicólicos de *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum* L. e *Hamamelis virginiana* L. sobre cepas clínicas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

a) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato natural de *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum* e *Hamamelis virginiana* sobre cepas-padrão de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e cepas clínicas multirresistentes em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM);

b) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos sobre biofilme monotípicos de cepas padrão e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* em tempos de tratamento de 5 min e 24 horas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos os extratos glicólicos de *Calendula officinalis* (extraído das folhas), *Capsicum annuum* L. (extraído das flores) e *Hamamelis virginiana* L. (extraído das sementes) da empresa Distriol Extração Vegetal (Bom Jesus dos Perdões, SP). Os extratos foram obtidos na concentração de 200 mg/ml (20%) eluídos em 80% de propilenoglicol.

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato

3.1.1 Cepas

A avaliação foi realizada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP. Após o descongelamento as mesmas foram semeadas em ágar seletivos e realizada a coloração de Gram, com a finalidade de verificar sua morfologia.

Oito cepas clínicas, foram doadas pelo Laboratório Bioclin, filiado ao Hospital Policlin de São José dos Campos, as mesmas foram isoladas de diferentes sítios como hemocultura, urina, secreção traqueal, ouvido direito e esquerdo e ponta de cateter. O perfil de resistência de cada cepa foi obtido através do sistema automatizado MicroSCAN AutoSCAN 4 ® (Beckman Coulter, Califórnia, EUA) (Quadro 1).

Quadro 1 – Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlín

ANTIBIÓTICO	Cepas de <i>P. aeruginosa</i> /sítio				Cepas de <i>K. pneumoniae</i>			
	P1 Urina	P2 Ouvido	P3 Ouvido	P4 Cateter	K1 Hemo cultura	K2 Secreção Traqueal	K3 Urina	K4 Cateter
Amicacina	S	S	S	R	-	S	S	S
Aztreonam	-	-	-	-	-	S	R	-
Cefepime	I	I	I	R	-	R	R	R
Ceftazidima	I	I	I	R	-	R	R	-
-Ciprofloxacina	I	R	I	R	R	-	R	R
Clindamicina	-	-	-	-	S	-	-	-
Clorofenicol	-	-	-	-	S	-	-	-
Colistina	-	-	-	-	-	S	S	R
Daptomicina	-	-	-	-	S	-	-	-
Eritromicina	-	-	-	-	R	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	R	R	R	R
Imipenem	I	I	I	R	-	-	R	R
Levofloxacina	I	R	I	R	-	R	R	R
Linezolida	-	-	-	-	S	-	-	-
Meropenem	S	S	S	R	-	S	R	R
Minociclina	-	-	-	-	S	-	-	-
Norfloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	R	-	-	-
Piperacilina / Tazobactam	I	I	I	R	-	R	R	R
Rifampicina	-	-	-	-	S	-	-	-
Trimetoprim-sulfmetoxazol	-	-	-	-	-	R	R	R
Tobramicina	-	-	-	-	-	R	R	-

Legenda: S: sensível; R: resistente; I: intermediário; - : teste não desenvolvido.

Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlín (São José dos Campos - SP)

3.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, normas M7-A6 que descreve testes com bactérias aeróbias.

Primeiramente, as cepas de micro-organismos foram semeadas em meio sólido, *Brain Heart Infusion* (BHI - Himedia) para bactérias, após semeadura as cepas seguiram incubadas em estufa bacteriológica (37°C) por 24 h para que fossem reativadas. Passado o período de incubação elas foram diluídas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e a suspensão padronizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm e D.O de 0,080 na concentração de 10^6 células/mL, de acordo com as recomendações da (CLSI).

Após o preparo da suspensão de micro-organismos, iniciou o preparo das diluições dos extratos. Para isso foram distribuídos, nos poços da microplaca, 100 µL de meio de cultura líquido, sendo caldo *Mueller Hinton* (Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias. A distribuição do meio foi feita utilizando 10 poços para cada grupo experimental de micro-organismo, sendo o experimento realizado em triplicata para cada extrato. Passada esta etapa, 100 µL dos extratos, na concentração de 200 mg/mL, foram adicionados apenas no primeiro poço de cada grupo, de onde partiram uma série de 10 diluições seriadas (Quadro 2). Foi realizado também controles de esterilidade do caldo e extrato nos poços 11 e 12.

As placas foram incubadas durante 24 horas e depois do período foram semeados todos os poços com auxílio de uma haste de madeira estéril em ágar BHI, onde foi realizado uma semeadura em picada para observar o crescimento ou não das colônias. Elas seguiram desta vez incubadas por 48 horas na temperatura de 37°C e foi observado se houve presença de concentração microbicida mínima (CMM), onde foi definido como a menor concentração sem crescimento bacteriano.

Quadro 2 – Diluição dos extratos glicólicos para determinação da CMM

Concentração dos extratos (mg/mL) em Microdiluição										
Poço	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
Concentração	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes monotípicos

Para a formação dos biofilmes monotípicos foram utilizadas microplacas de 96 poços onde foram adicionados 100 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - HiMedia®, Mumbai, Índia) em cada poço, na sequência foram colocados também 100 µL de suspensão microbiana padronizada em espectrofotômetro (comprimento de onda 625 nm) com 10^7 células/mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h e, em seguida, o meio de cultura foi trocado e fez-se nova incubação nas mesmas condições por mais 24 h.

Passado o período final de formação do biofilme, a partir dos resultados obtidos com a CMM, foram estabelecidas as concentrações para cada cepa e extrato e seguimos para a fase de tratamento.

3.1.4 Tratamento

Após a formação do biofilme das cepas padrão e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), ambos foram colocados em contato com cada extrato em concentrações previamente selecionadas. Foi adotado como tempo de tratamento 5 minutos e 24 horas para ambas.

Como controle positivo, foi utilizado 2% de digluconato de clorexidina e como controle negativo 0,9% NaCl estéril. Posteriormente, os extratos foram removidos e o biofilme lavado com NaCl 0,9% estéril. Três experimentos independentes foram realizados, com 10 repetições cada, total $n = 30$ para cada grupo. A mensuração foi realizada por atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando $n=12$ para cada grupo experimental.

3.1.5 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 200 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 hora em estufa a 37°C, passado o período de incubação foi retirada a solução de MTT e adicionado 200 µL de Dimetilsufóxido (DMSO) a placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sob agitação constante por 10 minutos. Após o período, a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm. As densidades ópticas obtidas foram convertidas, através da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle)}$$

3.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do software *Graphpad prism* 5.0. Foi avaliado a normalidade para definir o tipo de teste adequado. O método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* foi utilizado para resultados que apresentaram curva normal e o método *Kruskall-Wallis* complementado com o Teste de Comparação Múltipla de *Dunn* foi aplicado para testes em que não apresentaram normalidade nos dados. A significância adotada foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADO

4.1 Determinação das concentrações inibitória (CIM) e microbicida mínima (CMM)

Os resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos de *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum* L. e *Hamamelis virginiana* L. das cepas de *P. aeruginosa*, estão demonstrados na Tabela 1 e para as cepas de *K. pneumoniae* na Tabela 2.

Tabela 1 – CIM e CMM determinada para cepas ATCC 15442 e clínicas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*

CEPA - EXTRATO	CIM	CMM
ATCC 15442 – CA	50 mg/mL	50 mg/mL
ATCC 15442 -CL	25 mg/mL	50 mg/mL
ATCC 15442 -H	3,12 mg/mL	6,25 mg/mL
P1 – CA	50 mg/mL	> 50 mg/mL
P1 – CL	12,5 mg/mL	25 mg/mL
P1 – H	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL
P2 – CA	25 mg/mL	50 mg/mL
P2 – CL	12,5 mg/mL	25 mg/mL
P2 – H	6,25 mg/mL	3,12 mg/mL
P3 – CA	25 mg/mL	50 mg/mL
P3 -CL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
P3 – H	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL
P4 – CA	25 mg/mL	50 mg/mL
P4 – CL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
P4 – H	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL

Legenda: CA: *Capsicum annuum*; CL: *Calendula officinalis*; H: *Hamamelis virginiana*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – CIM e CMM determinada para cepas ATCC 4352 e clínicas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*

CEPA – EXTRATO	CIM	CMM
ATCC 4352 –CL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
ATCC 4352 -CA	25 mg/mL	> 50 mg/mL
ATCC 4352 – H	3,12 mg/mL	1,56 mg/mL
K1 – CL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL
K1 – CA	25 mg/mL	> 50 mg/mL
K1 – H	3,12 mg/mL	1,56 mg/mL
K2 – CL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
K2 – CA	50 mg/mL	> 50 mg/mL
K2 – H	12,5 mg/mL	1,56 mg/mL
K3 – CL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
K3 – CA	25 mg/mL	> 50 mg/mL
K3 – H	12,5 mg/mL	1,56 mg/mL
K4 – CL	50 mg/mL	6,25 mg/mL
K4 – CA	6,25 mg/mL	> 50 mg/mL
K4 – H	6,25 mg/mL	1,56 mg/mL

Legenda: CA: *Capsicum annum*; CL: *Calendula officinalis*; H: *Hamamelis virginiana*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos e tratamento no tempo de 5 minutos

As concentrações utilizadas para os testes em biofilmes foram determinadas a partir dos resultados apresentados na CMM, para a forma planctônica de cada cepa.

Foram consideradas as concentrações do extrato equivalentes CMM vezes dois, tanto para *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 3), quanto para *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 4). Nas tabelas abaixo, seguem os valores utilizado para tratamento do biofilme, no tempo de 5 min para as cepas-padrão e clínicas de ambas as espécies:

Tabela 3 – Concentração dos extratos utilizadas para tratamento em biofilmes monotípicos de cepas-padrão e clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) no tempo de 5 minutos

Extratos	P1	P2	P3	P4	ATCC
CL – Calendula	25 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	50 mg/mL
	50 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	25 mg/mL	100 mg/mL
CA – Capsicum	100 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL
	200 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
H - Hamamelis	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	6,25 mg/mL
	6,25 mg/mL	6,25 mg/mL	6,25 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL

Legenda: CA: *Capsicum annum*; CL: *Calendula officinalis*; H: *Hamamelis virginiana*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Concentração dos extratos utilizadas para tratamento em biofilmes monotípicos de cepas-padrão e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) no tempo de 5 minutos

Extratos	K1	K2	K3	K4	ATCC
CL – Calendula	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL
	25 mg/mL	25 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL
CA – Capsicum	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
	200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL
H - Hamamelis	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL
	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL

Legenda: CA: *Capsicum annum*; CL: *Calendula officinalis*; H: *Hamamelis virginiana*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As porcentagens da média de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de cepas ATCC de *P. aeruginosa* e cepas clínicas, após 5 minutos de tratamento podem ser observadas na tabela abaixo (Tabela 5). A redução de viabilidade foi comparada com o controle de clorexidina 0,12% no qual apresentou uma redução de 63% de crescimento microbiano para as cepas-padrão; 49% para cepa clínica P1, 40% para cepa clínica P2, 38% para cepa clínica P3 e 64% para cepa clínica P4.

