



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

ALLANIS MOTA DA SILVA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE
QUILLAJA SAPONARIA SOBRE CEPAS CLÍNICAS
MULTIRRESISTENTES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

2022

ALLANIS MOTA DA SILVA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE QUILLAJA
SAPONARIA SOBRE CEPAS CLÍNICAS MULTIRRESISTENTES DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia,
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte
das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Coorientadora: Profa. Thaís Cristine Pereira

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).

Silva, Allanis Mota Da

Ação antimicrobiana e antibiofilme do extrato de Quillaja saponária sobre cepas clínicas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* / Allanis Mota Da Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

29 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira

Coorientadora: Thaís Cristine Pereira

1. Ação antimicrobiana. 2. Biofilme. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. Quillaja saponaria. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Pereira, Thaís Cristine, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Biociências e Diagnóstico Bucal

Prof. Dr. Felipe Nogueira Anacleto

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Odontologia Restauradora

Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Diagnóstico e Cirurgia

São José dos Campos, 04/07/2022.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria das Graças Silva e João Carlos da Silva, os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. Obrigada por todo carinho e cuidado que sempre tiveram.

As minhas irmãs, Natália, Jaqueline e Priscila, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida.

A todos aqueles que essa pesquisa possa ajudar de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar meus sonhos.

Agradeço a professora Luciane Dias de Oliveira, por sua dedicação na orientação desse projeto.

Agradeço a minha coorientadora, Thaís Cristine Pereira, que me deu todo o suporte no desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigada por toda paciência e dedicação.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT UNESP pela colaboração para a minha formação profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa, através do Processo nº 2020/05475-0, no período de 01/10/2020 a 30/09/2021.

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana". Carl Jung

RESUMO

Silva AM. Ação antimicrobiana e antibiofilme do extrato de *Quillaja saponária* sobre cepas clínicas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* [trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Objetivo: avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato glicólico de *Quillaja saponária* (quilaia) sobre três cepas clínicas multirresistentes (P1, P2, P3) e uma cepa padrão (ATCC 15442) de *Pseudomonas aeruginosa*. **Material e Métodos:** A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a CLSI (norma M7–A9) e a Concentração Microbicida Mínima (CMM) foi determinada por alíquotas semeadas dos poços em ágar *Brain Heart Infusion* - BHI (Himédia). Testes em biofilmes foram realizados, sendo o extrato de quilaia aplicado nas concentrações pré-determinadas pela CMM. A viabilidade dos biofilmes foi mensurada pelo teste de MTT e a quantificação de biomassa pelo cristal violeta. Os dados foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$). **Resultados:** O extrato quilaia apresentou CIM e CMM no valor de 3,1 mg/mL frente às cepas clínicas P1 e P3, e 1,5 mg/mL para a cepa clínica P2 e ATCC 15442, portanto, foi considerado bactericida contra as cepas avaliadas. O maior percentual de redução de biomassa em tratamentos de 5 min e 24 h foram, respectivamente, 37,6% (cepa P2) e 50,1% (cepa P3) quando comparado ao grupo controle. Em relação à redução da viabilidade, em testes de 5 min e 24 h de contato com o extrato, os valores máximos obtidos foram, respectivamente, 51,5% (cepa P2) e 49% (cepa P1), diferindo estatisticamente do grupo controle. **Conclusão:** O extrato glicólico de quilaia possui ação bactericida e antibiofilme frente às cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: ação antimicrobiana; biofilme; *Pseudomonas aeruginosa*; *Quillaja saponaria*.

ABSTRACT

Silva AM. Antimicrobial and antibiofilm action of Quillaja saponária extract on multidrug-resistant clinical strains of Pseudomonas aeruginosa [graduation final work]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

Objective: To evaluate *in vitro* the antimicrobial and antibiofilm activity of Quillaja saponaria (quillaia) glycolic extract against three multidrug-resistant clinical strains (P1, P2, P3) and a standard strain (ATCC 1542) of Pseudomonas aeruginosa.

Material and Methods: The Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by the broth microdilution technique, according to CLSI (M7–A9 standard) and the Minimum Microbicidal Concentration (MMC) was determined by seeded aliquots from the wells in agar Brain Heart Infusion - BHI (Himedia). Bio tests were carried out, and the quillaia extract was applied in pre-determined packages by CMM. The viability of biofilms was measured by the MTT test and quantification of violet biomass. Data were analyzed by the ANOVA method complemented by the Tukey method ($p \leq 0.05$). **Results:** The quillaia extract presented CIM and CMM in the amount of 3.1 mg/mL against the clinical strains P1 and P3, and 1.5 mg/mL for the bactericidal strain P2 and ATCC 15442, therefore, it was considered against like strains. The highest percentage of biomass reduction in treatments of 5 min and 24h were, respectively, 37.6% (P2 strain) and 50.1% (P3 strain). Regarding the reduction of viability, in tests of 5 min and 24 h of contact with the maximum, the values obtained were, respectively, 51.5% (strain P2) and 49% (strain P1). **Conclusion:** The quillaia glycolic extract has antimicrobial and antibiofilm action against multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa.

Keywords: antimicrobial action; biofilm; Pseudomonas aeruginosa; Quillaja saponaria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	13
2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes.....	14
2.2.1 Avaliação da Biomassa do biofilme pelo teste do Cristal Violeta	15
2.2.2 Avaliação da redução da viabilidade do biofilme pelo teste de MTT	15
2.3 Análise estatística	16
3 RESULTADOS.....	16
3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	16
3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos	17
3.2.1 Avaliação da Biomassa pelo teste do Cristal Violeta	17
3.2.2 Atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de MTT	19
4 DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa consiste em uma bactéria Gram-negativa vastamente encontrada tanto na água, quanto no solo [1]. Além disso, possui capacidade de originar doenças infecciosas quando exposta a condições propícias, como sistema imune deprimido do hospedeiro [2]. É considerado um dos agentes patogênicos mais oportunos em infecções hospitalares, visto que é caracterizado por exibir competência para sobreviver em locais que apresentem circunstâncias desvantajosas, se adequando ao meio [3]. Esta espécie apresenta resistência a diversos antibióticos e exibe inúmeros fatores de virulência, entre eles, a eficácia na secreção de enzimas e toxinas extracelulares e a capacidade de se unir a superfícies bióticas e abióticas, compondo uma estrutura denominada biofilme [4,5].

