



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

ISABELA MAZARIN BERNARDI

**EXTRATO DE SALVIA OFFICINALIS L., EXISTE AÇÃO ANTIBIOFILME
SOBRE OS PATÓGENOS NOSOCOMIAIS: ACINETOBACTER
BAUMANNII E PSEUDOMONAS AERUGINOSA?**

2022

ISABELA MAZARIN BERNARDI

**EXTRATO DE SALVIA OFFICINALIS L., EXISTE AÇÃO ANTIBIOFILME
SOBRE OS PATÓGENOS NOSOCOMIAIS: ACINETOBACTER BAUMANNII E
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).

Bernardi, Isabela Mazarin

Extrato de *Salvia officinalis* L., existe ação antibiofilme sobre os patógenos nosocomiais: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*? / Isabela Mazarin Bernardi. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

34 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: Thais Cristine Pereira

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Antibacterianos. 3. Medicamentos fitoterápicos. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *Salvia officinalis* L. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Pereira, Thais 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

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Prof. Assoc. Marcelo Fava de Moraes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Odontologia Social e Clínica Infantil

São José dos Campos, 06 de julho de 2022.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria José Mazarin Bernardi e José Edson Torteli Bernardi, pelo constante apoio aos meus estudos e pelo privilégio de me proporcionarem uma formação acadêmica de excelência, fazendo tudo isso possível. Sou grata por ter dentro de casa vocês dois como exemplo de persistência, dedicação e honestidade.

Ao irmão mais velho, Eduardo Mazarin Bernardi, pelas instruções e atalhos ao trilhar o caminho de todo tipo de aprendizado da vida, sempre de forma leve e otimista.

Ao meu namorado, Murilo Shoji de Souza Kasai, pelo carinho, paciência e por todas as formas de incentivo, atenuando todos os obstáculos e tornando minha caminhada mais suave.

A toda minha família, em especial ao meus sogros e cunhado, Sandra Aparecida de Souza Kasai, Carlos Mitsuo Kasai e Matheus Mitsuo de Souza Kasai, por me disporem de muito amor, acolhimento e alegria nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Luciane Dias de Oliveira, pela disponibilidade e confiança de aceitar o desafio de ser minha orientadora e me guiado por meio de seus ensinamentos. Suas orientações e aulas impecáveis revolucionaram minha forma de estudar de maneira singular, o que irei levar para vida toda.

Um agradecimento especial à minha coorientadora Thaís Cristine Pereira, pela prontidão em me ajudar todas as horas, sempre com muita paciência e com um sorriso no rosto. Suas instruções serviram de bússola para nortear-me ao aprendizado da forma mais didática possível.

A todo corpo docente e demais funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia- ICT UNESP pela colaboração para minha formação profissional, em especial a técnica Josiana Carneiro, por alegrar meus dias, por todo o auxílio dado e também por compartilhar seus conhecimentos com tanto amor.

À equipe da Biblioteca pela ajuda no decorrer da elaboração deste trabalho, em especial ao amigo Rafael Lopes, por sempre esclarecer minhas dúvidas com tanto ânimo, facilidade e prontidão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa, através do processo nº2021/01464-7, no período de 01/02/2022 a 31/07/2022.

"Se eu fui capaz de ver mais longe, foi por estar apoiado sobre ombros de gigantes".

Isaac Newton.

RESUMO

Bernardi IM. Extrato de *Salvia officinalis* L., existe ação antibiofilme sobre os patógenos nosocomiais: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*? [Trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Objetivo: Avaliar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. sobre culturas planctônicas e sobre biofilmes monotípicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Material e Métodos:** Foi realizado o teste de microdiluição em caldo seguindo protocolo CLSI M7-A6 para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Microbicida Mínima (CMM). Posteriormente, a ação antibiofilme do extrato foi analisada utilizando concentrações pré-determinadas pelo ensaio de microdiluição, pelo tempo de contato de 5 min e 24 h, a viabilidade do biofilme foi mensurada pelo teste colorimétrico de MTT. Os dados foram analisados pelo software Graphpad Prism 5.0, método ANOVA complementado pelo teste *Tukey* com 5% de significância. **Resultados:** O extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* L., nas concentrações analisadas, apresentou ação antimicrobiana para as cepas 566006, H557, 86005 e ATCC de *A. baumannii*, e Pa 4 e ATCC de *P. aeruginosa*. Para as cepas (Pa 1 e Pa 2) de *P. aeruginosa* não foram encontradas CMM. Em relação à ação antibiofilme, o extrato reduziu em 45,2% e 62,7% a viabilidade do biofilme, após 5 min de contato, das cepas padrão de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Quando tratado por 24 h, as reduções chegaram a 72% e 63,8% para *A. baumannii* (86005) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), respectivamente. **Conclusão:** O extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* L. possui ação bactericida e antibiofilme frente às cepas multirresistentes e padrão de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, podendo ser uma opção para o tratamento de infecções causadas por estes patógenos.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; Antibacterianos; Medicamentos fitoterápicos; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salvia officinalis* L.

ABSTRACT

Bernardi IM. Extract of Salvia officinalis L., is there antibiofilm action on nosocomial pathogen: Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa? [Graduation final work]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

Objective: To evaluate the antimicrobial action of the hydroalcoholic extract of Salvia officinalis L. on planktonic cultures and on monotypic biofilms of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. **Material and Methods:** The broth microdilution test was performed following the CLSI M7-A6 protocol to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Microbicidal Concentration (MMC). Subsequently, the antibiofilm action of the extract was analyzed using concentrations predetermined by the microdilution assay, for a contact time of 5 min and 24 h, the biofilm viability was measured by the MTT colorimetric test. Data were analyzed using Graphpad Prism 5.0 software, ANOVA method complemented by Tukey test with 5% significance. **Results:** The hydroalcoholic extract of S. officinalis L., at the concentrations analyzed, showed antimicrobial action against strains 566006, H557, 86005 and ATCC of A. baumannii, and Pa 4 and ATCC of P. aeruginosa. For the strains (Pa 1 and Pa 2) of P. aeruginosa, no MMCs were found. Regarding the antibiofilm action, the extract reduced by 45.2% and 62.7% the biofilm viability, after 5 min of contact, of the standard strains of A. baumannii and P. aeruginosa, respectively. When treated for 24 h, the reductions reached 72% and 63.8% for A. baumannii (86005) and P. aeruginosa (ATCC 15442), in that order. **Conclusion:** The hydroalcoholic extract of S. officinalis L. has antimicrobial and antibiofilm action against multiresistant and standard strains of A. baumannii and P. aeruginosa, and may be an option for the treatment of infections caused by these pathogens.