Tabela 5 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento de 5 minutos

(continua)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
ATCC 15442	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	0,25%
		50 mg/mL	8,60%
	<i>Calendula officinalis</i>	100 mg/mL	5%
		50 mg/mL	2%
	<i>Hamamelis virginiana</i>	12,5 mg/mL	-
		6,25 mg/mL	4,62%
P1	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	77,36%
		50 mg/mL	79,44%
	<i>Calendula officinalis</i>	50 mg/ML	72%
		25 mg/mL	69%
	<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL	83%
		3,12 mg/mL	83,12%

Tabela 5 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento de 5 minutos

(conclusão)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
P2	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	76,13%
		50 mg/mL	74%
	<i>Calendula officinalis</i>	50 mg/mL	23,10%
		25 mg/mL	2%
	<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL	-
		3,12 mg/mL	-
P3	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	67%
		50 mg/mL	69,28%
		25 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	-
		<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL
			3,12 mg/mL
P4	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	55%
		50 mg/mL	57,19%
		25 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	-
		<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL

Legenda: - : não apresentou redução de viabilidade quando comparado com a clorexidina 0,12%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando os resultados de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de *P. aeruginosa* para cepa ATCC 15442, é possível observar que os extratos glicólicos promoveram a redução de 0,25% entre 8,60% (média 3,36%), sendo que o extrato que apresentou uma redução mais satisfatória foi o de *C. annuum* L (50 mg/mL) (Tabela 5).

A cepa clínica P1 apresentou redução de 69% entre 83,12% (média 77,32%), sendo que o extrato que promoveu uma redução mais satisfatória foi o de *H. virginiana* L (3,12 mg/mL). Os extratos promoveram uma redução média de 37,05% para cepa P2, sendo que o extrato de *C. annuum* L (100 mg/mL) teve o melhor desempenho.

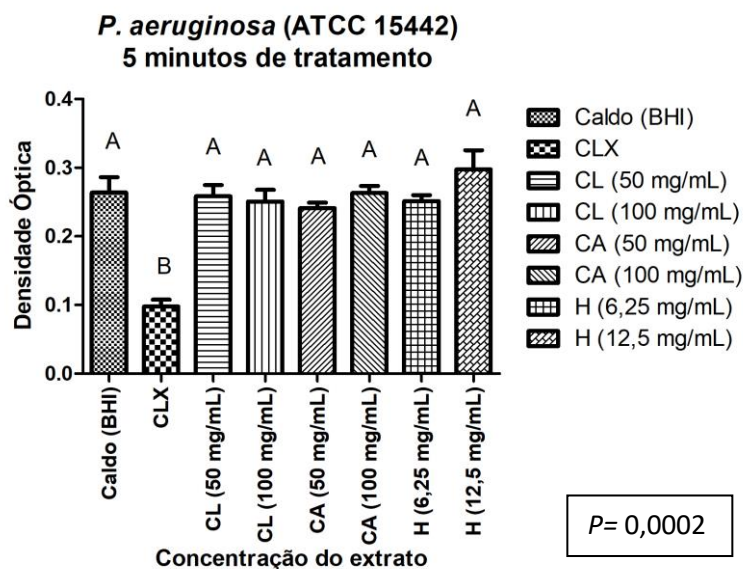
Para cepa P3 os extratos glicólicos apresentaram redução de 67% entre 69,28% (média 68,14%), sendo o de *C. annuum* L (50 mg/mL) o extrato com melhor desempenho. O extrato glicólico de *C. annuum* L (50 mg/mL), no tempo de 5 minutos de tratamento, apresentou redução apresentou média de 56,09%, com redução de 55% entre 57,19%, para a cepa P4.

Como demonstrado na Figura 1, apenas a clorexidina a 0,12% apresentou resultados estatisticamente significantes ($p \leq 0,05\%$), quando comparado com os extratos glicólicos no combate a cepa padrão (ATCC 15442) de *P. aeruginosa* no tempo de 5 minutos.

Na análise estatística realizada pelo GraphPad Prisma, observou-se que na cepa P1 o extrato de *C. annuum* L nas concentrações de 100 mg/mL e 200 mg/mL apresentaram similaridade com o controle positivo de clorexidina 0,12% ($p > 0,05\%$) (Figura 2). As demais concentrações de *C. officinalis* e *H. virigiana* L. apresentaram diferença estatística quando comparada com o controle ($p \leq 0,05\%$).

Os resultados de *C. annuum* L. demonstraram-se ser promissores já no tempo de 5 minutos contra cepas clínicas, ficando muito próximos do perfil antimicrobiano da clorexidina 0,12%, um excelente antisséptico químico, com ação antifúngica e bactericida.

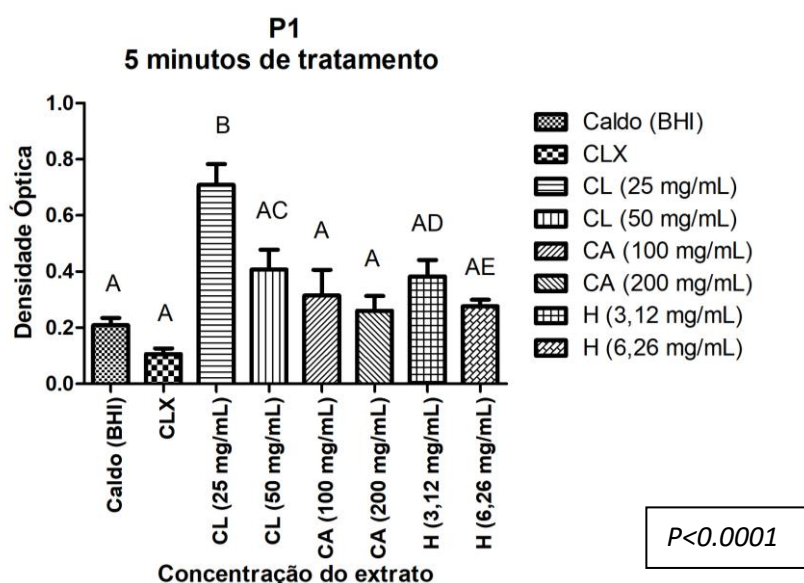
Figura 1- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de *P. aeruginosa* (ATCC 15442)



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

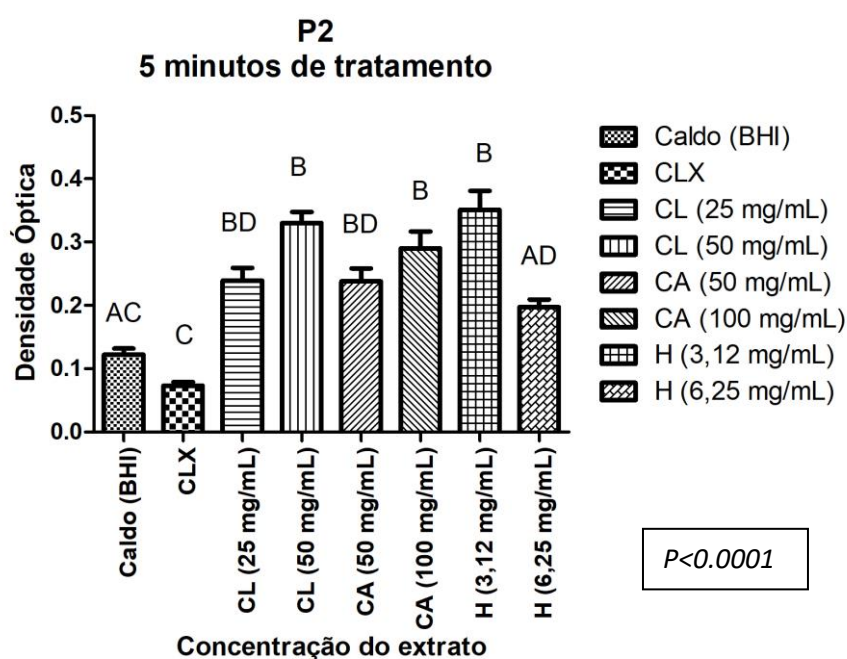
Figura 2- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica P1



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme demonstrado na Figura 3, todas as concentrações dos extratos, sendo *C. officinalis* (25 e 50 mg/dL), *C. annuum* L. (50 e 100 mg/dL) e *H. virginiana* L. (3,12 e 6,25 mg/dL), apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle negativo, na exposição das cepas P2 ($p \leq 0,05\%$). Apenas o controle positivo, foi capaz de apresentar potencial antimicrobiano (média 0,07 da D.O).

Figura 3- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica P2

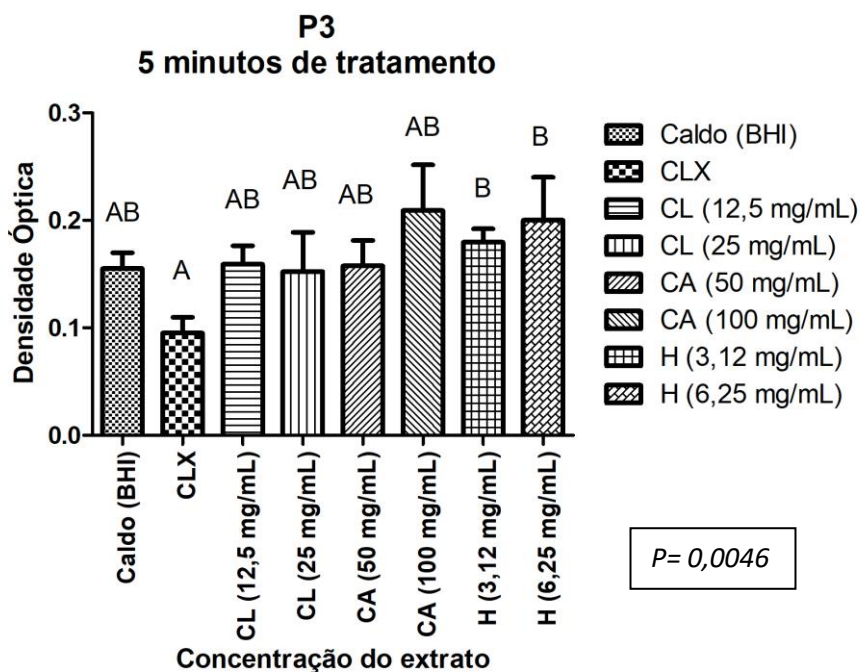


Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A cepa clínica P3, quando exposta ao tratamento dos extratos no tempo de 5 minutos, com exceção para as concentrações de *H. virginiana* L., apresentou similaridade com o controle positivo de clorexidina 0,12% ($p > 0,05\%$) (Figura 4).

Figura 4- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica P3



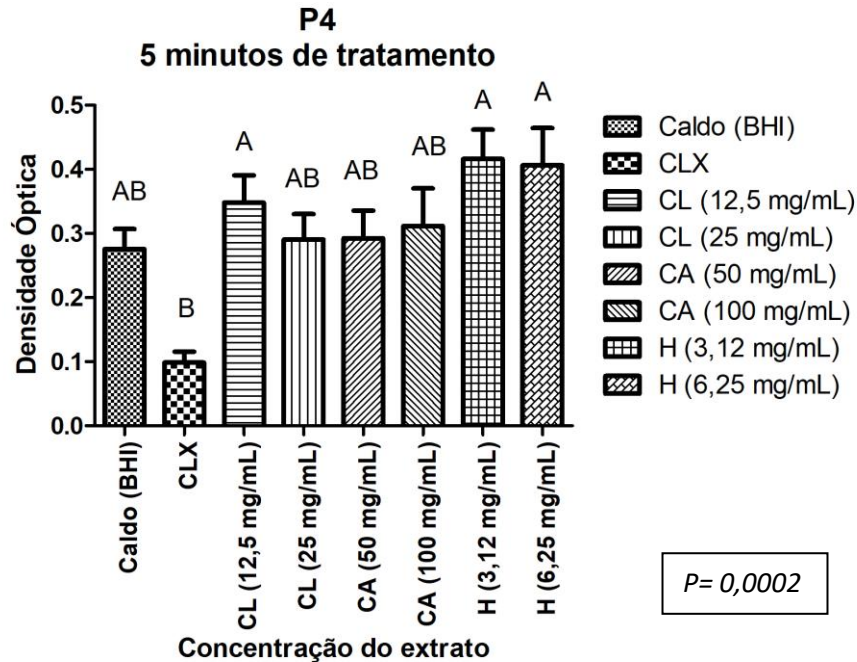
Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cepa clínica P4 os resultados obtidos com o tratamento de 5 minutos, pode-se verificar que nas concentrações de 25 mg/dL de *C. officinalis* e 50 e 100 mg/dL de *C. annuum* L. não foi apresentada diferença estatística significativa comparada ao controle positivo ($p > 0,05\%$). Resultados promissores em um curto espaço de tempo.