Nesse contexto, a importância do combate a essa espécie é apresentada por Souza et al. [6] que relataram sua associação com o caso de uma paciente HIV-positiva, a qual possuía lesões necróticas na mucosa oral, mobilidade dentária patológica, perda óssea e osteomielite hematogênica maxilar em decorrência de choque séptico causado por *P. aeruginosa*. Com isso, é demonstrada a necessidade da área odontológica em sancionar seu interesse no uso de fitoterápicos como alternativa no combate a este patógeno, visto que, a cavidade bucal representa um sítio de colonização dessa bactéria, sendo prevalente no biofilme subgengival e na saliva, principalmente em casos de indivíduos tabagistas e com infecção periodontal [7].

P. aeruginosa também está associado ao prognóstico de outras diversas infecções, particularmente aquelas com predisposição a se tornarem crônicas, como infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística [8]. Além disso, estudos indicam que o biofilme dentário pode ser um oportuno reservatório para microrganismos aeróbios, sendo fonte para pneumonia [9].

Em decorrência da capacidade de *P. aeruginosa* originar graves infecções e de seu potencial para tolerar a ação de antibióticos, se fez necessária a elaboração de diferentes formulações antimicrobianas, a fim de combater essa bactéria, visto que, a resistência a esses medicamentos reflete em um empecilho para o completo bem-estar da população vigente [10].

É importante ressaltar que há registros antigos relacionados ao emprego de plantas medicinais [11]. Dessa forma, atualmente o uso de fitoterápicos vêm se estabelecendo para tratar diversas doenças passando a ser empregada pelo homem a fim de alcançar benefícios para a saúde [12]. Sendo assim, é de grande importância a utilização de fitoterápicos, em conjunto com outros métodos, como recurso terapêutico na intervenção de infecções bucais [13].

É interessante enfatizar que os fitofármacos já estão sendo pesquisados na área odontológica por suas propriedades antissépticas, antioxidantes, analgésicas e antimicrobianas, podendo ser promissores no tratamento de cepas resistentes aos medicamentos convencionais [14]. Ghahremanlo et al. [15] apresentaram a fitoterapia como um meio alternativo para tratamento do líquen plano oral, visto que possui menores efeitos colaterais e vantagens relacionadas ao custo-benefício, quando comparado a outras terapias. Agrawal et al. [16] analisaram o efeito antibacteriano de extratos de plantas de uso popular sobre bactérias resistentes relacionadas ao desenvolvimento de infecções endodônticas, demonstrando sua eficácia. Além disso, Kumar et al. [17] constataram que a odontologia também utiliza extratos de ervas para alívio de dores, inflamações e controle de biofilmes dentários.

Nessa perspectiva, diversos princípios ativos naturais obtiveram notoriedade, em virtude de sua comprovada eficácia em aplicações terapêuticas. Dentre eles, destaca-se o gênero *Quilaja*, conhecida como árvore de sabão, a qual possui apenas duas espécies, sendo elas *Quillaja saponaria* (QS) e *Quillaja brasiliensis* (QB), encontradas em áreas específicas da América do Sul [18]. Ambas apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias de relevante interesse farmacológico [19]. Além disso, resultados mostram potenciais antibacterianos e antibiofilme para saponina de *Q. saponaria* [20].

Estudos mostram que o uso das saponinas de *Q. saponaria* como imunoadjuvantes estão ampliando rapidamente, pois suas características químicas interagem com as membranas, originando um eficaz sistema imunológico, vantajoso para ampliar as defesas contra patógenos intra e extracelulares, como mostra a análise de Magedans et al. [21]. Isso pode ser sustentado em razão da evidência de que as saponinas possuem propriedades detergentes, destruindo lípidios e, conseqüentemente, alterando a permeabilidade e fluidez das membranas celulares, fator que possui potencial para prejudicar a fixação de patógenos [22].

Há evidências de que diversos extratos de origem vegetal possuem biocompatibilidade aliada a ação antimicrobiana [23]. Nesse contexto, foi realizada uma rigorosa análise em relação a toxicidade associada ao uso de saponinas de *Q. saponaria* e *Q. brasilienses*, e concluiu-se que, ambas são quimicamente semelhantes e possuem graus distintos de toxicidade, os quais podem ser contornados por estratégias, como por exemplo, com uso associado a outros adjuvantes ou incorporação de nanopartículas [21]. Além disso, a geração sustentável de biomassa de *Q. saponaria* é crítica para o progresso na utilização em larga escala dessas moléculas e tem se comprovado viável na consolidação e expansão do uso industrial desses compostos químicos [21].

Os estudos na literatura referentes a ação antimicrobiana do extrato glicólico de *Q. saponaria* contra cepas multirresistentes são escassos. Desse modo, em decorrência de *P. aeruginosa* estar em 2º lugar na lista crítica de prioridades entre as bactérias resistentes a antibióticos, segundo a OMS [24], além da comprovada eficácia de fitoterápicos sobre microrganismos, se faz necessária a análise em questão, visto que, corresponde a uma necessidade global a busca por novos fármacos. Diante disso, a proposta desse estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato glicólico de *Quillaja saponária* (quilaia) sobre três cepas clínicas multirresistentes (P1, P2, P3) e uma cepa padrão (ATCC 15442) de *Pseudomonas aeruginosa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada sobre três cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlín de São José dos Campos, estado de São Paulo, sendo o perfil de resistência demonstrado no quadro 1. Foi testada também a ação do extrato em cepa de referência (*P. aeruginosa* ATCC 15442) que foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT - Unesp de São José dos Campos).