Keywords: Acinetobacter baumannii; Antibacterials; Herbal medicines; Pseudomonas aeruginosa; Salvia officinalis L.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 Extrato vegetal.....	12
2.2 Bactérias	12
2.3 Determinação da ação antimicrobiana	13
2.3.1 Preparo do inóculo.....	13
2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbica mínima (CMM).....	14
2.3.2 Avaliação dos extratos sobre biofilmes monotípicos	15
2.3.2.1 Formação do biofilme e tratamento com o extrato.....	15
2.3.2.2 Avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT.....	16
2.3.3 Análise estatística	17
3 RESULTADOS.....	17
3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbica mínima (CMM).....	17
3.2 Atividade antibiofilme do extrato de <i>S. officinalis</i> L.	18
3.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	18
3.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	22
4 DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

As bactérias Gram-negativas são um desafio para a ciência, esses micro-organismos possuem muitos mecanismos de resistência que incluem efluxo de fármacos, alteração da permeabilidade da membrana e do sítio de ligação do fármaco e degradação de enzimas [1]. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estimam que bactérias multirresistentes causam 23.000 mortes a cada ano e boa parte dessas infecções são ocasionadas por bactérias Gram-negativas [2].

Dentre as bactérias Gram-negativas, *Acinetobacter baumannii* é um patógeno oportunista conhecido por causar infecções em pacientes imunocomprometidos e por apresentar uma crescente resistência aos antibióticos, inclusive aos carbapenêmicos [3]. Esse patógeno causa diferentes tipos de infecções, como septicemias, infecções do trato urinário, meningites pós-neurocirúrgicas e a infecção mais frequente é a pneumonia [4,5]. *A. baumannii* foi responsável por 60.000 casos de infecções resistentes e quase 40.000 mortes em hospitais da Tailândia [6], infecções por *A. baumannii* são associadas a baixa disponibilidade de opções terapêuticas e à desinfecção ineficiente de dispositivos hospitalares em conjunto com o descuido de medidas de proteção individual, que levam a uma infecção cruzada [7].

Além de *Acinetobacter baumannii*, outra bactéria de importância médica é *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo aeróbio Gram-negativo oportunista pertencente à família Pseudomonadaceae que apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos que ocorre devido à baixa permeabilidade da membrana externa, efluxo de antibióticos para fora da célula e a síntese de enzimas que inativam os antibióticos, além de apresentar resistência pela formação de biofilmes e troca de material genético [8]. *P. aeruginosa* se adapta facilmente às condições ambientais de temperatura, umidade e nutrição, sendo mais favorecida em ambientes úmidos [9], o que torna esse patógeno comum em ambientes hospitalares, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI), estando responsável, a cada ano, por 13-19% das infecções nosocomiais nos EUA [10]. Ademais, é o segundo patógeno mais comum em pneumonia adquirida em hospitais [11], está associado ao aumento da mortalidade e morbidade de pacientes com infecções da corrente sanguínea [12], além de causar

infecções de pele e dos tecidos moles [13].

A. baumannii e *P. aeruginosa* pertencem ao grupo ESKAPE criado em 2008, o qual é composto por seis bactérias importantes no contexto de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e que apresentam a capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, favorecendo a seleção de cepas multirresistentes [14,15], sendo um dos mecanismos de resistência apresentado por esses patógenos a formação de biofilme [16]. Biofilme é uma comunidade estruturada de micro-organismos com uma matriz extracelular polimérica aderida a uma superfície inerte ou viva. Os biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos, desta forma, as concentrações de fármacos podem ser até quatro vezes maiores do que as bactérias que não possuem essa capacidade [17]. Essa resistência se dá pela dificuldade de penetração de agentes antimicrobianos na matriz extracelular, taxa de crescimento microbiano acelerada e mudanças fisiológicas devido ao crescimento do biofilme [18]. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* têm alta capacidade de formação de biofilme, o que pode explicar sua resistência a antibióticos, propriedades de sobrevivência e virulência [19].

Essas cepas multirresistentes (MDR) podem estar presentes em indivíduos com doenças periodontais, sendo frequentemente detectadas em biofilmes subgengivais e saliva [20]. Além da presença desses micro-organismos na cavidade bucal de pacientes periodontite, estes também se encontram em pacientes internados em UTIs que fazem uso de ventilação mecânica, portanto, a presença desses patógenos dificulta o esquema terapêutico e é um problema para a comunidade médica [21].

A pandemia COVID-19 já infectou e levou milhões de vidas em todo o mundo, sendo na maioria dos casos correlacionados com às coinfeções bacterianas e infecções secundárias do que pela própria infecção viral, onde os patógenos ESKAPE têm um papel crucial para tornar esta doença fatal à medida que os pacientes ficam mais tempo na UTI, estando estes susceptíveis ao uso de dispositivos invasivos, como ventiladores e acesso venoso central [22-24]. *Acinetobacter baumannii* é um dos três patógenos bacterianos mais prevalentes que causam coinfeções em pacientes com COVID-19, e também se observa que eles formam infecções mistas frequentemente com *Klebsiella pneumoniae*, enquanto que *Pseudomonas aeruginosa* correspondem a um dos principais membros causadores representando 16% das coinfeções

bacterianas em Nova York [25,26].

O crescente aumento da resistência desses microrganismos tem limitado o tratamento de diversas infecções, contribuindo para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados, além de aumentar o tempo de internação e conseqüentemente o custo do tratamento, culminando em um sério problema de saúde pública [27]. Diante do número limitado de antimicrobianos efetivos contra esses patógenos, a Organização Mundial da Saúde classificou *A. baumannii* e *P. aeruginosa* como prioritários na busca por novos fármacos (World Health Organization 2017) [28]. Os fitoterápicos têm sido utilizados como tratamento alternativo no combate de infecções e na odontologia o uso de plantas medicinais para o tratamento de infecções tem ganhado notoriedade [29].

Dentre as plantas medicinais, a *Salvia officinalis* L., uma gramínea pertencente à família das Lamiaceas, merece destaque por apresentar diversos efeitos terapêuticos. Na medicina popular é utilizada no tratamento de inflamações, diarreia, paralisia, reumatismo, além de apresentar efeito anticâncer, antimutagênicos, antinociceptivos, antimicrobianos, antioxidantes, hipoglicêmicos e hipolipemiantes comprovados por estudos anteriores [30,31]. *S. officinalis* L. é popularmente conhecida como “Planta da Salvação”, que deriva do latim “salvarem”, que significa salvar ou curar. Os efeitos terapêuticos dessa planta são atribuídos aos diversos ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos [32].

A atividade antimicrobiana de *S. officinalis* L. foi avaliada anteriormente sobre algumas bactérias de importância clínica como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, demonstrando efeito bactericida ou bacteriostático sobre esses micro-organismos [33-36]. Além dos efeitos antimicrobianos relatados, *S. officinalis* L. não apresentou citotoxicidade (concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/mL) sobre linhagem de macrófagos murinos (RAW 264,7) [37]. Diante desses resultados promissores, torna-se relevante avaliar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. sobre culturas planctônicas e sobre biofilmes monotípicos de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, a fim de investigar uma possível alternativa terapêutica para pacientes com a presença desses patógenos multirresistentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extrato vegetal

O extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* L. foi adquirido comercialmente (Apis Flora, SP) e o mesmo foi obtido a partir das folhas e talos da planta, na concentração 3,5% (35 mg/mL).