A concentração de 12,5 mg/mL de *C. officinalis* não foi o suficiente para promover potencial antimicrobiano na cepa de *P. aeruginosa* ($p \leq 0,05\%$), bem como nas concentrações de 3,12 e 6,25 mg/dL de *H. virginiana* L. (Figura 5).

Figura 5- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica P4



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Também foram avaliadas as porcentagens da média de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de cepas ATCC de *K. pneumoniae*, após 5 minutos de tratamento, conforme a tabela abaixo (Tabela 6).

A redução de viabilidade também foi comparada com o controle de clorexidina 0,12% no qual apresentou uma redução de 69% de crescimento microbiano para cepas ATCC; 81,38% para cepa clínica K1, 76,39% para cepa clínica K2, 46,85% para cepa clínica K3 e 69,03% para cepa clínica K4.

Comparando os resultados de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de *K. pneumoniae* para cepa ATCC 4352, é possível observar que os extratos glicólicos apresentaram redução de 18%, sendo que o único extrato que apresentou redução foi o de *C. annuum* L (200 mg/mL) (Tabela 6).

Nenhum dos outros extratos apresentaram redução de viabilidade quando comparado com a clorexidina 0,12%.

Tabela 6 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* após tratamento de 5 minutos

(continua)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
ATCC 4352	<i>Capsicum annuum</i>	200 mg/mL	18%
		100 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	25 mg/mL	-
		12 mg/mL	-
	<i>Hamamelis virginiana</i>	3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-
K1	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	38,87%
		200 mg/mL	51,98%
	<i>Calendula officinalis</i>	25 mg/mL	-
		12,5 mg/mL	-
	<i>Hamamelis virginiana</i>	3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-
K2	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	13,78%
		200 mg/mL	34,37%
	<i>Calendula officinalis</i>	25 mg/mL	-
		12,5 mg/mL	-
	<i>Hamamelis virginiana</i>	3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-

Tabela 6 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* após tratamento de 5 minutos

(conclusão)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
K3	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	-
		200 mg/mL	22,88%
	<i>Calendula officinalis</i>	25 mg/mL	-
		12,5 mg/mL	-
	<i>Hamamelis virginiana</i>	3,12 mg/mL	3,48
		1,56 mg/mL	-
K4	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	-
		200 mg/mL	19,52%
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	-
		6,25 mg/mL	-
	<i>Hamamelis virginiana</i>	3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-

Legenda: - : não apresentou redução de viabilidade quando comparado com a clorexidina 0,12%.
Fonte: Elaborado pelo autor.

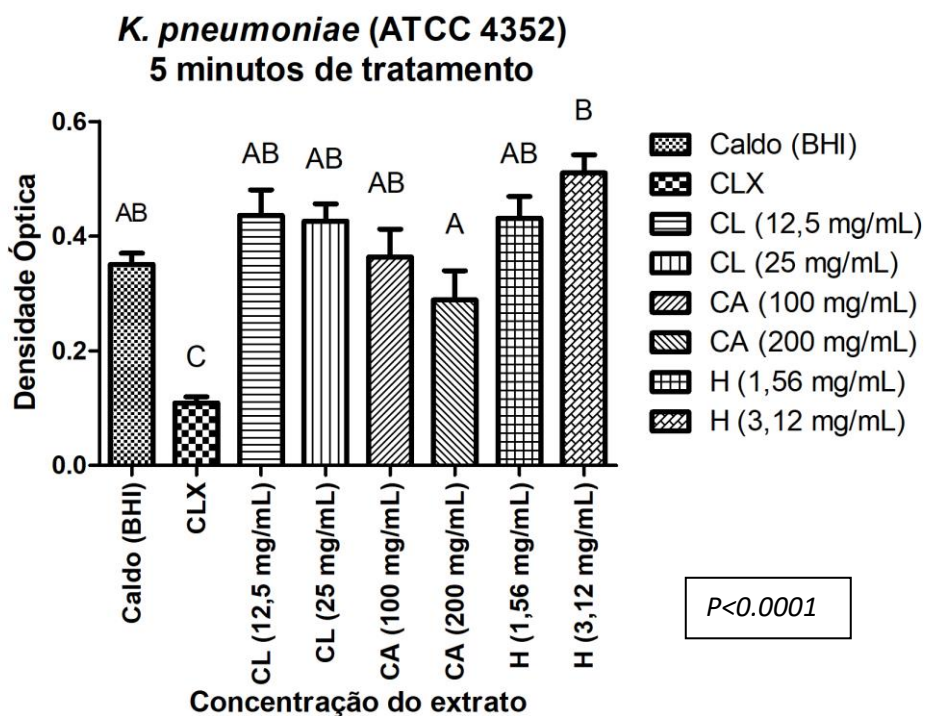
A cepa clínica K1 apresentou redução de 38,87% entre 51,98% (média 45,42%), sendo que o extrato que apresentou redução mais satisfatória foi o de *C. annuum* L (200 mg/mL). O extrato de *C. annuum* L (200 mg/mL) apresentou redução média de 24,07%, com redução de 13,78% entre 34,37% para cepa K2

Dentre os extratos glicólicos, o extrato de *C. annuum* L (200 mg/mL) apresentou redução de 3,48% entre 22,88% (média 13,18%) para cepa K3, sendo o extrato com melhor desempenho, dentre os demais testados. Por fim em 5 minutos de tratamento a cepa K4 apresentou redução de 19,52% apenas para o extrato de *C. annuum* L. (200 mg/mL).

Nenhum dos outros extratos apresentaram redução de viabilidade quando comparado com a clorexidina 0,12%.

Como demonstrado na Figura 6, quando foi avaliado os extratos glicólicos frente cepas de *K. pneumoniae* ATCC (4352) pode-se alcançar diferença estatística ($p \leq 0,05\%$), entre o extrato de *C. annuum* L (200 mg/mL) x *H. virginiana* L. (3,12 mg/mL). As demais concentrações não apresentaram diferença quando comparado ao controle positivo ($p > 0,05\%$).

Figura 6 - Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de *K. pneumoniae* (ATCC 4352)

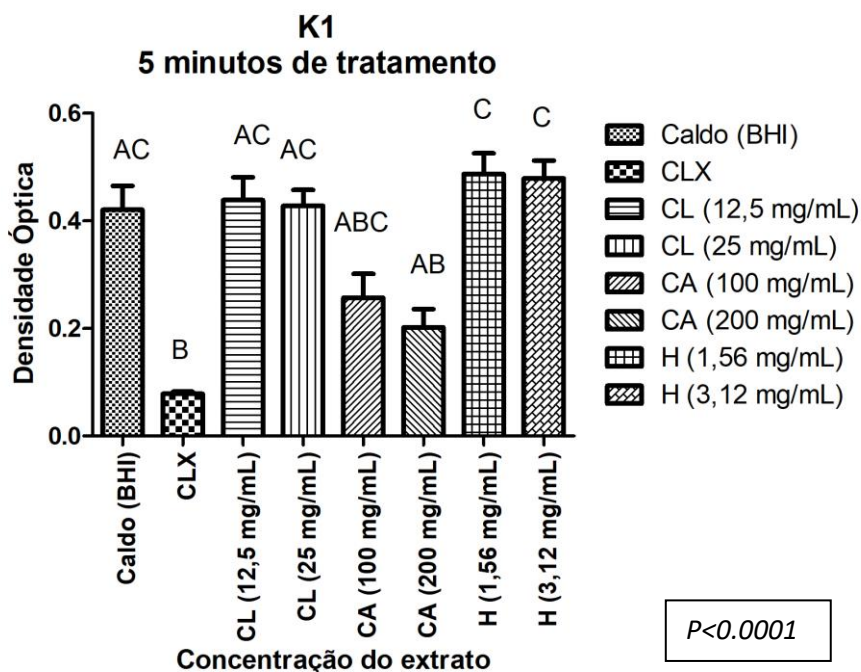


Legenda: Todos os testes apresentaram distribuição de normalidade e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que para cepa K1, tivemos uma similaridade com o controle positivo de clorexidina 0,12% para os tratamentos de *C. annuum* L. nas concentrações de 100 e 200 mg/dL ($p > 0,05\%$) (Figura 7).

Figura 7- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica K1



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

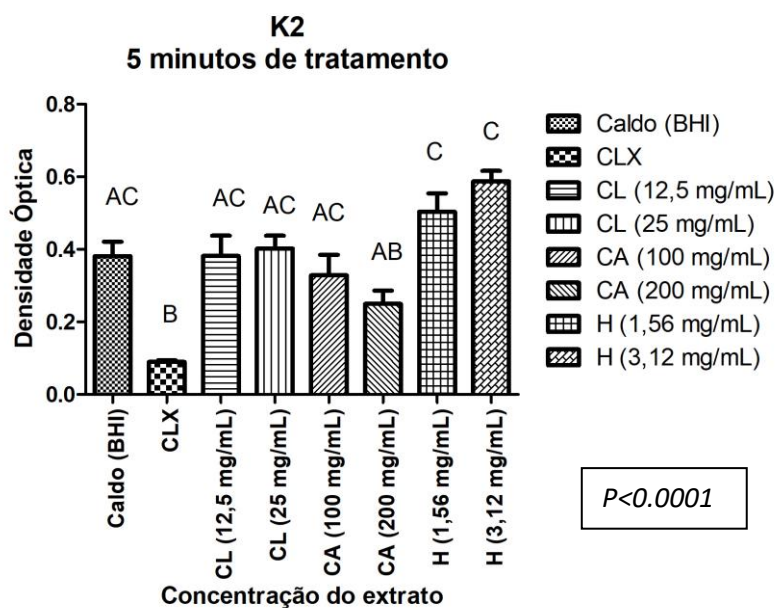
Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme a Figura 8, a cepa clínica K2 quando foi exposta aos tratamentos de 5 minutos com os extratos glicólicos, teve para basicamente todos os extratos, com exceção de *C. annuum* L. (200 mg/dL) diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao controle positivo ($p \leq 0,05\%$).

O extrato glicólico de pimenta, apresentou novamente resultados promissores no tempo analisado com média de 0,24 D.O ($p > 0,05\%$)

As cepas clínicas K3 e K4, obtiveram resultados iguais ao anterior, com redução de viabilidade semelhante a clorexidina 0,12% para o extrato de *C. annuum* L. na concentração de 200 mg/mL ($p > 0,05\%$) (Figura 9 e 10).