O extrato glicólico de *Quillaja saponaria* foi adquirido comercialmente (Distriol, Bom Jesus dos Perdões, SP) na concentração de 20% (200 mg/mL) em propilenoglicol.

Quadro 1: Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa*

Antibióticos	<i>P. aeruginosa</i>		
	P1	P2	P3
Amicacina	S	S	R
Cefepime	I	I	R
Ceftazidima	I	I	R
Ciprofloxacina	I	I	R
Colistina	-	-	-
Imipenem	I	I	I
Levofloxacina	I	I	R
Meropenem	S	S	I
Piperacilina + Tazobactam	I	I	R

Legenda: S: Sensível; R: Resistente; I: Intermediário; -: Teste não desenvolvido.

Fonte: Dados fornecidos pelo Bioclin - Laboratório de Análises Clínicas de São José dos Campos - SP

2.1 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), norma M7-A9 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012). O teste foi realizado em microplacas, onde foram adicionados 100 μ L de caldo *Mueller Hinton* (Himedia, Mumbai, Índia) em todos os poços testes. Após, 100 μ L do extrato foram adicionados apenas nos primeiros poços de cada grupo teste, de onde partiram 10 diluições seriadas (quadro 2). Os inóculos bacterianos foram preparados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) a partir de culturas de 24 h incubadas em ágar *Brain Heart Infusion* (Himedia, Mumbai, Índia) em estufa bacteriológica (37 °C) e padronizados em espectrofotômetro com aproximadamente 10^6 células/mL. Em seguida, os inóculos padronizados foram adicionados em todos os poços, no volume de 100 μ L. Após incubação de 24 h, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvação que indique crescimento microbiano de cada cepa (figura 1A).

Para que a CMM do extrato seja determinada foi necessário inocular em ágar BHI os conteúdos dos poços e, após 48 h de incubação (37°C), na menor concentração em que não houve crescimento de colônias, foi determinada como a CMM do extrato para cada cepa (figura 1B).

Quadro 2 – Diluição dos extratos para determinação de CIM e CMM

Concentração do extrato de <i>Q. saponaria</i> em microdiluição										
Poços	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o	7 ^o	8 ^o	9 ^o	10 ^o
Extrato	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09

Legenda: Valores expressos em mg/mL.

Fonte: elaborado pela autora



Figura 1 - Determinação de CIM e CMM. A) Determinação da CIM do extrato de *Q. saponaria*, por meio do ensaio de microdiluição em caldo. B) Determinação da CMM em ágar BHI onde foi determinada a menor concentração semeada que não apresentou crescimento bacteriano.
Fonte: Elaborado pela autora.

2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes

Os biofilmes foram formados em fundo de microplacas de 96 poços, para isso, foram adicionados 100 μ L de caldo BHI em cada um dos poços e foi preparado o inóculo do microrganismo previamente cultivado em ágar BHI a 37°C padronizado em espectrofotômetro com 10^7 células/mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Os biofilmes foram incubados por 48 h, com troca do meio de cultura após 24 h.

Passado o período de formação de cada biofilme, estes foram colocados em contato com os tratamentos pelo período de 5 min e de 24 h em experimentos independentes e em diferentes placas para cada tipo de teste. A microplaca foi dividida em grupos com $n=10$ para cada tratamento com extrato (CMM, CMM x 2, CMM x 4), controle positivo (solução de clorexidina) e controle negativo (caldo BHI). Após os tratamentos, as soluções foram descartadas e o biofilme foi lavado duas vezes com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) antes de serem feitos os testes descritos a seguir.

2.2.1 Avaliação da Biomassa do biofilme pelo teste do Cristal Violeta

A atividade antibiofilme dos extratos foi avaliada pela quantificação da biomassa microbiana pelo teste do cristal violeta. Após aplicação dos tratamentos foram adicionados 200 µL/poço de metanol por 15 min para fixação do biofilme, em seguida o metanol foi retirado e a placa foi incubada a 37°C por 24 horas, para secagem. Após incubação foram adicionados 200µL/ poço de cristal violeta a 1% (V/V) por 5 min, o corante foi retirado, sendo que o excesso de corante foi removido por meio de lavagens com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e foi adicionado ácido acético a 33% (V/V). Em seguida a placa foi lida em leitora de microplaca (570 nm) e as densidades ópticas convertidas na biomassa do biofilme, através da formula abaixo:

% Redução da biomassa = $100 - (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$

2.2.2 Avaliação da redução da viabilidade do biofilme pelo teste de MTT

Foi realizado o teste de viabilidade do microrganismo (MTT) em que foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h em estufa a 37 °C, passado o período de incubação foi retirada a solução de MTT e foram adicionados 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada ao abrigo da luz em estufa a 37 °C por 10 min e colocada no *Shaker* sobre agitação constante por 10 min. Após a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm, as densidades ópticas obtidas foram convertidas, por meio da fórmula abaixo, em percentual de redução de viabilidade do microrganismo:

% Redução de Viabilidade = $100 - (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$

2.3 Análise estatística

Inicialmente os dados passaram por teste de normalidade no *software* GraphPad Prism 5. Os dados foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey*, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

3 RESULTADOS

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

O extrato glicólico de *Q. saponaria* possui atividade antimicrobiana sobre cultura planctônica de cepas de *P. aeruginosa*, sendo os valores de CIMs e CMMs demonstrados na Tabela I.

Tabela I – CIM e CMM do extrato de *Q. saponaria* para as cepas de *P. aeruginosa*

Cepas	CIM	CMM
ATCC 15442	1,5 mg/mL	1,5 mg/mL
P1	3,1 mg/mL	3,1 mg/mL
P2	1,5 mg/mL	1,5 mg/mL
P3	3,1 mg/mL	3,1 mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

O extrato glicólico de *Q. saponaria* apresentou CIM e CMM frente às cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* e ATCC 15442, portanto, foi considerado bactericida contra as cepas avaliadas.