2.2 Bactérias

Foram utilizadas três cepas multirresistentes e uma cepa padrão (ATCC-*American Type Culture Collection*) de *A. baumannii* (566006; H557; 86005 e ATCC 196006) e *P. aeruginosa* (Pa 1; Pa 2; Pa 4 e ATCC 15442), totalizando 8 cepas, provenientes do Laboratório Bioclin do grupo Policlín (São José dos Campos- SP) e Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT-UNESP. Os perfis de resistência das cepas clínicas aos antibióticos estão demonstrados nos quadros 1 e 2.

Quadro 1- Perfil de resistência das cepas clínicas de *A. baumannii* aos antibióticos

Antibióticos	Cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>		
	H557	566006	86005
Ertapenem	R	R	R
Imipenem	R	R	R
Meropenem	R	R	R

Legenda: R= Resistente.

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

Quadro 2- Perfil de resistência das cepas clínicas de *P. aeruginosa* aos antibióticos

Antibióticos	Cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>		
	Pa 1	Pa 2	Pa 4
Amicacina	S	S	R
Cefepime	I	I	R
Ceftazidima	I	I	R
Ciprofloxacina	I	I	R
Colistina	-	-	-
Imipenem	I	I	R
Levofloxacina	I	I	R
Meropenem	S	S	R
Piperacilina + Tazobactam	I	I	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).

2.3 Determinação da ação antimicrobiana

2.3.1 Preparo do inóculo

Os micro-organismos foram descongelados e semeados em ágar, *Brain Heart*

Infusion (BHI- Himédia). Em seguida, foram incubados por 24 h em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C. Após esse período, com auxílio da alça bacteriológica, foram inoculadas colônias em tubos contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e diluídas. Posteriormente, os micro-organismos foram padronizados em espectrofotômetro (Biotek) na concentração de 10^6 células/mL, de acordo com as recomendações para testes de microdiluição em caldo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A9.

2.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM)

Para analisar a ação antimicrobiana do extrato, foram utilizadas microplacas de 96 poços (Figura 1). Para isso, a primeira fileira da placa (1) foi reservada para o controle de esterilidade, onde foi colocado 200 μ L apenas do meio de cultura (caldo de *Mueller Hinton*), com o objetivo de verificar a esterilidade do meio utilizado, foi também utilizado o controle somente do veículo (hidroalcoólico) para descartar possível ação antimicrobiana do mesmo. Já a última fileira da placa (12) foi destinada para o controle negativo, onde colocou-se 100 μ L do meio de cultura e também 100 μ L do micro-organismo, com o objetivo de certificar as condições da bactéria para o estudo. Ademais, preparou-se a diluição do extrato inserindo 100 μ L de meio de cultura e 100 μ L do extrato na concentração de 35 mg/mL apenas na segunda fileira (2) de poços da microplaca, de onde partiram uma série de 10 diluições (quadro 3). Depois que os extratos foram diluídos, acrescentou-se 100 μ L dos inóculos padronizados (10^6 células/mL) em todos os poços das placas de microdiluição, exceto no controle de esterilidade. A concentração do extrato de *S. officinalis* L. em cada poço está demonstrada no quadro 3. Por fim, as placas de 96 poços foram armazenadas na estufa bacteriológica por 24 h a 37°C. Todos os testes foram realizados em duplicada. Após 24 h, foi determinada a CIM, ou seja, o poço que não apresentou turbidez por meio de leitura visual.

Para definir a concentração capaz de promover a morte dos micro-organismos (CMM), 5 μ L de cada um dos poços da placa de microdiluição foram semeados em

placas de Petri contendo ágar BHI (Figura 1). As placas foram incubadas na estufa por 48 h a 37°C e posteriormente foi analisado o crescimento ou ausência de colônias, e a CMM do extrato para cada micro-organismo foi identificada.

Quadro 3- Concentração do extrato de *Salvia officinalis* L. em cada poço da placa de microdiluição.

Poços	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Extrato (mg/mL)	8,75	4,37	2,18	1,09	0,54	0,27	0,13	0,06	0,03	0,01

Fonte: elaborado pela autora.

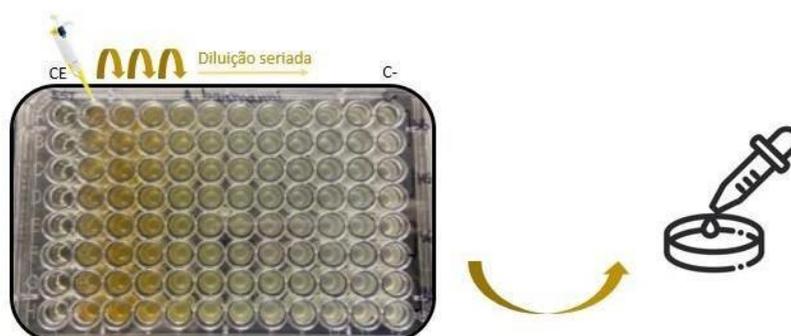


Figura 1- Teste de microdiluição em caldo usando a placa de 96 poços, onde diluições seriadas do extrato de *S. officinalis* L. foram realizadas e posteriormente a inoculação dos micro-organismos. Após incubação, foi realizado o teste de CMM, onde as amostras foram semeadas em ágar BHI para observar o crescimento ou não de colônias.

Fonte: elaborado pela autora.

2.3.3 Avaliação dos extratos sobre biofilmes monotípicos

2.3.3.1 Formação do biofilme e tratamento com o extrato

Para a formação dos biofilmes monotípicos, foram acrescentados 100 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI- HiMedia®, Mumbai, Índia) em todos os poços das placas de 96 poços e 100 µL de suspensão microbiana padronizada (10^7 células/mL) em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). As microplacas ficaram incubadas por 48 h em estufa a 37°C, sendo o meio de cultura trocado após 24 h. Após esse período, retirou-se o meio de cultura e os biofilmes foram colocados em contato com o extrato por 5 min e 24 h nas concentrações microbicidas pré-determinadas (CMM, 2 x CMM e 4 x CMM), sendo que para todos os tratamentos foi utilizado o volume de 100 µL/poço. Como controle positivo, foi utilizada clorexidina 0,12% (tratamento de 5 min) e 0,6% (tratamento 24 h), e micro-organismo em caldo BHI como controle negativo. Após o tratamento com o extrato, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%).

2.3.3.2 Avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT

A avaliação da redução da viabilidade do biofilme foi verificada pelo teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma Aldrich Co.®, Alemanha). Para isso, o MTT foi diluído em caldo BHI (0,5 mg/mL) e foram adicionados 100 µL da solução em cada poço e as microplacas foram incubadas por 1 h ao abrigo da luz a 37°C. Após a incubação, a solução de MTT foi retirada e 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO) foi inserido em cada poço (Figura 2). As placas então ficaram incubada ao abrigo da luz por 10 min em mesa agitadora e 10 min em estufa a 37°C, para que a solução possa colorir as células viáveis após o tratamento. Em seguida, foi realizada a leitura da placa com o auxílio o espectrofotômetro à 570 nm e as densidades ópticas obtidas foram convertidas em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo por meio da fórmula abaixo:

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

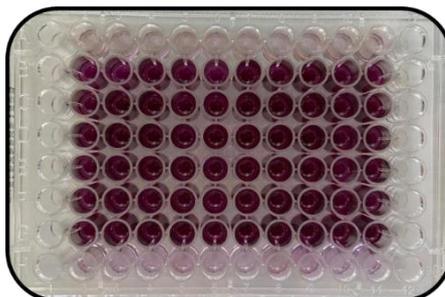


Figura 2- Biofilmes tratados e em contato com solução de MTT para mensurar a atividade metabólica dos micro-organismos.