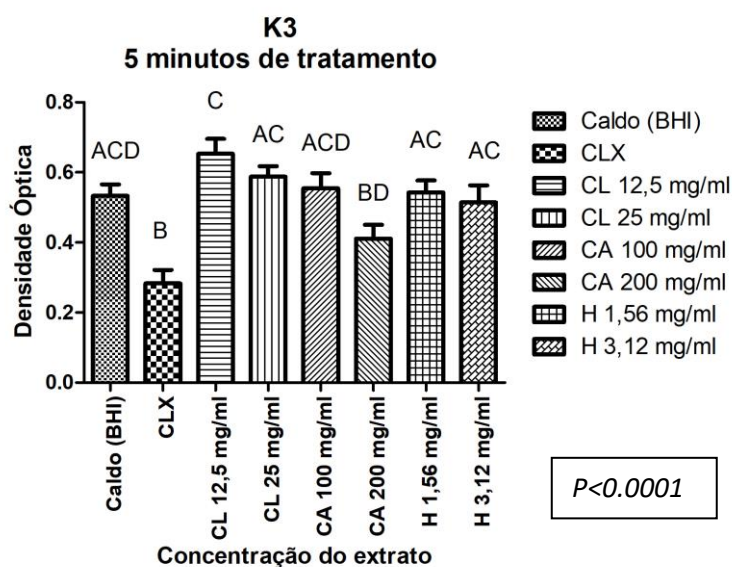
Figura 8- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica K2



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

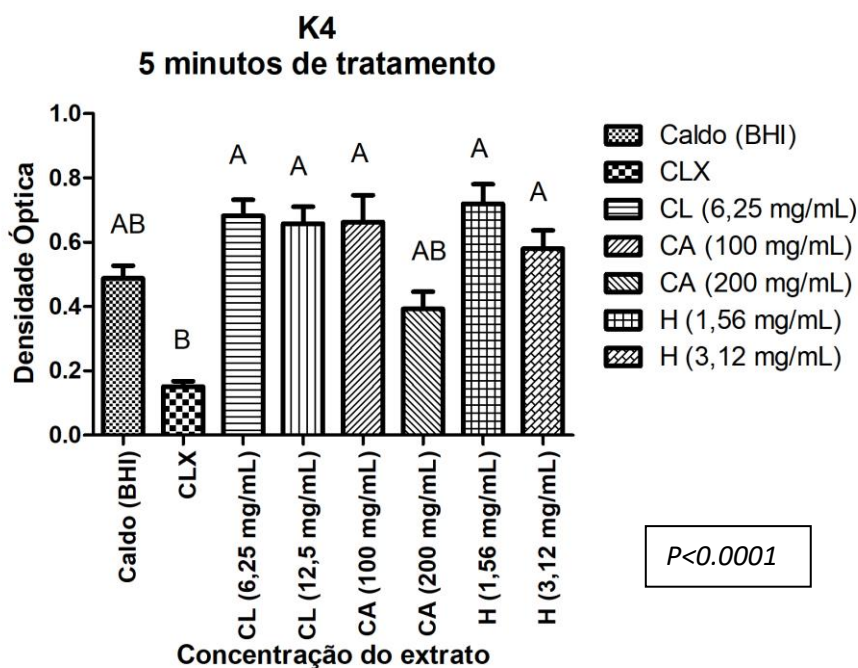
Figura 9- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica K3



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 5 min aplicados em biofilmes de cepa clínica K4



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos e tratamento no tempo de 24 horas

Abaixo, seguem os valores utilizados para tratamento do biofilme, no tempo de 24 horas para as cepas-padrão e clínicas de ambas as espécies, para *Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 – Concentração dos extratos utilizadas para tratamento em biofilmes monotípicos de cepas-padrão e clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) no tempo de 24 horas

Extratos	P1	P2	P3	P4	ATCC
CL – Calendula	25 mg/dL	25 mg/dL	12,5 mg/dL	12,5 mg/dL	50 mg/dL
	50 mg/Dl	50 mg/dL	25 mg/dL	25 mg/dL	100 mg/dL
CA – Capsicum	50 mg/dL	50 mg/dL	50 mg/dL	50 mg/dL	50 mg/dL
	100 mg/dL	100 mg/dL	100 mg/dL	100 mg/dL	100 mg/dL
H - Hamamelis	3,12 mg/dL	3,12 mg/dL	3,12 mg/dL	3,12 mg/dL	6,25 mg/dL
	6,25 mg/dL	6,25 mg/dL	6,25 mg/dL	6,25 mg/dL	12,5 mg/dL

Legenda: CA: *Capsicum annum*; CL: *Calendula officinalis*; H: *Hamamelis virginiana*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Concentração dos extratos utilizadas para tratamento em biofilmes monotípicos de cepas-padrão e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) no tempo de 24 horas

Extratos	K1	K2	K3	K4	ATCC
CL – Calendula	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL
	25 mg/mL	25 mg/mL	25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL
CA – Capsicum	50 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL
	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL	100 mg/mL
H - Hamamelis	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL	1,56 mg/mL
	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL	3,12 mg/mL

Legenda: CA: *Capsicum annum*; CL: *Calendula officinalis*; H: *Hamamelis virginiana*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

As porcentagens da média de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de cepas ATCC de *P. aeruginosa* e clínicas, após 24 horas de tratamento podem ser observadas na tabela abaixo (Tabela 9). A redução de viabilidade foi comparada com o controle de clorexidina 0,12% no qual apresentou uma redução de 100% de crescimento microbiano para as cepas-padrão; 80% para cepa clínica P1, 78% para cepa clínica P2, 73,44% para cepa clínica P3 e 62,12% para cepa clínica P4 .

Tabela 9 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC e clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento de 24 horas

(continua)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
ATCC 15442	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	99,99%
		50 mg/mL	99,96%
	<i>Calendula officinalis</i>	100 mg/mL	99,99%
		50 mg/mL	99,99%
	<i>Hamamelis virginiana</i>	12,5 mg/mL	99,92%
		6,25 mg/mL	99,89%
P1	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	77,36%
		50 mg/mL	80%
	<i>Calendula officinalis</i>	50 mg/mL	71%
		25 mg/mL	68%
	<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL	-
		3,12 mg/mL	-

Tabela 9 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC e clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento de 24 horas

(conclusão)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
P2	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	76,13%
		50 mg/mL	74%
	<i>Calendula officinalis</i>	50 mg/mL	23,10%
		25 mg/mL	1,46%
	<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL	-
		3,12 mg/mL	-
P3	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	67%
		50 mg/mL	69,28%
		25 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	-
		<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL
			3,12 mg/mL
P4	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	55,05%
		50 mg/mL	57,19%
	<i>Calendula officinalis</i>	25 mg/mL	-
		12,5 mg/mL	-
	<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL	-
		3,12 mg/mL	-

Legenda: - : não apresentou redução de viabilidade quando comparado com a clorexidina 0,12%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando os resultados de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de *P. aeruginosa* para cepa ATCC 15442, é possível observar que os extratos glicólicos apresentaram redução de 99,89% entre 99,99% (média 99,95%), sendo que os extratos que apresentaram uma redução mais satisfatória foram os de *C. annuum* L (100 mg/mL) e os de *C. officinalis* (Tabela 9).

O extrato de *C. annuum* L (50 mg/mL) promoveu redução de 68% entre 80% (média 74,09%) para cepa clínica P1. O extrato de *C. annuum* L (100 mg/mL) obteve melhor desempenho, apresentaram média de 43,67%, com redução de 1,46% entre 76,13% para cepa clínica P2.

A cepa P3, quando exposta ao tratamento do extrato glicólico de *C. annuum* L (50 mg/mL) apresentou redução de 67% entre 69,28% (média 68,14%). Por fim em 24 horas de tratamento a cepa P4 apresentou média de 56,12%, com redução de 55,05% entre 57,19%. Na referida cepa, o extrato glicólico de *C. annuum* L (50 mg/mL) obteve o melhor desempenho.

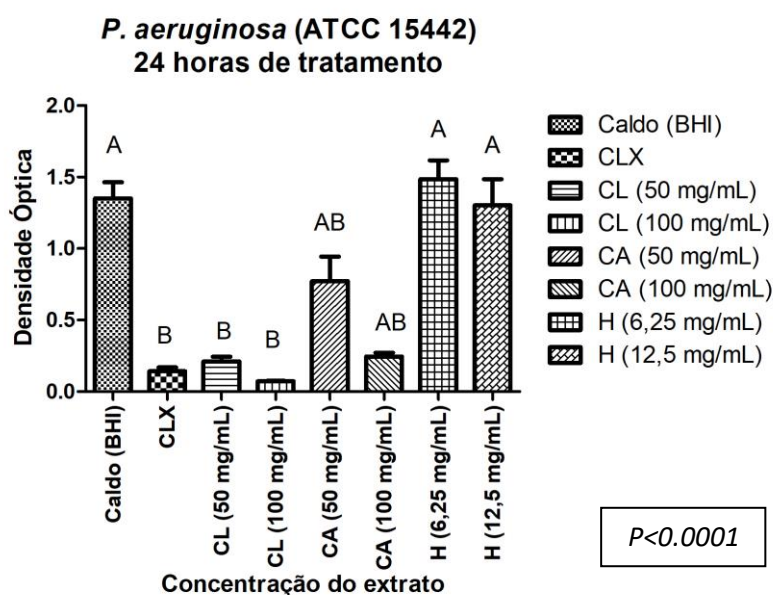
Na Figura 11, o extrato glicólico de *C. annuum* L. e *C. officinalis*, ambos nas concentrações de 50 e 100 mg/mL, apresentaram redução significativa quando comparado ao grupo controle de clorexidina 0,12% ($p > 0,05\%$) para a cepa padrão de ATCC 15442 de *P. aeruginosa*.

O extrato de *H. virginiana* L. (6,25 e 12,5 mg/mL) apresentou diferença estatística significativa em comparação com o controle positivo ($p \leq 0,05\%$).

A cepa clínica P1, apresentou uma sensibilidade frente aos extratos (*C. annuum* 50 e 100 mg/mL e *C. officinalis* 25 e 50 mg/mL) no tempo de 24 horas.

Todos os extratos, com exceção do glicólico de *H. virginiana*, foram capazes de reduzir o biofilme em quantidades muito próximas ao controle positivo ($p > 0,05\%$), conforme a Figura 12.