3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos

As concentrações utilizadas para os testes em biofilmes foram determinadas a partir do resultado de CIM e CMM para a forma planctônica de cada cepa de *P. aeruginosa*, conforme o quadro 3.

Quadro 3 – Concentrações dos extratos utilizadas para tratamentos em biofilmes monotípicos de cepas ATCC 15442 e clínicas de *P. aeruginosa*.

Cepas	Concentrações do extrato
ATCC 15442	1,5mg/mL; 3mg/mL; 6mg/mL
P1	3mg/mL; 6mg/mL; 12mg/mL
P2	1,5mg/mL; 3mg/mL; 6mg/mL
P3	3mg/mL; 6mg/mL; 12mg/mL

Fonte: elaborado pela autora.

3.2.1 Avaliação da Biomassa pelo teste do Cristal Violeta

Os resultados obtidos por meio do teste do Cristal violeta mostraram reduções significativas de biomassa em biofilmes monotípicos de *P. aeruginosa*. Quando em contato por 5 minutos, o extrato glicólico de *Q. saponaria* na concentração de 6 mg/mL, apresentou redução de 15,5% da biomassa da cepa ATCC 15442, semelhante estatisticamente a clorexidina (0,12%), o qual foi de 24,9% (Figura 2A). Em relação à cepa P1, quando também em contato por 5 minutos, todas as concentrações do extrato não apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle, exceto a clorexidina (Figura 2B).

Ao analisar as concentrações de 3 mg/mL e 6 mg/mL do extrato frente à cepa P2 (5 minutos), observou-se reduções significativas de 36,9% e 37,6% respectivamente, enquanto a clorexidina (0,12%) apresentou uma redução de 56,2%

(Figura 2C). Para a cepa multirresistente P3, todas as concentrações do extrato permitiram crescimento bacteriano (Figura 2D).

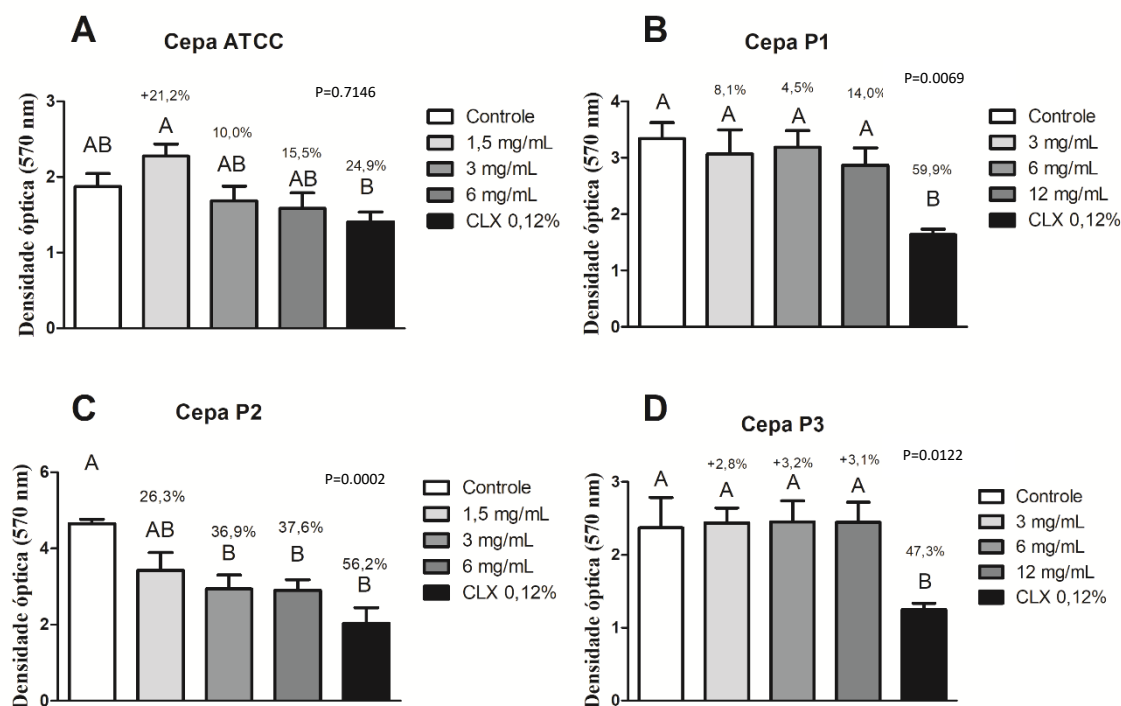


Figura 2 - Gráficos demonstrando a redução de biomassa (CV) em biofilmes de *P. aeruginosa* após tratamento de 5 minutos. Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “A”, “B”, e “C” presentes acima das barras demonstram a semelhança ou diferenças estatísticas entre os grupos.

Fonte: elaborado pela autora.

Nos tratamentos de 24 horas, para a cepa ATCC de *P. aeruginosa*, não houve redução significativa da biomassa do biofilme, exceto a clorexidina (0,6%) que reduziu 69,5% (Figura 3A). Em relação à cepa P1, quando também em contato 24 horas, todas as concentrações do extrato não apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle, exceto a clorexidina (Figura 3B).

Para cepa P2, a clorexidina (0,6%) apresentou uma redução de 50%, estatisticamente semelhante à concentração de 6 mg/mL do extrato, o qual reduziu 34,9% em biomassa (Figura 3C). Além disso, ao realizar o tratamento de 24 horas na cepa multirresistente P3, as concentrações de 6 mg/mL e 12 mg/mL apresentaram reduções significativas de 32,5 e 50,1%, quando comparada ao controle, respectivamente (Figura 3D).