Fonte: elaborado pela autora.

2.3.4 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo software Graphpad Prism 5.0 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)

Durante o ensaio de microdiluição não foi possível determinar a CIM devido a turbidez do extrato, portanto, nesse estudo, o valor da CMM será considerado para os ensaios de biofilme.

O extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. possui atividade antimicrobiana sobre cultura planctônica para todas as cepas analisadas, exceto para as cepas Pa 1 e Pa 2 de *P. aeruginosa*, onde não houve concentração microbicida (Figura 3). Os valores de CMM das cepas estão demonstrados na Tabela I.

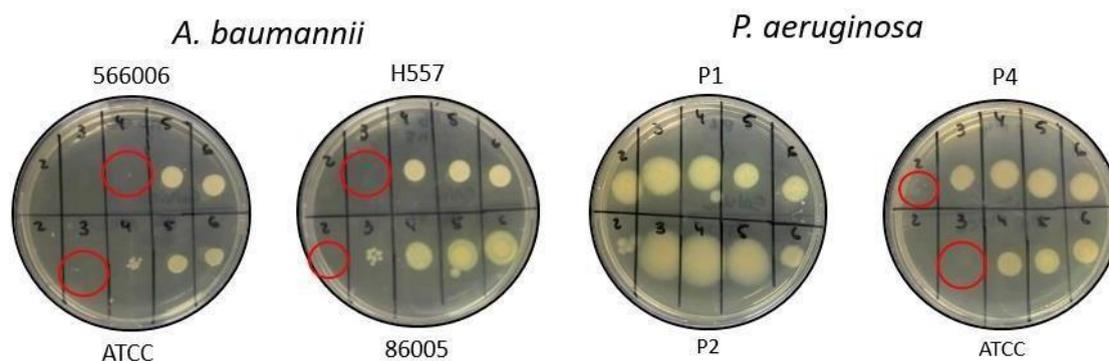


Figura 3- Determinação da CMM utilizando alíquotas semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI. Os círculos vermelhos indicam a CMM de cada cepa.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela I- CMM do extrato de *S. officinalis* L. para as 4 cepas de *Acinetobacter baumannii* e para as 4 cepas *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente

Extrato (mg/ml)	<i>A. baumannii</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
	566006	86005	H557	ATCC	Pa 1	Pa 2	Pa 4	ATCC
	2,18	8,75	4,37	4,37	X	X	8,75	4,37

Fonte: elaborado pela autora.

3.2 Atividade antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L.

3.2.1 *Acinetobacter baumannii*

Analisando o extrato de *S. officinalis* L. na concentração de 2,1 mg/mL, observa-se a redução de 4,2% do biofilme da cepa 566006 após tratamento de 5 min, não apresentando diferença estatística com o controle. A aplicação por 24 h da mesma concentração promoveu redução de 10,3% do biofilme, porém também não foi

significativa. Já na concentração de 4,3 mg/mL, houve aumento de 24% do biofilme após 5 min e redução do mesmo em 18,6% após 24 h. Por fim, na concentração de 8,7 mg/mL houve aumento de 5,9% do biofilme após 5 min, porém, após 24 h de tratamento houve redução significativa de 49,3%, o que expressa uma ação semelhante à da clorexidina (Figuras 4A e 4B).

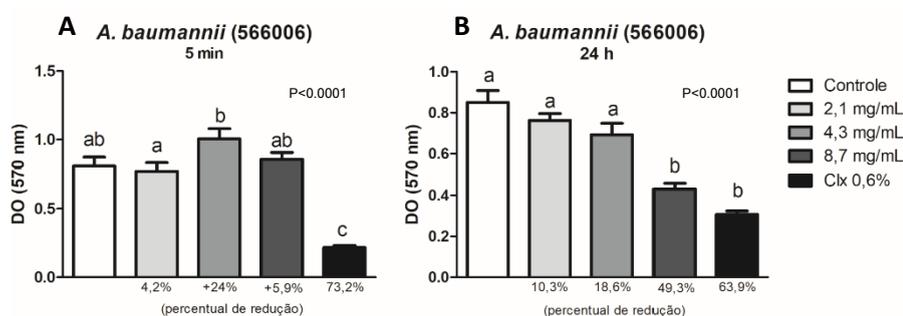


Figura 4- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa clínica 566006 de *A. baumannii* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b”, “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: elaborado pela autora.

O extrato de *S. officinalis* L. na concentração de 4,3 mg/mL promoveu o crescimento bacteriano em 8,3% da cepa ATCC após tratamento de 5 min. No entanto, a aplicação por 24 h da mesma concentração do extrato promoveu redução de 45,3% do biofilme, demonstrando diferença estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Já na concentração de 8,7 mg/mL, houve diminuição de 13,9% do biofilme após 5 min e redução significativa do mesmo em 69,5% após 24 h, apresentando uma diferença estatística com o controle e semelhança estatística com o grupo tratado com clorexidina 0,6%. Por fim, na concentração de 17,5 mg/mL houve redução significativa de 45,2% da viabilidade do biofilme após 5 min, sendo a única concentração capaz de produzir diferença estatística neste tempo. Já após 24 h ela teve uma redução significativa de 65,6% da viabilidade do biofilme (Figuras 5A e 5B).

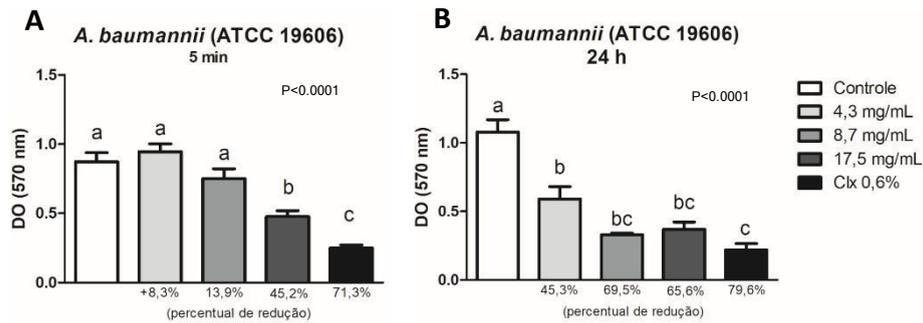


Figura 5- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa ATCC de *A. baumannii* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b”, “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: elaborado pela autora.

A concentração de 4,3 mg/mL extrato de *S. officinalis* L. promoveu o crescimento bacteriano em 2,4% da cepa H557 após tratamento de 5 min e aumentou o crescimento para 13% com 24 h de contato com o extrato. O mesmo foi observado na concentração de 8,7 mg/mL, onde houve aumento de 2,1% do biofilme após 5 min, porém, em 24 h houve redução do mesmo em 30%, sem diferença estatística em relação ao controle. Por fim, a concentração de 17,5 mg/mL foi capaz de reduzir em 36,8% e 47,5% a viabilidade do biofilme quando tratado pelo tempo de 5 min e 24 h, respectivamente (Figuras 6A e 6B).