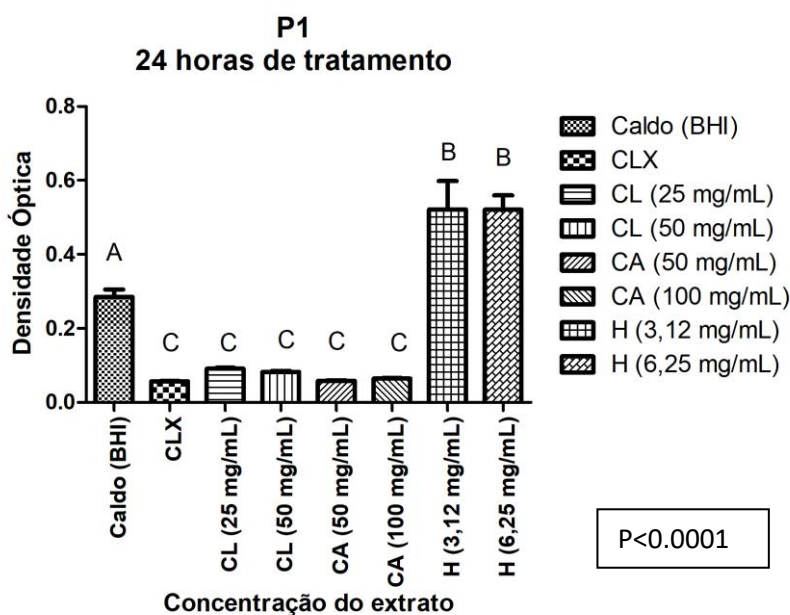
Figura 11- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de *P. aeruginosa* (ATCC 15442)



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica P1

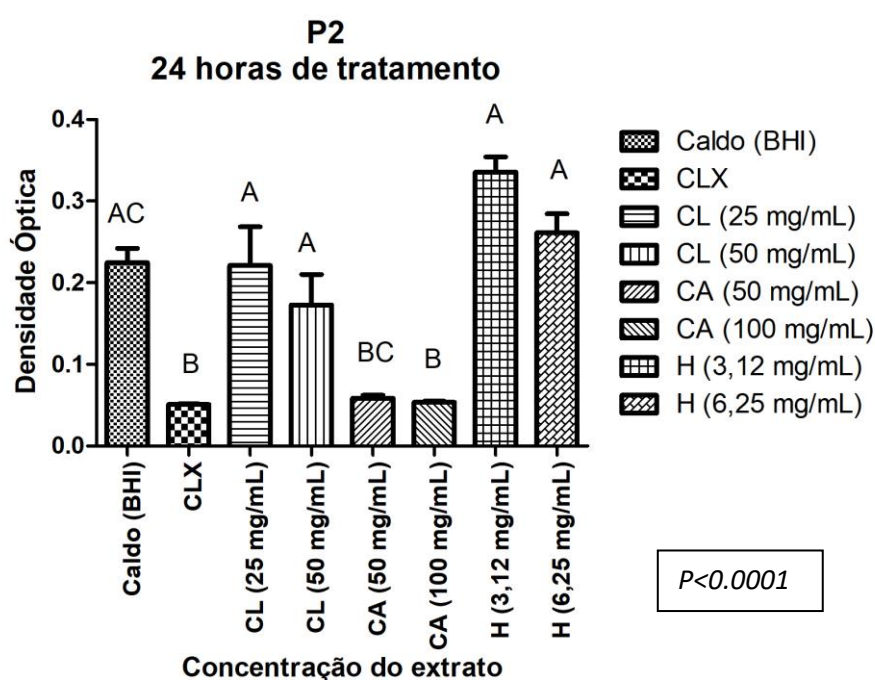


Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A cepa clínica P2, teve apenas redução de viabilidade quando expostas na concentração de *C. annuum* L. de 50 e 100 mg/mL, conforme a Figura 13 ($p > 0,05\%$). Os demais extratos diferiram estatisticamente frente ao controle de clorexidina 0,12% ($p \leq 0,05\%$).

Figura 13- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica P2



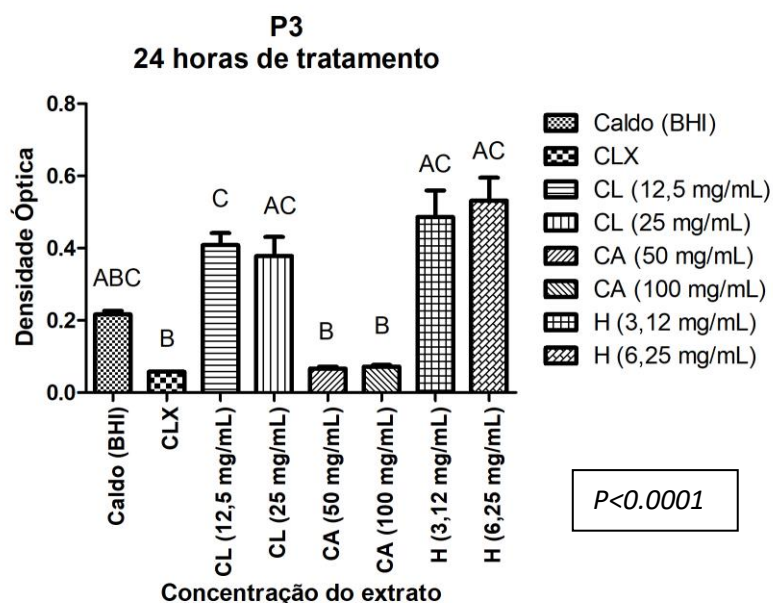
Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 14 e 15, as cepas clínicas P3 e P4 apresentaram o mesmo perfil com similaridade ao controle positivo, somente para o extrato glicólico de *C. annuum* L. nas concentrações de 50 e 100 mg/mL.

Os demais extratos também diferiram estatisticamente frente ao controle de clorexidina 0,12% ($p \leq 0,05\%$) (Figura 14 e 15).

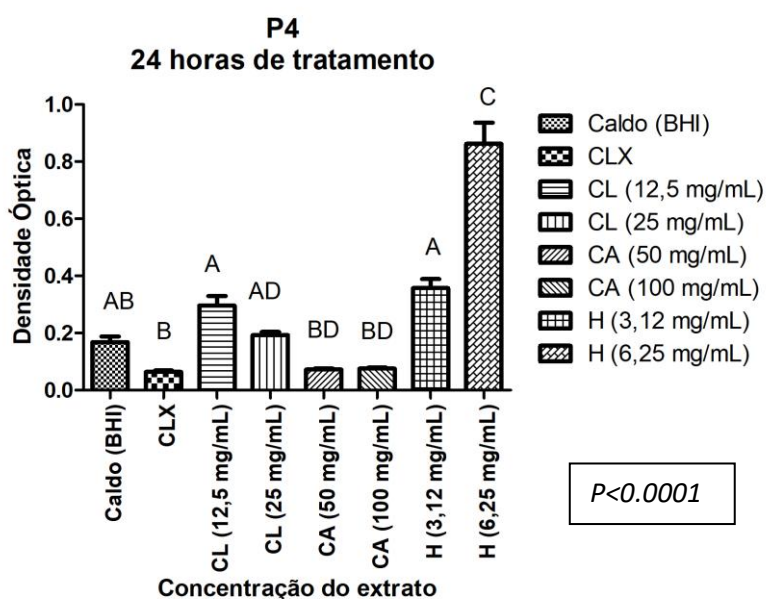
Figura 14- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica P3



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica P4



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Também foram avaliadas as porcentagens da média de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de cepas ATCC de *K. pneumoniae*, após 24 horas de tratamento, conforme a tabela abaixo (Tabela 10). A redução de viabilidade foi comparada com o controle de clorexidina 0,12% no qual apresentou uma redução de 76% de crescimento microbiano para as cepas-padrão; 72,52% para cepa clínica K1, 72,09% para cepa clínica K2, 64% para cepa clínica K3 e 63,96% para cepa clínica K4.

Comparando os resultados de redução de viabilidade em biofilmes monotípicos de *K. pneumoniae* para cepa ATCC 4352, é possível observar que os extratos glicólicos apresentaram redução de 8,86% entre 75,74% (média 53,34%), o extrato glicólico que melhor desempenhou redução foi o de *C. annuum* L. (100 mg/mL) (Tabela 10).

Tabela 10 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* após tratamento de 24 horas

(continua)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade	
ATCC 4352	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	75,74%	
		50 mg/mL	75,42%	
		25 mg/mL	8,86%	
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	-	
		<i>Hamamelis virginiana</i>	6,25 mg/mL	-
	3,12 mg/mL		-	
	K1	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	71%
			50 mg/mL	72%
25 mg/mL			30%	
<i>Calendula officinalis</i>		12,5 mg/mL	20%	
		<i>Hamamelis virginiana</i>	3,12 mg/mL	-
1,56 mg/mL			-	

Tabela 10 – Redução de viabilidade (%) em biofilmes de cepas ATCC e clínicas de *Klebsiella pneumoniae* após tratamento de 24 horas

(conclusão)

Cepa	Extrato	Concentração	Redução de viabilidade
K2	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	81,28%
		50 mg/mL	81,21%
		25 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	5%
		3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-
K3	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	49,40%
		50 mg/mL	55,55%
		25 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	12,5 mg/mL	-
		3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-
K4	<i>Capsicum annuum</i>	100 mg/mL	75,38%
		50 mg/mL	64,20%
		12,5 mg/mL	-
	<i>Calendula officinalis</i>	6,25 mg/mL	-
		3,12 mg/mL	-
		1,56 mg/mL	-

Legenda: - : não apresentou redução de viabilidade quando comparado com a clorexidina 0,12%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

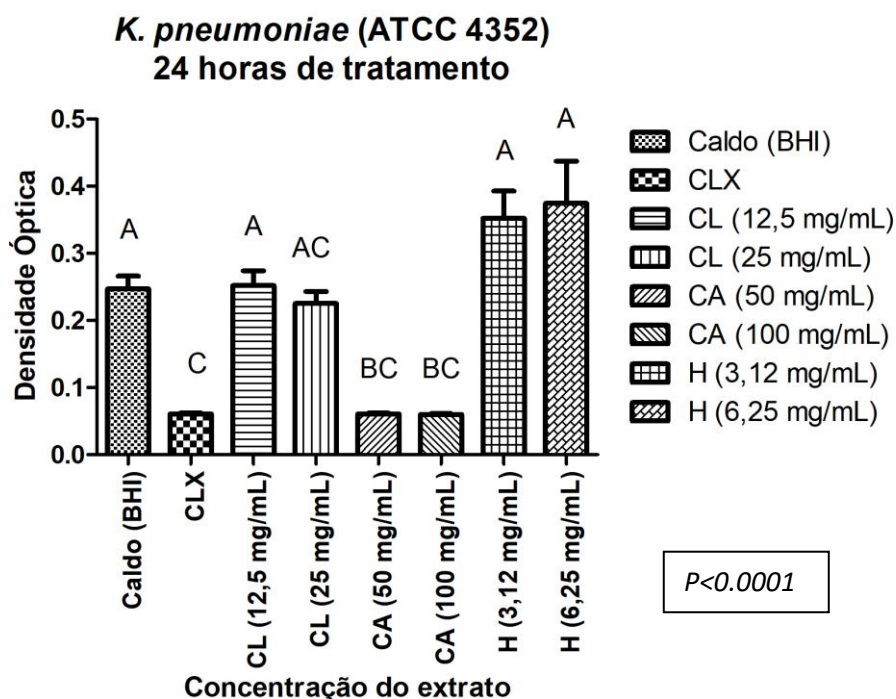
Para cepa clínica K1, o extrato de *C. annuum* L (50 mg/mL) apresentou redução de 20% entre 72% (média 48,25). A cepa K2 apresentou média de 55,83%, com redução de 5% entre 81,28%, quando submetido ao tratamento com *C. annuum*

L (100 mg/mL).

A cepa K3, no tratamento de *C. annuum* L (100 mg/mL) apresentou redução de 49,40% entre 55,55% (média 52,47%), sendo o extrato com melhor desempenho, dentre todos testados. Por fim em 24 horas de tratamento a cepa K4 sob o extrato glicólico de *C. annuum* L (100 mg/mL) apresentou média de 69,79%, com redução de 64,20% entre 75,38%.