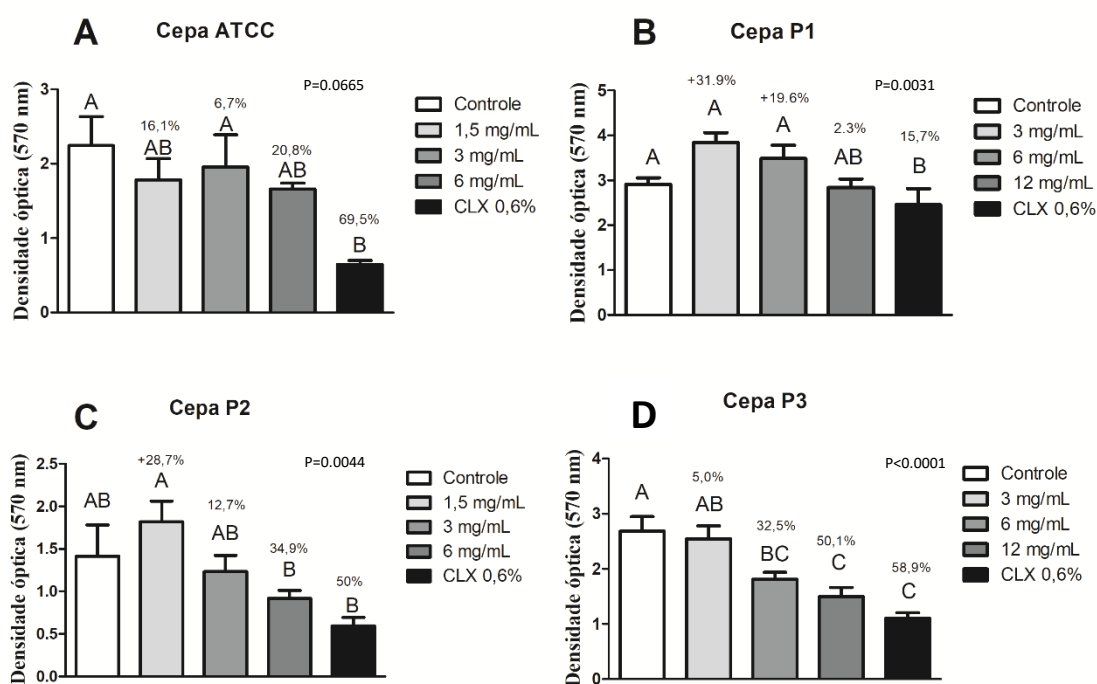


Figura 3 - Gráficos demonstrando a redução de biomassa (CV) em biofilmes de *P. aeruginosa* após tratamento de 24 horas. Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “A”, “B”, e “C” presentes acima das barras demonstram a semelhança ou diferenças estatísticas entre os grupos. Fonte: elaborado pela autora.

3.2.2 Atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de MTT

De acordo com os resultados de viabilidade, pode-se verificar que após a aplicação do extrato glicólico por 5 minutos frente à cepa ATCC 15442 não houve diferença estatística dos tratamentos em comparação ao controle, exceto clorexidina (Figura 4A). Para a cepa P1, pelo mesmo tempo, o extrato nas concentrações de 3, 6 e 12 mg/mL apresentou reduções significativas de 40%, 29,5% e 35,5%, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 4B).

Em testes de 5 minutos frente a cepa P2, as concentrações de 1,5, 3 e 6 mg/mL do extrato apresentaram reduções significativas de 47,0%, 44,5% e 51,5%

respectivamente, sendo as concentrações 1,5 e 6 mg/mL estatisticamente semelhantes à clorexidina (Figura 4C). Quando a cepa P3 foi tratada por 5 minutos com o extrato nas concentrações de 3 e 6 mg/mL, houve uma redução significativa de 41,2% e 31,4%, respectivamente, sendo a concentração de 3 mg/mL estatisticamente semelhante à clorexidina (Figura 4D).

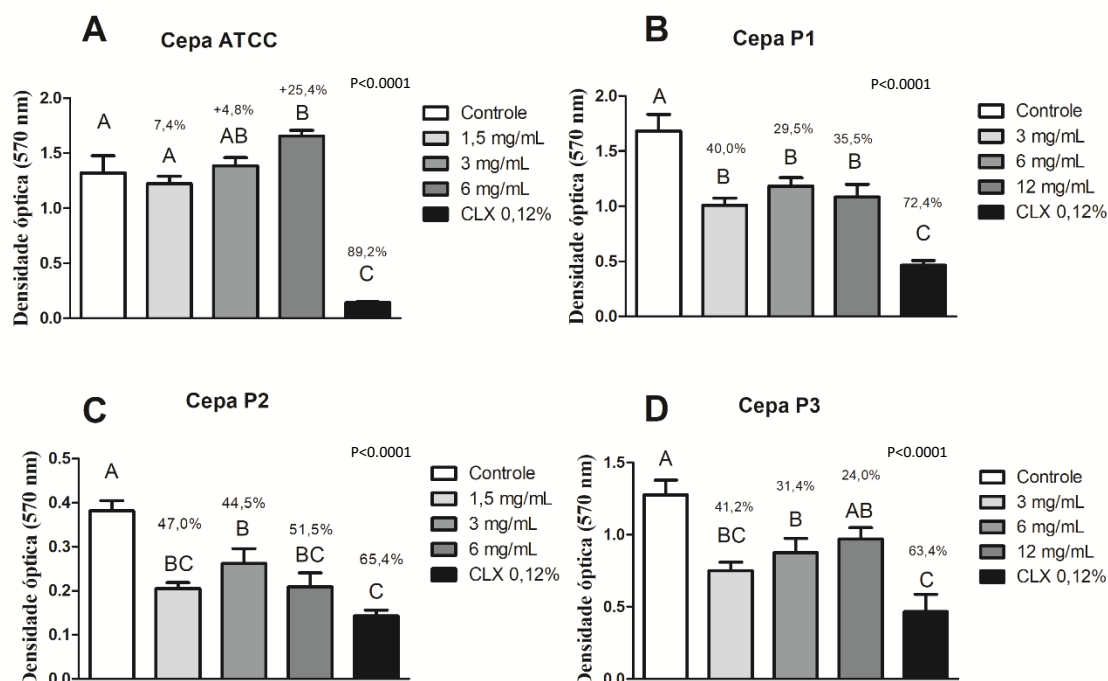


Figura 4 - Gráficos demonstrando a redução da viabilidade obtida pelo teste MTT após tratamentos de 5 minutos aplicados em biofilmes de *P. aeruginosa*. Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As letras “A”, “B”, e “C” presentes acima das barras demonstram a semelhança ou diferenças estatísticas entre os grupos.