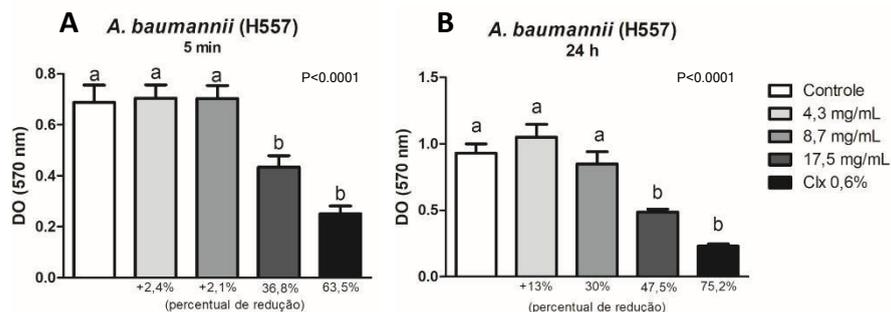


Figura 6- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa H557 de *A. baumannii* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a” e “b” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: elaborado pela autora.

O extrato de *S. officinalis* L. na concentração de 8,7 mg/mL promoveu redução bacteriana em 4,4% da cepa 86005 após tratamento de 5 min. Já na concentração de 17,5 mg/mL, ainda por 5 min, houve redução significativa de 34,8% da viabilidade do biofilme. Por fim, na concentração pura de 35 mg/mL houve redução significativa de 28,9% do biofilme após tratamento de 5 min, estatisticamente semelhante ao grupo tratado com 17,5 mg/mL (Figura 7A).

É importante ressaltar que para a avaliação do biofilme no intervalo de 24 h não foi usada a concentração pura de 35 mg/mL do extrato, pois a mesma causaria morte das bactérias pela falta de meio de cultura para semeá-las, sendo então necessário a diluição do extrato com o meio de cultura, acarretando na diminuição de sua concentração. Assim, a aplicação por 24 h do extrato na concentração de 4,3 mg/mL, resultou em redução significativa de 40% da viabilidade do biofilme, indicando diferença estatística comparada ao grupo controle. Já a concentração de 8,7 mg/mL, neste mesmo período de 24 h, resultou em redução significativa de 72% do biofilme. Por fim, a concentração de 17,5 mg/mL promoveu redução de 63,9% do biofilme, tendo também uma ação estatisticamente semelhante à concentração de 17,5 mg/mL ao grupo tratado com clorexidina 0,6% (Figura 7B).

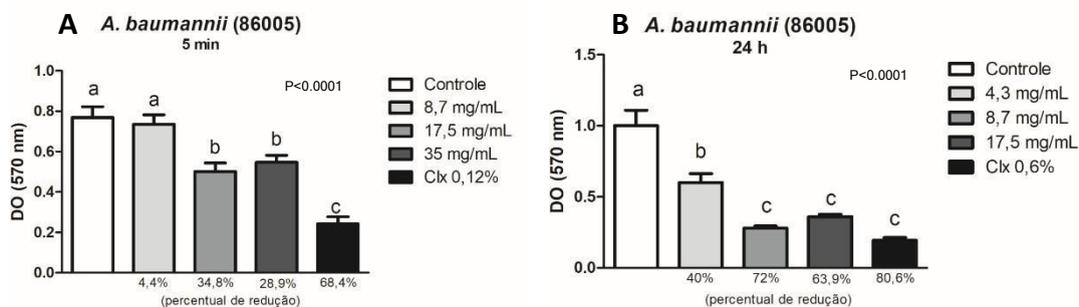


Figura 7- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa 86005 de *A. baumannii* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: elaborado pela autora.

3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Analisando o extrato de *Salvia officinalis* L. sobre a cepa Pa 1 na concentração de 8,7 mg/mL, notou-se aumento do biofilme em 3,7% após tratamento de 5 min. No entanto, a aplicação do extrato na concentração de 17,5 mg/mL, após os mesmos 5 min, resultou em redução de 34,7% do biofilme, demonstrando diferença estatística em relação ao grupo controle semelhança estatística com o grupo tratado com clorexidina. Por fim, na concentração pura de 35 mg/mL, houve diminuição significativa de 23,8% do biofilme após 5 min (Figura 8A).

O extrato na concentração de 4,3 mg/mL em contato com o biofilme por 24 h, levou a uma redução significativa de 40,4%. Já a concentração de 8,7 mg/mL neste mesmo intervalo de tempo resultou em diminuição de 34,1% do biofilme. Contudo, a concentração de 17,5 mg/mL no período de 24 h devido concentração do extrato, tempo de contato e fisiologia da cepa, não foi possível mensurar a redução da viabilidade do biofilme pois o extrato aderiu ao fundo da placa e impossibilitou a leitura por MTT (Figura 8B).

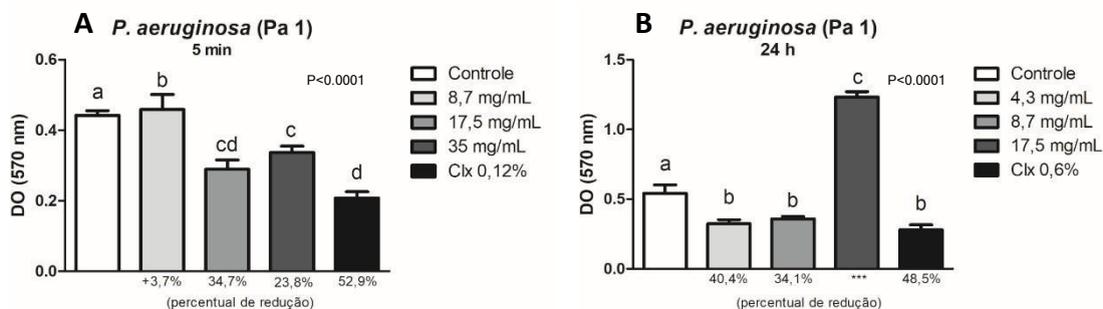


Figura 8- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa Pa 1 de *Pseudomonas aeruginosa* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b”, “c”, “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$). Os asteriscos (***) demonstram a impossibilidade da leitura pelo MTT devido a aderência do extrato ao fundo da placa.

Fonte: elaborado pela autora.

Para a cepa Pa 2, o extrato de *S. officinalis* L. na concentração de 8,7 mg/mL,

promoveu redução significativa do biofilme em 35,6% após tratamento de 5 min, quando comparado ao grupo controle. Já na concentração de 17,5 mg/mL, neste mesmo tempo, a redução foi de 33,2%, sendo estatisticamente semelhante ao resultado obtido com a concentração de 8,7 mg/mL. Por fim, a concentração de 35 mg/mL do extrato por 5 min resultou em uma redução do biofilme de 32,6% e o grupo tratado com clorexidina (0,12%) apresentou redução significativa de 62,9% (Figura 9A).