No tempo de tratamento de 24 horas, a cepa padrão de *K. pneumoniae* (ATCC 4352) e as clínicas K1, K2 e K3 responderam bem ao tratamento com o extrato glicólico de *C. annuum* L. nas concentrações de 50 e 100 mg/mL ($p > 0,05\%$) (Figura 16, 17, 18 e 19). Os demais extratos apresentaram diferença estatística quando comparado com o controle de clorexidina 0,12% ($p \leq 0,05\%$).

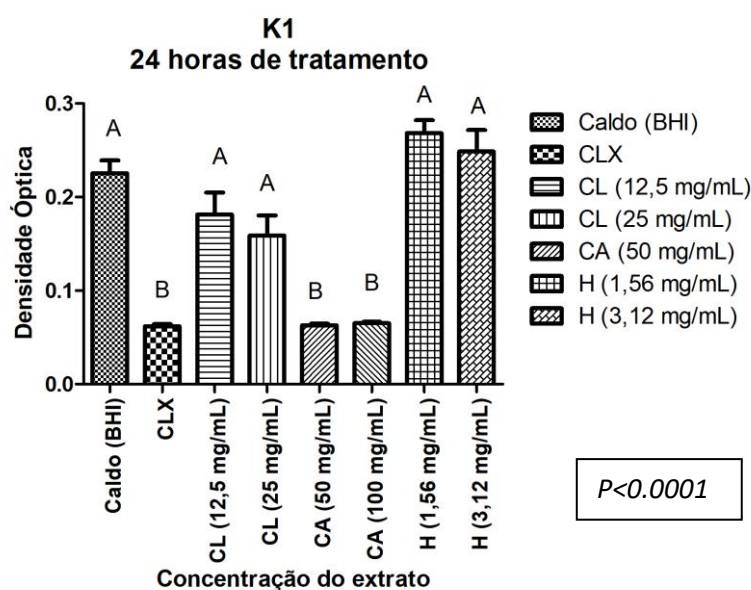
Figura 16- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de *K. pneumoniae* (ATCC 4352)



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

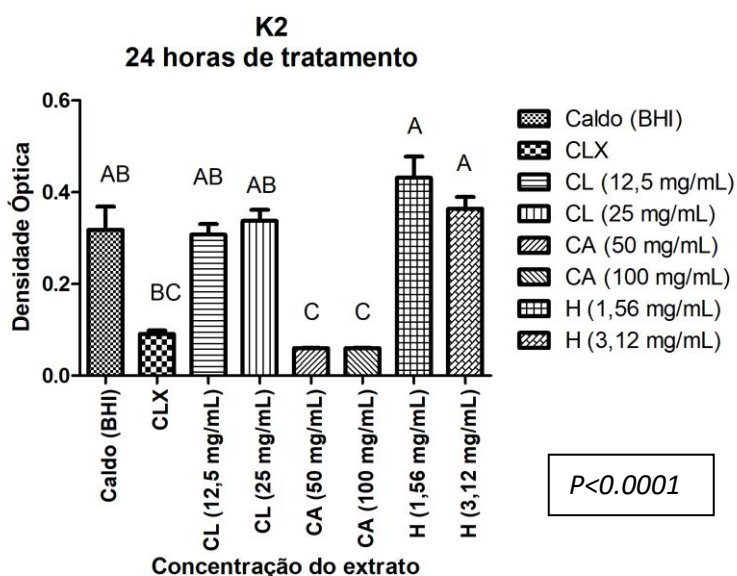
Figura 17- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica K1



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

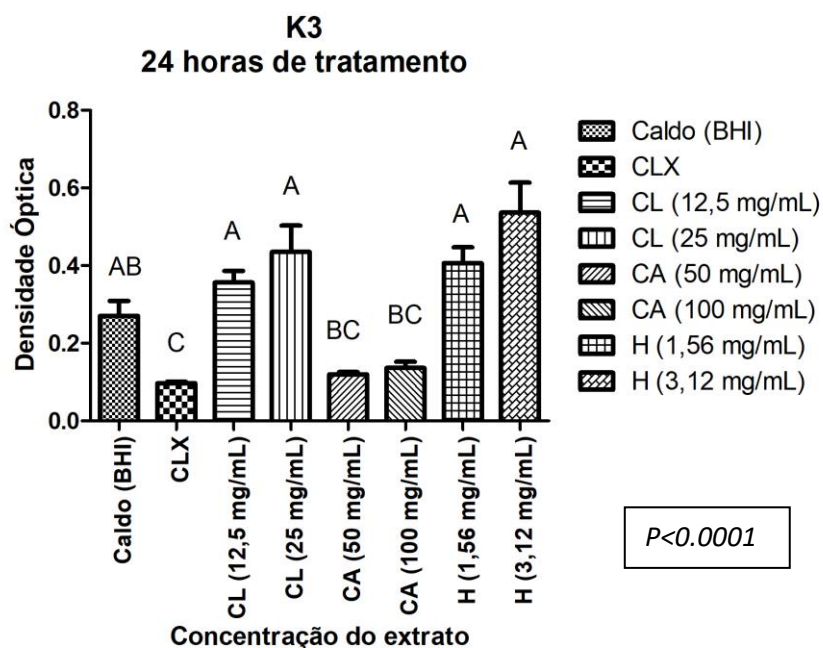
Figura 18- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica K2



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica K3

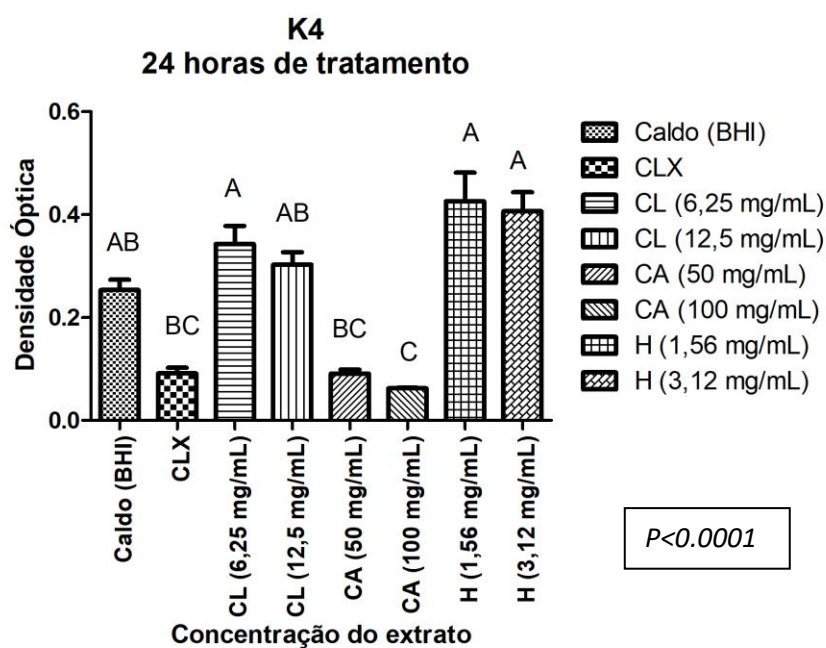


Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao analisar a última cepa clínica K4, as concentrações de *C. annuum* (50 e 100 mg/mL) e *C. officinalis* (12,5 mg/mL) apresentaram redução de viabilidade semelhante ao controle positivo ($p > 0,05\%$) (Figura 20).

Figura 20- Gráfico demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após tratamento de 24 horas aplicados em biofilmes de cepa clínica K4



Legenda: Os testes foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura consultada, não foram encontrados estudos sobre a ação dos três extratos glicólicos em amostras clínicas multirresistentes, sendo assim, foi possível comparar os resultados aqui apresentados com trabalhos que utilizaram de forma individual os extratos, bem como metodologias diferentes da nossa em sua maioria.

A resistência antimicrobiana é fator de preocupação ao redor do mundo inteiro, promovendo a necessidade de estudos que possam buscar novas moléculas que possuam o potencial microbicida ou microbiostático para serem utilizados no combate da era da multirresistência.

O presente estudo selecionou compostos já utilizados na sabedoria empírica e que na literatura científica, há poucos anos tiveram comprovação dos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, analgésicos e até mesmo potencial antitumoral (Stahl, Sies, 2005; Kaisoon et al., 2011; Butnariu, Coradini, 2012). Os resultados obtidos com a *C. annuum* L. e a *C. officinalis* demonstraram já em 5 minutos de tratamento, resultados promissores na redução do biofilme.

H. virginiana L. apesar de bem estabelecida na literatura pelo seu potencial antimicrobiano, não teve um desempenho tão satisfatório quando utilizado frente as cepas clínicas. Gloor et al. (2002) determinaram a atividade antimicrobiana de um destilado de *Hamamelis* (*Aqua Hamamelidis*), uma espécie de água floral de *Hamammelis* que possui ampla aplicação na área cosmética. No estudo os autores utilizaram uma mescla de *Hammamelis* (90%) com ureia (5%) e verificaram sua ação *in vitro* sob diversas cepas-padrão de bactérias Gram-positivas e negativas. Esses autores utilizaram a técnica de disco difusão em ágar para determinar a concentração efetiva da mescla. No teste frente a *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, apenas a *K. pneumoniae* teve inibição de seu crescimento, entretanto, os autores não mencionaram qual foi o valor da redução.

No atual estudo quando foi comparado a ação do extrato glicólico de *Hammamelis* pela técnica de microdiluição em caldo contra cepas-padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *K. pneumoniae* (ATCC 4352), foi obtido CIM na concentração de 3,12 mg/mL para ambas as espécies.

Quando avaliamos a ação antibiofilme, dentre as 10 cepas utilizadas (8 clínicas e 2 ATCC), no tempo de 5 minutos, apenas contra cepa P1, o extrato glicólico de *Hamamelis* (3,12 mg/mL) resultou em 83,12% de redução da viabilidade. No tratamento de 24 horas, nenhuma das concentrações do extrato apresentaram redução de viabilidade quando comparado com o controle de clorexidina 0,12%.

Em uma busca rápida pela base de dados do *Pubmed*, utilizando as palavras-chave *hammamelis virginiana antimicrobial* apenas 20 estudos são apontados, confirmando nossos achados de que o extrato não apresenta um desempenho altamente satisfatório, quando se trata de inibição ou diminuição de crescimento microbiano.

Resultados satisfatórios são apontados na literatura com o uso de *C. officinalis*. Christoph et al. (2017) analisaram o efeito de três diferentes extratos de flores de calêndula (n-hexânico, etanólico, aquoso) na fase inflamatória da cicatrização de feridas em queratinócitos humanos imortalizados e fibroblastos dérmicos humanos. Dentre os objetivos do trabalho estudou-se também o efeito dos extratos na formação do tecido de granulação na cicatrização de feridas, utilizando colagenase bacteriana isolada de *Clostridium histolyticum* e determinação de colágeno solúvel no sobrenadante de fibroblastos dérmicos humanos.

Os autores observaram que os extratos n-hexânico e etanólico das flores de calêndula influenciaram a fase inflamatória, ativando o fator de transcrição NF- κ B e aumentando a quantidade da quimiocina IL-8. Decorrente aos resultados obtiveram como hipótese que o extrato etanólico inibiu a atividade da colagenase *in vitro* e aumentou a quantidade de colágeno no sobrenadante dos fibroblastos dérmicos humanos (Christoph et al., 2017).