Fonte: elaborado pela autora.

Por fim, pode-se verificar que após a aplicação do extrato glicólico de quilaia por 24 horas frente à cepa ATCC 15442 não houve diferença estatística dos tratamentos em comparação ao controle, exceto clorexidina (Figura 5A). Para a cepa P1, quando em contato pelo mesmo tempo, o extrato nas concentrações de 3 e 12 mg/mL obteve reduções significativas de 38,7% e 49%, respectivamente quando comparado ao grupo controle (Figura 5B).

No tratamento de 24 horas para cepa P2 não houve reduções significativas da viabilidade quando comparado ao controle, porém as concentrações de 3mg/mL e

6 mg/mL foram estatisticamente semelhantes à clorexidina (Figura 5C). Contudo, nos testes de 24 horas para cepa P3, os grupos tratados com o extrato não promoveram reduções (Figura 5D).

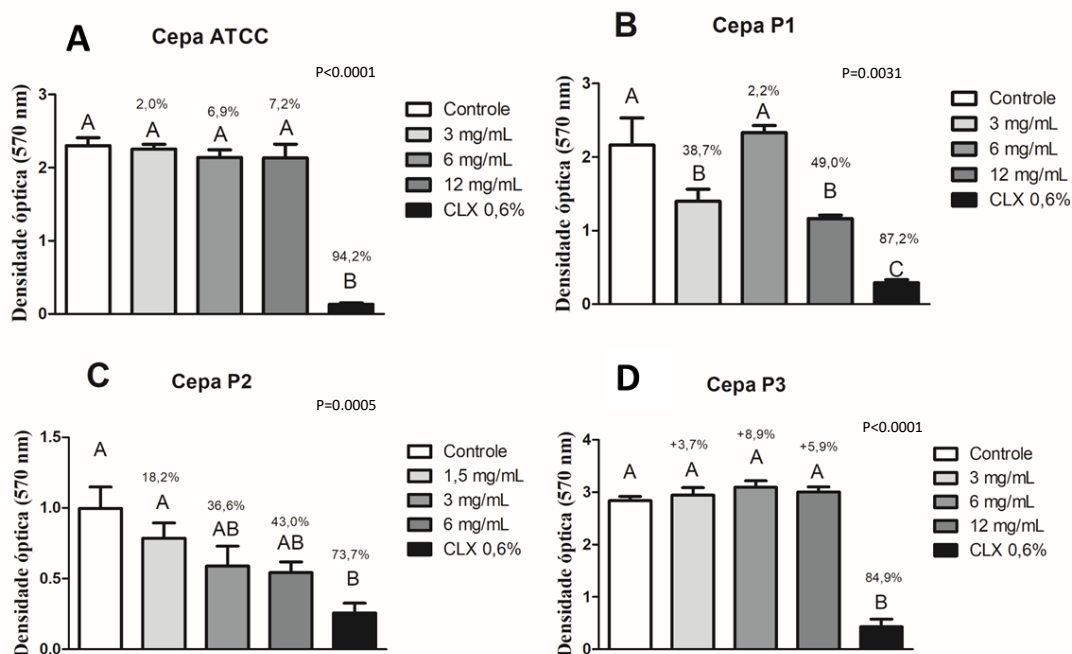


Figura 5 - Gráficos demonstrando a redução da viabilidade obtida pelo teste MTT após tratamentos de 24 horas aplicados em biofilmes de *P. aeruginosa*. Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “A”, “B”, e “C” presentes acima das barras demonstram a semelhança ou diferenças estatísticas entre os grupos.

Fonte: elaborado pela autora.

4 DISCUSSÃO

A busca por novas alternativas para combater a resistência antimicrobiana é um desafio e interesse mundial, visto que, é frequente a propagação de novos microorganismos e a mutação dos já existentes, acarretando em uma acelerada disseminação da resistência aos antibióticos, e, por consequência, a necessidade de alternativas de tratamento aos antimicrobianos convencionais, sendo uma opção promissora os fitoterápicos [25]. Nesse enfoque, os resultados comprovados nesse estudo demonstraram que o extrato glicólico de *Q. saponaria* apresentou ação antimicrobiana e antibiofilme contra cepas clínicas multirresistentes e cepas padrão de *P. aeruginosa*, atuando em algumas análises de forma semelhante a clorexidina, a qual é considerada “padrão ouro” na eliminação de bactérias orais.

Dados promissores foram observados em um estudo realizado por de Oliveira et al. [26], no qual houve a comprovação de que o extrato de *Rosmarinus officinalis L.* contribuiu efetivamente para o controle *in vitro* de importantes espécies de microorganismos como *P. aeruginosa*, em biofilmes mono e polimicrobianos. Além disso, utilizaram metodologia similar à realizada em nosso estudo, demonstrando que esse extrato promoveu viabilidade celular acima de 50% em concentrações ≤ 50 mg/mL, excelente efeito anti-inflamatório, sendo também não genotóxico para as linhagens estudadas. Santos et al. [27] analisaram a ação antibiofilme do extrato aquoso de própolis verde brasileira contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*, e concluíram que o mesmo possui forte potencial antimicrobiano, chegando até 65% de redução da atividade metabólica, após 5 min de contato com biofilmes, apresentando uma ação semelhante à clorexidina. Tais resultados evidenciam o potencial efeito antibiofilme de extratos naturais, solidificando nosso estudo, no qual o extrato natural de *Q. saponaria* sobre a cepa P2 reduziu, na concentração de 6 mg/mL, 51,5% a viabilidade, acompanhado de uma redução de 47,0% ao ser utilizado a concentração de 1,5 mg/mL, em testes de 5 minutos. Assim, fica evidente que os extratos de plantas podem ser agentes terapêuticos promissores em formulações médicas e odontológicas, a fim de controlar biofilmes de microorganismos multirresistentes.