Analisando o tratamento do biofilme sob 24 h, houve redução de 42,9% quando tratado com 4,3 mg/mL do extrato e a concentração de 8,7 mg/mL diminuiu 23,4% do biofilme após 24 h. Por outro lado, a concentração de 17,5 mg/mL após 24 h de tratamento, também resultou em aderência do extrato ao fundo da placa não sendo possível, portanto, mensurar a redução da viabilidade do biofilme por meio do ensaio colorimétrico MTT (Figura 9B).

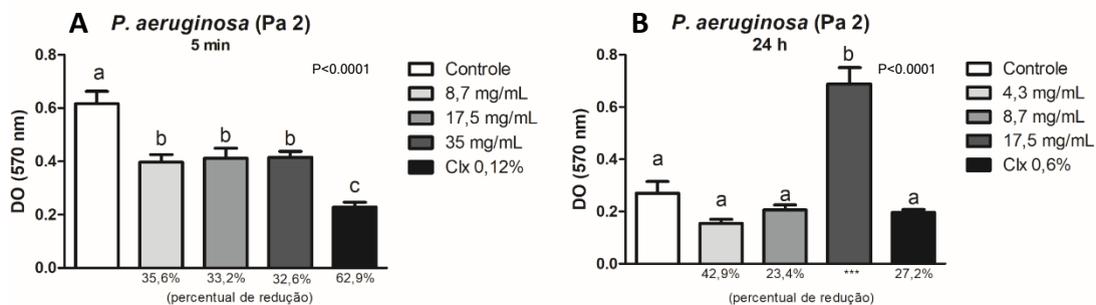


Figura 9- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa Pa 2 de *Pseudomonas aeruginosa* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b”, “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$). Os asteriscos (***) demonstram a impossibilidade da leitura pelo MTT devido a aderência do extrato ao fundo da placa.

Fonte: elaborado pela autora.

Em análise da cepa Pa 4 sob tratamento de 5 min com o extrato de *S. officinalis* L. na concentração de 8,7 mg/mL, nota-se diminuição significativa do biofilme em 50,7%, quando comparado ao grupo controle, e apresentou semelhança estatística com o grupo tratado com clorexidina (0,12%). Já na concentração de 17,5 mg/mL, a redução foi de 53,8% após 5 min de contato, traduzindo em semelhança

estatística com a concentração de 8,7 mg/mL e com o grupo tratado com clorexidina. Por fim, ao analisar a concentração de 35 mg/mL do extrato pelo mesmo período de tempo, observa-se uma redução significativa de 47,2% (Figura 10A).

Ao analisar o tratamento sob 24 h em uma concentração de 4,3 mg/mL nota-se redução do biofilme de 26,5%, demonstrando semelhança estatística com o grupo controle. Contudo, ao utilizar neste mesmo tempo a concentração de 8,7 mg/mL, verifica-se diminuição significativa do biofilme em 56,5%, traduzindo em diferença estatística com o grupo controle e semelhança estatística com o grupo que utilizou clorexidina 0,6%. Por outro lado, após 24 h de tratamento, a concentração de 17,5 mg/mL reduziu a viabilidade do biofilme em 54,7%, sendo comparável estatisticamente com os resultados obtidos com o grupo que utilizou concentração a clorexidina (0,6%) (Figura 10B).

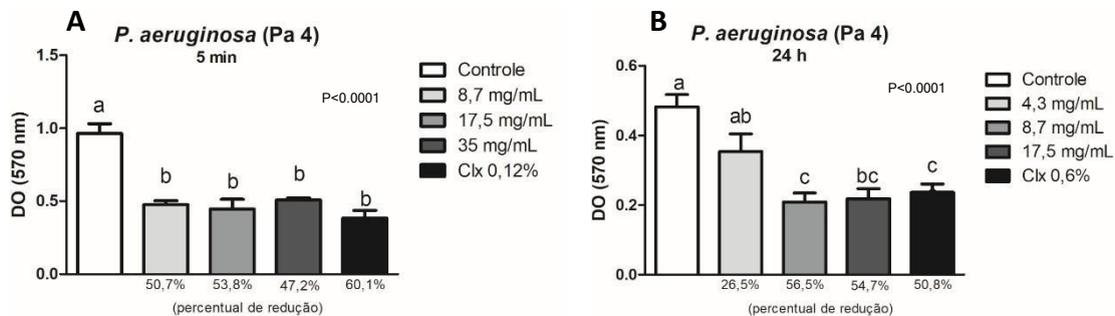


Figura 10- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa Pa 4 de *Pseudomonas aeruginosa* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: elaborado pela autora.

Ao analisar a cepa ATCC 15442, observa-se que o extrato de *S. officinalis* L. na concentração de 4,3 mg/mL, promoveu redução do biofilme em apenas 13,8% após tratamento de 5 min., porém, sob 24 h de tratamento, houve uma notável redução de 44,1% do biofilme, traduzindo em diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Já sob o tratamento de 5 min na concentração maior de 8,7 mg/mL, verifica-se redução significativa de 47,9% do biofilme, apresentando semelhança estatística

com o grupo da clorexidina (0,12%) (Figura 11A). Essa mesma concentração sob tratamento de 24 h resultou em diminuição de 63,8% do biofilme, também semelhante ao grupo tratado com clorexidina (0,6%). Por fim, a concentração de 17,5% no tratamento de 5 min com *S. officinalis* L. reduziu significativamente em 62,7% a viabilidade do biofilme, semelhante ao grupo tratado com clorexidina. Analisando essa mesma concentração no tratamento de 24 h, houve redução significativa de biofilme em 48,8%, também apresentando resultado semelhante à clorexidina (Figura 11B).

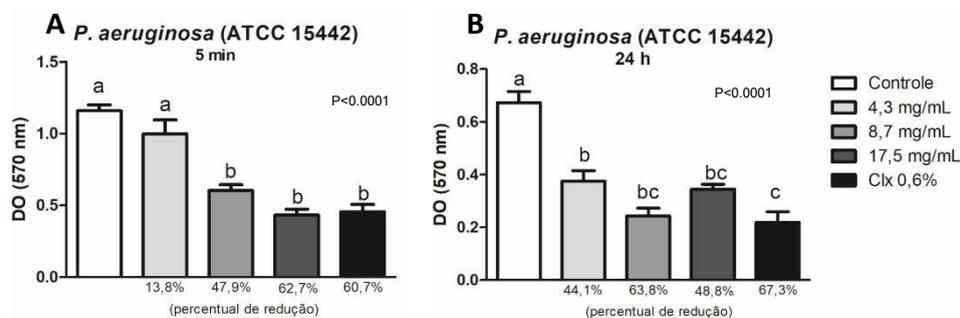


Figura 11- Ação antibiofilme do extrato de *S. officinalis* L. sobre a cepa ATCC 15442 de *Pseudomonas aeruginosa* por 5 min [A] e 24 h [B]. As letras “a”, “b”, “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05\%$).

Fonte: elaborado pela autora.