Em nosso estudo o extrato de *C. officinalis*, no período de 24 horas de tratamento da atividade do biofilme, apresentou resultados satisfatórios de redução de viabilidade de cerca de 99% para as cepas-padrão de *P. aeruginosa*, nas concentrações de 50 e 100 mg/mL. Somente nas concentrações de 25 mg/mL que o extrato promoveu redução de viabilidade para cepa padrão de *K. pneumoniae*. Poucos estudos fazem o uso de cepas clínicas nos testes como o nosso, todavia, um estudo realizado por Efstratiou et al. (2012) avaliou o potencial antimicrobiano dos extratos de *C. officinalis* contra micro-organismos isolados de

pacientes no *Belfast City Hospital* (BCH), incluindo bactérias e fungos, usando ensaio de disco difusão.

Efstratiou et al. (2012) utilizaram o extrato metanólico e etanólico de *C. officinalis* proveniente das pétalas da calêndula e avaliaram sua ação sob cepas do gênero *Bacillus*, sorotipos de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *K. aerogenes* e a ação em fungos como *Candida albicans*. O extrato metanólico de *C. officinalis* exibiu melhor atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias testadas, do que o extrato de etanol segundo os autores. Quando foi avaliada a ação do extrato metanólico para *P. aeruginosa*, foi obtido um halo de inibição de 12 mm e de 16 mm para *K. pneumoniae*, logicamente que quando comparado com o controle positivo de ciprofloxacina os halos de inibição foram cerca de 40-45 mm (Efstratiou et al., 2012)

Apesar da metodologia empregada neste estudo ter sido diferente dos autores acima, bem como a extração do extrato de calêndula proveniente das folhas, tivemos uma redução de 71% (50 mg/mL) e 68% (25 mg/mL) para o tratamento de *C. officinalis*.

Faria et al. (2011) publicaram um estudo, onde foi comparado o efeito antimicrobiano de enxaguatórios bucais contendo *Calendula officinalis* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze e digluconato de clorexidina 0,12% na aderência de micro-organismos a materiais de sutura após extração de terceiros molares não irrompidos. Foram utilizados 18 pacientes com terceiros molares superiores não irrompidos indicados para extração, nos quais procederam após 15 dias com o uso de *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* ou enxaguatório bucal com clorexidina durante 1 semana (grupo experimental). A metodologia utilizada foi através de diluição das soluções contendo os fios de sutura em seguida, foi realizado a contagem de UFC/mL com semeadura em diferentes ágar. Os autores verificaram que os extratos reduziram o número de micro-organismos aderidos às suturas em comparação ao grupo controle. No entanto, diferenças significativas entre os grupos controle e experimental foram observadas apenas, para o enxaguatório contendo 0,12% de digluconato de clorexidina.

Sabemos que os micro-organismos se tornam cada vez mais resistentes quando se encontram na forma de biofilme (Donlan, Costerton, 2002). No nosso estudo um dos objetivos principais foi avaliar atividade antimicrobiana dos extratos

glicólicos de *C. annuum* L., *C. officinalis* e *H. virginiana* L. sobre biofilmes monotípicos, pois sabemos que se os mesmos fossem capazes de reduzir de alguma forma a formação do biofilme nas bactérias Gram-negativas, teríamos um potencial produto que poderia ser aplicado como enxaguatório bucal, decorrente a exposição de tratamento de 5 minutos ou de forma tópica pela exposição de 24 horas.

Khairnar et al. (2013) avaliaram a eficácia de *C. officinalis* na redução do biofilme dentário e inflamação gengival em duzentos e quarenta pacientes na faixa etária de 20-40 anos. Foram analisados pacientes com gengivite e com queixa de sangramento gengival. Todos os pacientes do grupo denominado como teste, foram orientados a diluir 2 ml de tintura de calêndula com 6 ml de água destilada e enxaguar a boca, uma vez pela manhã e outra à noite, durante seis meses. Os autores verificaram que o uso do colutório de *C. officinalis* resultou em uma redução significativamente maior da placa e da gengivite em comparação com o colutório placebo do grupo controle. Apesar do exposto, os autores informam que a limitação do estudo, está baseada no efeito do uso apenas de água destilada como placebo, não podendo ser descartado na redução da placa bacteriana e gengivite.

Os resultados obtidos na nossa pesquisa, não apontam o uso da *C. officinalis* para aplicação como enxaguatório bucal, visto que no tempo de tratamento de 5 minutos, quando analisamos as cepas clínicas, elas não responderam com redução da formação de biofilme ao ser comparado ao controle positivo de clorexidina 0,12%. Todavia, os resultados são promissores em 24 horas, o que poderia futuramente após estudos *in vivo*, verificar a possibilidade da sua incorporação em usos tópicos, sejam em pomadas ou biomateriais, tendo em vista que uma redução de 68-71% foi obtida para cepa clínica de *P. aeruginosa* e de 20-30% para cepa clínica de *K. pneumoniae*.

De todos os extratos aqui analisados, o extrato de *C. annuum* L. foi o que melhor desempenhou em todos os pontos avaliados. As pimentas do gênero *Capsicum* (em grego, *Kapso* significa picar ou arder) são originadas do continente americano e ganharam o mundo após serem levadas por navios exploradores europeus (Batiha et al., 2020).

Das cerca de 30 espécies existentes, somente cinco são domesticadas (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*) e elas

se apresentam em pimentas de vários tipos como dedo-de-moça, malagueta, tabasco, biquinho, bode, jalapeño e habanero. Seus componentes como a capsaicina que garante a picância dos frutos, além de ação anti-inflamatória e analgésica. Outros componentes da pimenta, são os flavonóides composto com ação anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e hepatoprotetora e por fim as saponinas com ação antifúngica apontam para diversas aplicações do extrato. (Iorizzi et al., 2002; Sun et al., 2007; Wahba et al., 2010; Bae et al., 2012).

Bakht et al. (2020) descreveram o potencial antimicrobiano de metanol, n-hexano, n-butanol, acetato de etila e amostras aquosas extraídas de folhas e frutos de *Capsicum annuum*. Segundo Bakht et al. (2020), diferentes amostras extraídas com solvente foram testadas contra seis micro-organismos patogênicos, por disco difusão, usando concentrações de 1, 2 e 3 mg de disco de *C. annuum*. As frações extraídas de n-butanol e acetato de etila das folhas e frutos mostraram inibição significativa do crescimento contra todos os micro-organismos testados nas concentrações de 1, 2 e 3 mg de disco-1. *E. coli* e *K. pneumoniae* foi completamente resistente aos extratos aquosos e fração extraída do n-hexano das folhas, na concentração de 1 mg de disco-1. Apenas o crescimento de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi efetivamente inibido por todas as frações de solvente extraídas dos frutos, enquanto a fração aquosa não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano do *Bacillus subtilis*, por exemplo.

Comparando nosso estudo com o de Bakht et al. (2020) o extrato de *C. annuum* apresentou CIM entre 25 e 50 mg/mL para cepas clínicas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Salientamos que os autores do estudo de Bakht et al. (2020), utilizaram uma metodologia distinta da nossa, mas não mencionam no trabalho a origem proveniente das cepas. Sendo nossos isolados advindos de âmbito de unidade de terapia intensiva (UTI) dos mais diversos sítios, como ponta de cateter, swab anal e orofaríngeo, hemocultura e urina.

Durante o tempo de tratamento de 5 minutos, já obtivemos uma média de redução entre as cepas clínicas de *P. aeruginosa* de aproximadamente 70% na ação do extrato glicólico de *C. annuum* L. nas concentrações de 50 e 100 mg/mL e de 30% para *K. pneumoniae*, nas concentrações de 100 e 200 mg/mL. Careaga et al. (2003) avaliaram o efeito inibitório de diferentes concentrações do extrato alcoólico de *C. annuum* contra *S. typhimurium* (ATCC 14028) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853),

inoculadas em carne bovina picada. Os autores utilizaram uma mistura do extrato com cloreto de sódio e obtiveram que a CIM do extrato para prevenir o crescimento de *S. typhimurium* foi de 1,5 mL/ 100 g de carne e a CIM para *P. aeruginosa* foi de 0,3 mL do extrato/ 100 g de carne, com efeito bacteriostático, enquanto a concentração de 3 mL/ 100 g de carne apresentou efeito bactericida. Os autores do referido estudo testaram as concentrações de 0,02; 0,06, 0,1, 0,3,0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 e 2,5 ml /100 g de carne bovina. Enquanto na nossa pesquisa, utilizamos da mesma metodologia, com concentrações de 50; 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 e 0,09 mg/mL do extrato. Vale ressaltar que os estudos tiveram enfoques distintos, e nossa CIM foi de 50 mg/mL para cepa padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 15442).

Meriem et al. (2017) realizaram um estudo relevante para comprovar qual o componente isolado da *C. annuum* realmente, possui potencial antimicrobiano. Os autores verificaram a atividade antimicrobiana de polifenóis e capsaicinoides da pimenta (cumarina, ácido cafeico, narangina, kaempferol, rutina, quercetina, capsaicina e dihidrocapsaicina) contra 16 cepas, utilizando os métodos de disco difusão e microdiluição em caldo. Segundo os autores, os compostos fenólicos possuíram atividade antimicrobiana, com zonas de inibição mais altas obtidas com ácido caféico (3,5-20,5 mm), quercetina (4,75-3,5 mm) e kaempferol (7-14 mm) (Meriem et al., 2017). Na determinação das CIM, os efeitos da quercetina e do kaempferol foram mais importantes do que o ácido caféico. As cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* foram mais sensíveis à quercetina (0,00195-0,0078 mg L⁻¹), enquanto o kaempferol foi mais ativo contra as cepas-padrão de *S. aureus* (ATCC 6538), *S. typhimurium* (ATCC 13311) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (0,0156-0,125 mg L⁻¹).

Os resultados do nosso estudo, estão de acordo com o realizado em 2013 por Shayan e Saeide, onde avaliaram as atividades antibacteriana e antibiofilme do extrato de *C. annuum* L. sobre o crescimento e formação de biofilme de cepas clínicas, isolados do trato urinário, sendo 2 cepas de *K. pneumoniae*, 2 de *P. aeruginosa* e 2 de *E. coli*. Os autores verificaram que diferentes concentrações do extrato vegetal a 5 e 10 mg/ml apresentaram contenção na formação do biofilme do isolado, sendo que nossos achados, corroboram com os aqui apresentados. Os

autores deixaram o extrato em contato durante apenas 5 minutos e utilizaram a metodologia do cristal violeta para determinar a biomassa do biofilme.

Após ter o conhecimento sobre as CIM e CMM do extrato de *C. annuum* em culturas planctônicas, nosso trabalho buscou analisar o efeito do extrato sobre os biofilmes, para esta análise, não utilizamos a técnica de cristal violeta e sim a medição da atividade metabólica das células do biofilme através do o ensaio colorimétrico do teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). O teste colorimétrico de MTT tem como fundamento avaliar o crescimento celular com base na capacidade das células vivas reduzirem o corante a um produto de tonalidade roxa/violeta (de Oliveira et al., 2017; Santos et al., 2020).

No tempo de 24 horas, através do teste de MTT grande parte das cepas clínicas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* tiveram redução do biofilme nas concentrações de 50 e 100 mg/mL do extrato glicólico de *C. annuum*, valores muitos próximos ao controle positivo de clorexidina 0,12%.