Um estudo realizado por Arabsk et al. [28], no qual cepas clínicas multirresistentes de *E. coli* foram isoladas de urina humana e analisadas, sendo que, os resultados obtidos demonstraram que as saponinas de *Q. saponaria* na dose de 12 µg/mL aumentaram o crescimento de seis cepas de *E. coli*. Presumindo que as saponinas aumentam o influxo de nutrientes do meio para as células de *E. coli*. Dessa forma, foi constatado que as saponinas não têm efeitos sozinha ou sinérgicos na ação antibacteriana dos antibióticos testados (ampicilina, estreptomicina e ciprofloxacina). Ao contrário, a viabilidade bacteriana, expressa em unidades formadoras de colônias (UFC / mL), na presença de saponinas e antibióticos, promoveu maior número de células de *E. coli*. Analisando isso, em comparação a viabilidade no nosso estudo, a cepa multirresistente P1 não obteve reduções significativas quando colocada por 5 minutos em contato com o extrato. E para o tratamento de 24 horas, também não foram observadas reduções estatísticas significativas para cepa P1 e o extrato não promoveu redução e permitiu um crescimento da bactéria P3. Diante disso, mais investigações devem ser realizadas para verificar essa ação.

Baseado na importância de se encontrar novos fármacos contra cepas bacterianas que estão aumentando a resistência aos antibióticos, houve buscas a fim de analisar a atividade antibiofilme de extratos derivados de plantas medicinais (*Berginia ciliata*, *Clematis grata* e *Clematis viticella*) contra *P. aeruginosa*. Esses estudos revelaram que as plantas sob investigação podem ser candidatas potenciais para a descoberta de drogas para tratar o patógeno infeccioso em questão, especialmente para seu tratamento de biofilme, sendo mais especificamente o extrato metanólico 1% de *B. ciliata*, o qual apresentou mais de 80% de inibição da formação de biofilme [29]. Considerando isso, em nosso estudo, verificamos tanto reduções significativas de biomassa quanto de viabilidade para cepas clínicas multirresistentes e cepas padrão de *P. aeruginosa*, variando entre 1,5 e 12 mg/mL para tais, consolidando a realização de estudos realizados em biofilmes monotípicos. Levando o relato em consideração e a escassez de pesquisas envolvendo a ação do extrato glicólico de *Q. saponaria* contra *P. aeruginosa*, fundamenta e torna necessário nosso estudo a fim de verificar a capacidade antimicrobiana de diferentes concentrações desse extrato frente às cepas resistentes aos antibióticos convencionais.

Os resultados obtidos em nossa pesquisa em relação a redução biomassa e viabilidade de biofilmes de *P. aeruginosa* comprovaram que há ação antibiofilme do extrato de *Q. saponaria*. A cepa multirresistente P2 obteve a maior redução de biomassa quando comparada com as demais cepas (37,6%), com 5 minutos de tratamento (6 mg/mL). Com 24 horas de tratamento, a cepa multirresistente P3 teve a biomassa reduzida em 50,1%, sendo, portanto, a maior redução quando comparada com as outras cepas analisadas. Em relação a viabilidade, as cepas multirresistentes P2 e P3 tiveram reduções significativas, com 5 min de contato com o extrato. E para o tratamento de 24 horas, foram observadas reduções significativas somente para cepa P2 nos tratamentos com 3 mg/mL e 6 mg/mL, sendo 36,6% e 43% respectivamente.

Devido ao carecimento pela elaboração de novos fármacos que sejam efetivos em combate a bactérias multirresistentes e diante dos resultados alcançados nesse estudo, os quais comprovam a ação antimicrobiana sobre as cepas analisadas, é fundamental que pesquisas complementares *in vivo* sejam desenvolvidas a fim de definir os níveis terapêuticos, além da realização de mais estudos realizando a combinação com outras substâncias, para potencializar os espectros obtidos. Dessa forma, resultando em possibilidades de novas alternativas terapêuticas que auxiliam a resolução dessa problemática de grande relevância no sistema de saúde global. O extrato de *Q. saponaria* mostrou ter ação antimicrobiana e antibiofilme para cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa*, podendo, portanto, ser um candidato para novas formulações terapêuticas contra esses patógenos.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato glicólico de *Quillaja saponária* possui ação bactericida sobre cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, com CMM entre 1,5 e 3,1 mg/mL, bem como ação antibiofilme para as cepas clínicas, nos tempos de contato de 5 min e 24 h, em diferentes concentrações.