4 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana crescente frente aos fármacos já existentes e o surgimento de novas doenças mais agressivas é uma problemática em nível mundial [38]. Estudo de plantas medicinais com atividade antibacteriana já produziram grandes resultados para a saúde humana, e, dessa forma, fica claro a necessidade de fazer mais buscas por fitoterápicos que tenham ação antimicrobiana para resolver essa questão [39,40]. No presente estudo, os resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* L. apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme contra cepas clínicas multirresistentes e cepas padrão de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, atuando em algumas análises de forma semelhante à clorexidina, a qual é

considerada “padrão ouro” visando a eliminação de bactérias orais.

Dados promissores foram observados em um estudo realizado por Mendes et al. (2020), no qual utilizou compostos purificados do extrato de *S. officinalis* L. para o controle *in vitro* de periodontopatógenos, como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, os quais tiveram ação moderada sobre estes [41]. Além disso, utilizaram metodologia similar à realizada em nosso estudo, constando testes antimicrobianos de determinação da CIM, CMM e determinação da atividade antibiofilme. Tal resultado evidencia o potencial efeito antimicrobiano de extratos naturais, solidificando este presente estudo, no qual o extrato de *S. officinalis* L. teve ação antimicrobiana e reduziu a viabilidade do biofilme de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* após 5 min e 24 h de contato.

Beheshti-Rouy et al. (2015) testaram um enxaguatório bucal com extrato de *S. officinalis* L. contra *Streptococcus mutans* na placa dentária. Os resultados obtidos demonstraram que o bochecho de sálvia reduziu significativamente a contagem de colônias dessas bactérias ($P= 0,001$), já que o número médio de colônias no grupo teste foi de 3900 por amostra de placa na linha de base e 300 após aplicação de bochechos [42]. Em nosso estudo, extrato de *S. officinalis* L. reduziu em 45,2% e 62,7% a viabilidade do biofilme, após 5 min de contato, das cepas padrão de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Quando tratado por 24 h, as reduções chegaram a 72% e 63,8% para *A. baumannii* (86005) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), nessa ordem.

Baseado na importância de se encontrar novos fármacos contra cepas bacterianas multirresistentes, Saviuc et al. (2016) buscaram analisar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e eucaliptol contra cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Seus estudos revelaram que esses compostos apresentaram efeitos antimicrobianos contra as cepas estudadas, além de uma atividade sinérgica com cirpofloxacino [43]. Levando o relato em consideração e a escassez de pesquisas envolvendo a ação do extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* L. contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, fundamenta nosso estudo a fim de verificar a capacidade antimicrobiana de diferentes extratos e óleos frente às cepas resistentes aos antibióticos convencionais.

A capacidade dos extratos vegetais de agir sinergicamente com antibióticos abre espaço para o surgimento de uma nova abordagem para tratamento dos casos

de resistência bacteriana. Diante deste cenário, o estudo de Stefanovic et al (2012) avaliou a atividade antibacteriana sinérgica de *S. officinalis* L. e extratos de *Cichorium intybus* com antibióticos comumente usados (cloranfenicol e amoxicilina) contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e isolados clínicos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Foi verificado que o extrato mais ativo foi o de *S. officinalis* com os valores de CIM variando entre 0,0019 mg/mL e 1,25 mg/mL. Ademais, houve melhor capacidade sinérgica dos extratos de *S. officinalis* L. com amoxicilina, mostrando sinergia em 8 das 9 cepas analisadas quando foi utilizado seu extrato de acetona, reduzindo a concentração de antibiótico necessária para inibir o crescimento das bactérias [44]. Esse artigo confirma o atual estudo, pois os achados indicam o potencial antimicrobiano de *S. officinalis* L. contra *A. baumannii* e *P. aeruginosa* variando o valor de CIM entre 2,18 mg/mL e 8,75 mg/mL, assim, o extrato pode ser como uma alternativa para driblar a ocorrência da resistência aos antibióticos.

Devido a necessidade de elaboração de novos fármacos para controle de bactérias multirresistentes e diante dos resultados alcançados nesse estudo, os quais comprovam a ação antimicrobiana e antibiofilme sobre a maioria das cepas analisadas, é essencial o desenvolvimento de pesquisas complementares *in vivo* no intuito de definir os níveis terapêuticos e possível aplicação desse extrato. Dessa maneira, poderão surgir novas possibilidades terapêuticas que auxiliarão a resolução dessa problemática mundial, que impacta o sistema de saúde e principalmente os indivíduos imunocomprometidos. O extrato de *S. officinalis* L. mostrou ter ação antimicrobiana e antibiofilme para ambas as cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, podendo, portanto, ser opção terapêutica ou coadjuvante contra esses patógenos.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. apresenta ação bactericida para todas as cepas de *A. baumannii* variando a CMM de 2,18-8,75 mg/mL

e a ação antibiofilme nos dois tempos analisados (5 min e 24 h) em diferentes concentrações. Em relação a ação antimicrobiana frente *P. aeruginosa*, o extrato teve ação bactericida para a cepa clínica (Pa 4) e padrão (ATCC 15442) com CMM de 8,75 e 4,37 mg/mL, respectivamente, e apresentou redução da viabilidade do biofilme para todas cepas analisadas nos dois tempos de contato, exceto para a cepa clínica Pa 2 após tratamento de 24 h.

REFERÊNCIAS

- [1] Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015 Dec;5(1):61. doi: 10.1186/s13613-015-0061-0. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26261001; PMCID: PMC4531117.
- [2] Miller SI. Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. *MBio*. 2016;7(5). doi: 10.1128/mBio.01541-16
- [3] Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero M del R, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta de México*. 2020;156(2):172–80. doi: 10.24875/gmm.20005624
- [4] Oliveira Júnior JB, Araújo MADS, Silva DMW, Lins Neto MÁ de F, Maranhão FC de A. Multiple healthcare-associated infections in a patient with Crohn's disease: Case report. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*. 2016;6(2). doi: 10.17058/RECI.V6I2.6850
- [5] Scarcella AC, Scarcella AS, Beretta ALRZ. Infecção relacionada à assistência à saúde associada a *Acinetobacter baumannii*: revisão de literatura *Ver Bras Anal Clin*. 2017;49(1):18-21. doi: 10.21877/2448-3877.201600361
- [6] Phodha T, Riewpaiboon A, Malathum K, Coyte PC. Annual relative increased in inpatient mortality from antimicrobial resistant nosocomial infections in Thailand. *Epidemiology and Infection*. 2019;147:e133. doi: 10.1017/S0950268818003436
- [7] Freitas CG da S de, Staudt KJ, Khün KH, Alves IA, Meneghete MC. prevalência de microrganismos em bandejas utilizadas pela enfermagem na administração de medicamentos em ambiente hospitalar. *Ver Interdisciplin Cienc Saude e Biol*. 2019;3(2):24–34. doi: 10.31512/ricsb.v3i2.3199
- [8] Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019;37(1):177–92. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