Os resultados obtidos com os extratos glicólicos em nosso estudo, apresentam um fator de análise difícil, quando comparados a outros por condições multifatoriais, como a variação natural da composição química dos extratos utilizados em cada estudo, em relação a alguns trabalharem com extratos glicólicos, aquosos e etanólicos, épocas de colheita, métodos de extração dos componentes das plantas, além dos diferentes métodos de testes microbiológicos utilizados nos estudos e principalmente ao fato de muitos utilizarem cepas-padrão invés de usar cepas clínicas.

Contudo, salientamos que o potencial antimicrobiano desses extratos merece atenção e estudos aprofundados *in vivo* para que futuras moléculas com potencial antimicrobiano sejam extraídas e comercializados nas mais diversas formas farmacêuticas.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

a) Todos os extratos glicólicos, apresentaram valor de CIM e CMM em cultura planctônica, sendo que, os valores variaram de 12,5 mg/mL para *Calendula officinalis*; de 25 à 50 mg/mL para *Capsicum annuum* e 1,56 a 3,12 mg/mL para *Hamamelis virginiana* sobre cepas-padrão de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e de 25 a 50 mg/mL para *Calendula officinalis*; de 50 mg/mL para *Capsicum annuum* e 3,12 a 6,25 mg/mL para *Hamamelis virginiana* para cepas-padrão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Com relação as cepas clínicas os extratos glicólicos apresentaram variações de 3,12 a 50 mg/mL.

b) os extratos de *C. annuum* L. e *C. officinalis* apresentaram importante ação antibacteriana e antibiofilme sobre cepas-padrão e clínicas multirresistentes a antibióticos de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com o contato de 24 horas, podendo ser considerado um potencial agente terapêuticos para o combate destes patógenos em futuras aplicações na área médica e odontológica.

REFERÊNCIAS

Agência Saúde [Internet]. [cited 2018 Sep 25]. Relação de plantas medicinais de interesse ao SUS. Available from:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicin_ais_sus_0603.pdf.

Avcioğlu NH, Sahal G, Bilkay IS. Antibiofilm effects of Citrus limonum and Zingiber officinale oils on biofilm formation of klebsiella ornithinolytica, klebsiella oxytoca and klebsiella terrigena species. African J Tradit Complement Altern Med. 2016;13(6):61–7. doi: 10.21010/ajtcam.v13i6.10.

Bae H, Jayaprakasha GK, Crosby K, Jifon JL, Patil BS. Simultaneous quantification of capsaicinoids and ascorbic acid from pungent peppers. J Chromatogr Sci. 2013;51(5):412-8. doi: 10.1093/chromsci/bms156. Epub 2012 Oct 18. PMID: 23081967.

Batiha GE, Alqahtani A, Ojo OA, Shaheen HM, Wasef L, Elzeiny M, et al. Biological properties, bioactive constituents, and pharmacokinetics of some Capsicum spp. and Capsaicinoids. Int J Mol Sci. 2020; 22;21(15):5179. doi: 10.3390/ijms21155179. PMID: 32707790; PMCID: PMC7432674.

Bakht J, Noor N, Iqbal A, Shafi M. Antimicrobial activity of different solvent extracted samples from the leaves and fruits of Capsicum annum. Pak J Pharm Sci. 2020;33(1):27-32. PMID: 32122827.

Bosland PW. Capsicums: innovative uses of an ancient crop. In: Janick J (ed). Arlington: Progress in New Crops, ASHS Press;1996. p.479-87.

Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME, Hernandez-Sanchez H. Antibacterial activity of Capsicum extract against Salmonella typhimurium and Pseudomonas aeruginosa inoculated in raw beef meat. Int J Food Microbiol. 2003 Jun 25;83(3):331-5. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00382-3. PMID: 12745238.

Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I, Jazireian P, Shariati A. Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilms: a review. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2020 Sep 30;19(1):45. doi: 10.1186/s12941-020-00389-5. PMID: 32998720; PMCID: PMC7528332.

Costa AR, de Lima Silva J, Lima KRR, Rocha MI, Barros LM, da Costa JGM, et al. Rhabdiodon echinus (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. Microb Pathog. 2017 Jun;107:280-6. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.001. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28385578.

* 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 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Deters A, Dauer A, Schnetz E, Fartasch M, Hensel A. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*. 2001 Nov;58(6):949-58. doi: 10.1016/s0031-9422(01)00361-2. PMID: 11684194.
- de Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de 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 Mar;242(6):625-34. doi: 10.1177/1535370216688571. Epub 2017 Jan 17. PMID: 28093936; PMCID: PMC5685262.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063. PMID: 12194761; PMCID: PMC2732559.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PMID: 11932229; PMCID: PMC118068.
- Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract*. 2012;18(3):173-6. doi: 10.1016/j.ctcp.2012.02.003. PMID: 22789794
- Esposito S, De Simone G. Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. *Infez Med*. 2017 Dec 1;25(4):301-10. PMID: 29286008.
- El País. Ada Yonath. Prêmio Nobel de Química [Internet]. [cited 2019 jul 01]. Available from: https://brasil.elpais.com/brasil/2019/05/23/ciencia/1558635795_212524.html
- Faria RL, Cardoso LM, Akisue G, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO, et al. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars. *J Appl Oral Sci*. 2011 Oct;19(5):476-82. doi: 10.1590/s1678-77572011000500007. PMID: 21986652; PMCID: PMC3984193.
- Friedlaender C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv F Pathol Anat*. 1882;87:319-24. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01880516>.
- Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FT, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJ. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol*. 2010 Feb 17;127(3):596-601. doi: 10.1016/j.jep.2009.12.019. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20026397.

da Silva Gebara R, Taveira GB, de Azevedo Dos Santos L, Calixto SD, Simão TLBV, Lassounskaia E, et al. Identification and characterization of two defensins from capsicum annuum fruits that exhibit antimicrobial activity. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020 Sep;12(3):1253-65. doi: 10.1007/s12602-020-09647-6. PMID: 32221795.

Govindarajan VS. Capsicum--production, technology, chemistry, and quality-- Part II. Processed products, standards, world production and trade. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1986;23(3):207-88. doi: 10.1080/10408398609527426. Erratum in: *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1987;25(3):283. PMID: 3514128.

Gloor M, Reichling J, Wasik B, Holzgang HE. Antiseptic effect of a topical dermatological formulation that contains Hamamelis distillate and urea. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2002;9(3):153-9. doi: 10.1159/000064265. PMID: 12119511.

Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res*. 2003 Jun;17(6):599-604. doi: 10.1002/ptr.1188. PMID: 12820224.

Iorizzi M, Lanzotti V, Ranalli G, De Marino S, Zollo F. Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. *J Agric Food Chem*. 2002 Jul 17;50(15):4310-6. doi: 10.1021/jf0116911. PMID: 12105963.

Jiménez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 2006 May 5;6:119. doi: 10.1186/1471-2407-6-119. PMID: 16677386; PMCID: PMC1513589.

Khairnar MS, Pawar B, Marawar PP, Mani A. Evaluation of *Calendula officinalis* as an anti-plaque and anti-gingivitis agent. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(6):741-7. doi: 10.4103/0972-124X.124491. PMID: 24554883; PMCID: PMC3917203.

Lehloenya R, Christians S. 590 A case of chronic urticaria complicated by *Raoultella Ornithinolytica* urinary tract infection, Bronchospasm and Angioedema. *World Allergy Organ J*. 2012 Feb 17;5(Suppl 2):S204. doi: 10.1097/01.WOX.0000411705.35430.b3. PMCID: PMC3513107.

Mandell GL. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2005.

Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004. PMID: 29404282; PMCID: PMC5786545.

Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chem.* 2009;114(2):553–60. doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.086.

Mokhtar M, Ginestra G, Youcefi F, Filocamo A, Bisignano C, Riazi A. Antimicrobial activity of selected polyphenols and capsaicinoids identified in pepper (*Capsicum annuum* L.) and their possible mode of interaction. *Curr Microbiol.* 2017 Nov;74(11):1253-60. doi: 10.1007/s00284-017-1310-2. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28721659.

Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *J Ethnopharmacol.* 2017 Jan 20;196:94-103. doi: 10.1016/j.jep.2016.12.006. Epub 2016 Dec 10. PMID: 27956358.

Pereira AHC, Pinto JG, Freitas MAA, Fontana LC, Pacheco Soares C, Ferreira-Strixino J. Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Jun;22:43-50. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.02.008. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29454901.

Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jul;67(7):3325-7. doi: 10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001. PMID: 11425763; PMCID: PMC93022.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Oct;11(4):589-603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589. PMID: 9767057; PMCID: PMC88898.

Ruppelt BM, Pereira EF, Gonçalves LC, Pereira NA. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom--I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86 Suppl 2:203-5. doi: 10.1590/s0074-02761991000600046. PMID: 1842002.

Santos PBDRED, Ávila DDS, Ramos LP, Yu AR, Santos CEDR, Berretta AA, et al. Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling.* 2020 Aug;36(7):834-45. doi: 10.1080/08927014.2020.1823972. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32954805.

Sauer S, Dlugosch L, Kammerer DR, Stintzing FC, Simon M. The Microbiome of the Medicinal Plants *Achillea millefolium* L. and *Hamamelis virginiana* L. *Front Microbiol.* 2021 Jul 20;12:696398. doi: 10.3389/fmicb.2021.696398. PMID: 34354692; PMCID: PMC8329415.

Shariati A, Azimi T, Ardebili A, Chirani AS, Bahramian A, Pormohammad A, et al. Insertional inactivation of *oprD* in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect.* 2017 Dec 1;21:75-80. doi: 10.1016/j.nmni.2017.10.013. PMID: 29234497; PMCID: PMC5722278.

Shayan S, Saeidi S. Antibacterial and antibiofilm activities of extract *Capsicum annum* L on the growth and biofilm formation of common pathogenic strains. *Int Res J Appl Basic Sci.* 2013;5(4):513–8.

Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1740(2):101-7. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.12.006. PMID: 15949675.

Sun T, Xu Z, Wu CT, Janes M, Prinyawiwatkul W, No HK. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annum* L.). *J Food Sci.* 2007;72(2):S98-102. doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x. PMID: 17995862.

Tóth B, Liktor-Busa E, Kúsz N, Szappanos Á, Mándi A, Kurtán T, et al. Phenanthrenes from *Juncus inflexus* with antimicrobial activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod.* 2016;79(11):2814–23. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00581.

Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antimicrobial susceptibility pattern and ESBL prevalence in *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections in the North-West of Pakistan. *African J Microbiol Res.* 2009;3(11):676-80. doi: 10.4314/ajb.v8i16.62081.

Wahba NM, Ahmed AS, Ebraheim ZZ. Antimicrobial effects of pepper, parsley, and dill and their roles in the microbiological quality enhancement of traditional Egyptian Kareish cheese. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(4):411-8. doi: 10.1089/fpd.2009.0412. PMID: 19919287.

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

Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000 May;182(10):2675-9. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000. PMID: 10781532; PMCID: PMC101960

World Health Organization (WHO). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide Geneva: WHO Press, World Health Organization; 2011.

WHO. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Internet]. Geneva: WHO; 2017. [cited 2020 dec 20]. Available

from: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistantbacteria/en>

Wolff HH, Kieser M. Hamamelis in children with skin disorders and skin injuries: results of an observational study. *Eur J Pediatr.* 2007 Sep;166(9):943-8. doi: 10.1007/s00431-006-0363-1. Epub 2006 Dec 20. PMID: 17177071.