REFERÊNCIAS

1. Salter SJ. Keeping an eye on *P. aeruginosa*. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Feb;13(2):69. doi: 10.1038/nrmicro3422. Epub 2014 Dec 31. PubMed. PMID: 25549963.
2. Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, et al. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open*. 2014 Nov 4;4(11):e006278. doi: 10.1136/bmjopen-2014-006278. PubMed. PMID: 25371418.
3. Comin VM, Lopes LQ, Quatrin PM, de Souza ME, Bonez PC, Pintos FG, et al. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Microb Pathog*. 2016 Apr;93:120-5. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.019. Epub 2016 Jan 25. PubMed. PMID: 26821356.
4. Pihl M, Chávez de Paz LE, Schmidtchen A, Svensäter G, Davies JR. Effects of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Aug;59(3):504-12. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00707.x. Epub 2010 May 29. PubMed. PMID: 20579097.
5. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today*. 2019 Jan;24(1):350-9. doi: 10.1016/j.drudis.2018.07.003. Epub 2018 Jul 20. PubMed. PMID: 30036575.
6. Souza LCD, Lopes FF, Bastos EG, Alves CMC. Oral infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patient with chronic kidney disease - a case report. *J Bras Nefrol*. 2018 Jan-Mar;40(1):82-85. doi: 10.1590/1678-4685-JBN-3812. Epub 2018 Apr 19. PubMed PMID: 29796582.
7. Souto R, Silva-Boghossian CM, Colombo AP. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz J Microbiol*. 2014 Aug 29;45(2):495-501. eCollection 2014. doi: 10.1590/s1517-83822014000200017. PubMed. PMID: 25242933.
8. Silva Filho LV, Ferreira FA, Reis FJ, Britto MC, Levy CE, Clark O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *J Bras Pneumol*. 2013 Jun-Ago;39(4):495-512. doi: 10.1590/S1806-37132013000400015. PubMed. PMID: 24068273.
9. Rivas Caldas R, Le Gall F, Reverter K, Rault G, Virmaux M, Gouriou S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Periodontal Pathogens in the Oral Cavity and Lungs of Cystic Fibrosis Patients: a Case-Control Study. *J Clin Microbiol*. 2015 Jun;53(6):1898-907. doi: 10.1128/JCM.00368-15. Epub 2015 Apr 8. PubMed. PMID: 25854483.
10. Reza A, Sutton JM, Rahman KM. Effectiveness of Efflux Pump Inhibitors as Biofilm Disruptors and Resistance Breakers in Gram-Negative (ESKAPEE). *Antibiotics*

(Basel). 2019 Nov 19;8(4).pii:E229. doi: 10.3390/antibiotics8040229. PubMed. PMID: 31752382.

11. Abu-Rabia A. Urinary diseases and ethnobotany among pastoral nomads in the Middle East. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2005 Aug;1:4. doi: 10.1186/1746-4269-1-4. PubMed. PMID: 16270930.

12. Sarris J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: 10-year updated review. *Phytother Res*. 2018 Jul;32(7):1147-62. doi: 10.1002/ptr.6055. Epub 2018 Mar 25. PubMed. PMID: 29575228.

13. Anand G, Ravinanthan M, Basaviah R, Shetty AV. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015 Jan-Mar;7(1):69-74. doi: 10.4103/0975-7406.148780. PubMed. PMID: 25709341.

14. Sinha DJ, Sinha AA. Natural medicaments in dentistry. *Ayu*. 2014 Apr-Jun;35(2):113-8. doi: 10.4103/0974-8520.146198. PubMed. PMID: 25558153.

15. Ghahremanlo A, Boroumand N, Ghazvini K, Hashemy SI. Herbal medicine in oral lichen planus. *Phytother Res*. 2019 Feb;33(2):288-93. doi: 10.1002/ptr.6236. Epub 2018 Nov 12. PubMed. PMID: 30421555.

16. Agrawal V, Kapoor S, Agrawal I. Critical Review on Eliminating Endodontic Dental Infections Using Herbal Products. *J Diet Suppl*. 2017 Mar 4;14(2):229-40. doi: 10.1080/19390211.2016.1207004. Epub 2016 Aug 11. PubMed. PMID: 27715358.

17. Kumar G, Jalaluddin M, Rout P, Mohanty R, Dileep CL. Emerging Trends of Herbal Care in Dentistry. *J Clin Diagn Res*. 2013 Ago;7(8):1827-9. doi: 10.7860/JCDR/2013/6339.3282. Epub 2013 Aug 1. PubMed. PMID: 24086929.

18. Luebert F. Taxonomy and distribution of the genus *Quillaja* Molina (Quillajaceae). *Feddes Repertorium*. 2013;124(4):157–62. doi: 10.1002/fedr.201400029.

19. Fleck JD, Betti AH, da Silva FP, Troian EA, Olivaro C, Ferreira F, et al. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities. *Molecules*. 2019 Jan;24(1):171. doi: 10.3390/moléculas24010171. PubMed. PMID: 30621160.

20. Fink R, Filip S. Surface-active natural saponins. Properties, safety, and efficacy. *Int J Environ Health Res*. 2022 Feb 25:1-10. doi: 10.1080/09603123.2022.2043252. Epub ahead of print. PMID: 35213278.

21. Magedans YV, Yendo AC, Costa F, Gosmann G, Fett-Neto AG. Foamy matters: an update on *Quillaja* saponins and their use as immunoadjuvants. *Future Med Chem*. Jun 2019;11(12):1485-1499. doi: 10.4155 / fmc-2018-0438. Epub 2019, 15 de julho. PubMed. PMID: 31304830.

22. De Geyter E, Swevers L, Soïn T, Geelen D, Smagghe G. Saponins do not affect the ecdysteroid receptor complex but cause membrane permeation in insect culture

cell lines. *J Insect Physiol.* 2012 Jan;58(1):18-23. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.09.005. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22057058.

23. de Oliveira JR, de Castro VC, das Graças Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern . Med .* 2013 Aug 15;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208. PMID: 23945270; PMCID: PMC3751599.

24. Organização Pan-Americana de Saúde. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente [internet]. [cited 12 Mar 2020]. Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812

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

26. 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):625-634. doi: 10.1177/1535370216688571. Epub 2017 Jan 17. PMID: 28093936; PMCID: PMC5685262.

27. 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):834–845. doi:10.1080/08927014.2020.1823972. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32954805.

28. Arabski M, Węgierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:286216. doi: 10.1155/2012/286216. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22500084; PMCID: PMC3303633.

29. Alam K, Farraj DAA, Mah-E-Fatima S, Yameen MA, Elshikh MS, Alkufeidy RM, et al. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Infect Public Health.* 2020 Nov;13(11):1734-1741. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.007. Epub 2020 Aug 2. PMID: 32753311.