- [9] Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes and Diseases*. 2019;6(2):109–19. doi: 10.1016/j.gendis.2019.04.001
- [10] Raman G, Avendano EE, Chan J, Merchant S, Puzniak L. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2018;7(1):1–14. doi: 10.1186/s13756-018-0370-9
- [11] Feng DY, Zhou YQ, Zou XL, Zhou M, Wu W bin, Chen XX, et al. Factors influencing mortality in hospital-acquired pneumonia caused by Gram-negative bacteria in China. *Journal of Infection and Public Health*. 2019;12(5):630–3. doi: 10.1016/j.jiph.2019.02.014
- [12] Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality associated with bloodstream infections caused by *pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(6):1–11. doi: 10.1128/AAC.02671-16
- [13] Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*. 2018;7:1–18. doi: 10.7573/dic.212527
- [14] El-Mahallawy HA, Hassan SS, El-Wakil M, Moneer MM. Bacteremia due to ESKAPE pathogens: An emerging problem in cancer patients. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2016;28(3):157–62. doi: 10.1016/j.jnci.2016.05.002
- [15] Marturano JE, Lowery TJ. ESKAPE pathogens in bloodstream infections are associated with higher cost and mortality but can be predicted using diagnoses upon admission. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019;6(12):1–8. doi: 10.1093/ofid/ofz503
- [16] Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522–54. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372

- [17] Dunne WM. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):155–66. doi: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002
- [18] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167–93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- [19] Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 2013;17(4):214–8. doi: 10.4103/0972-5229.118416
- [20] Souto R, Silva-Boghossian CM, Colombo APV. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(2):495–501. doi: 10.1590/S1517-83822014000200017
- [21] Bratić V, Mihaljević S, Verzak, Pleško E, Lukić A, Čačić M, et al. Prophylactic application of antibiotics selects extended-spectrum β -lactamase and carbapenemases producing Gram-negative bacteria in the oral cavity. *Letters in Applied Microbiology*. 2021;73(2):206–19. doi: 10.1111/LAM.13493
- [22] Poyil MM. Prevalence of coinfections with ESKAPE pathogens in COVID-19 patients: A review. *Annals of Phytomedicine: An International Journal*. 2021;10(Sp-Issue1 (COVID-19): S4-S12):188–94. doi: 10.21276/ap.covid19.2021.10.1.17
- [23] Halder A, Mukherjee DN, Seal S, Dasgupta H, Chakraborty M. A comparative study of Bacterial culture isolates, site of infections and drug resistance pattern between COVID and non COVID patients admitted in a tertiary care hospital: A Pilot study [internet]. medRxiv [preprint]. 2021. doi: 10.1101/2021.09.12.21263386
- [24] Langford BJ, So M, Leung V, Raybardhan S, Lo J, Kan T, et al. Predictors and microbiology of respiratory and bloodstream bacterial infection in patients with COVID-19: living rapid review update and meta-regression. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Apr;28(4):491-501. doi: 10.1016/j.cmi.2021.11.008

- [25] Fattorini L, Creti R, Palma C, Pantosti A; Unit of Antibiotic Resistance and Special Pathogens; Unit of Antibiotic Resistance and Special Pathogens of the Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome. Bacterial coinfections in COVID-19: an underestimated adversary. *Ann Ist Super Sanita*. 2020 Jul-Sep;56(3):359-364. doi: 10.4415/ANN_20_03_14. PMID: 32959802.
- [26] Rusic D, Vilovic M, Bukic J, Leskur D, Seselja Perisin A, Kumric M, et al. Implications of COVID-19 pandemic on the emergence of antimicrobial resistance: adjusting the response to future outbreaks. *Life*. 2021;11(3):1–15. doi: 10.3390/life11030220
- [27] Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016 Apr;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. PMID: 27227291; PMCID: PMC4888801.
- [28] World Health Organization (WHO). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis [internet]. World Health Organization; 2017. [cited as 07 Jun 2022]. ISBN: 9789240026438. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>
- [29] Vieira DRP, Amaral FMM, Maciel MCG, Nascimento Flávia FRF, Libério AS. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: Revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana in vitro em patógenos orais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2014;16(1):135–67. doi: 10.1590/S1516-05722014000100020
- [30] Afonso AF, Pereira OR, Fernandes Â, Calhêlha RC, Silva AMS, Ferreira RCF, et al. Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *salvia officinalis* “Icterina” and *Salvia mexicana* aqueous Extracts. *Molecules*. 2019;24(23):1–13. doi: 10.3390/molecules24234327
- [31] Ghorbani A, Esmaeilzadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Trad Complement Med*. 2017;7(4):433–40. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.12.014

- [32] Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jašić M, Babić J, Jukić H, Banjari I. Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations. *Plants (Basel)*. 2019 Mar 6;8(3):55. doi: 10.3390/plants8030055. PMID: 30845696; PMCID: PMC6473381.
- [33] Almeida CM, Rocha EAL de SS, Alves ÉP, Lima RDF, Cavalcanti YW, Gomes RCB, et al. In vitro Evaluation of the Antimicrobial Potential of *Salvia officinalis* L. against Oral Pathogens. *Journal of Health Sciences*. 2019;21(2):129. doi: 10.17921/2447-8938.2019v21n2p129-133
- [34] Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*. 2007;30(6):1147–9. doi: 10.1248/BPB.30.1147
- [35] Pellegrini M, Ricci A, Serio A, Chaves-López C, Mazzarrino G, D'Amato S, Lo Sterzo C, Paparella A. Characterization of Essential Oils Obtained from Abruzzo Autochthonous Plants: Antioxidant and Antimicrobial Activities Assessment for Food Application. *Foods*. 2018 Feb 2;7(2):19. doi: 10.3390/foods7020019. PMID: 29393893; PMCID: PMC5848123.
- [36] Silva DM, Costa PAD, Ribon AOB, Purgato GA, Gaspar DM, Diaz MAN. Plant Extracts Display Synergism with Different Classes of Antibiotics. *An Acad Bras Cienc*. 2019 May 13;91(2):e20180117. doi: 10.1590/0001-3765201920180117. PMID: 31090789.
- [37] de Oliveira JR, Vilela PGDF, Almeida RBA, de Oliveira FE, Carvalho CAT, Camargo SEA, Jorge AOC, de Oliveira LD. Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. *Gen Dent*. 2019 Jan-Feb;67(1):22-26. PMID: 30644826.
- [38] Alós JI. [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2015;33(10):692–9. doi: 10.1016/J.EIMC.2014.10.004
- [39] Brasileiro BG, Pizziolo VR, Matos DS, Germano AM, Jamal CM. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008;44(4):629–36. doi: 10.1590/S1516-93322008000400009

- [40] 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.
- [41] Mendes FSF, Garcia LM, Moraes T da S, Casemiro LA, Alcântara CB de, Ambrósio SR, et al. Antibacterial activity of *salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study. *Anaerobe*. 2020;63:102194. doi: 10.1016/J.ANAEROBE.2020.102194
- [42] Beheshti-Rouy M, Azarsina M, Rezaie-Soufi L, Alikhani MY, Roshanaie G, Komaki S. The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial. *Iran J Microbiol*. 2015 Jun;7(3):173-7. PMID: 26668706; PMCID: PMC4676988.
- [43] Saviuc C, Gheorghe I, Coban S, Drumea V, Chifiriuc M-C, Banu O, et al. Rosmarinus *Officinalis* Essential Oil and Eucalyptol Act as Efflux Pumps Inhibitors and Increase Ciprofloxacin Efficiency against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Acinetobacter Baumannii* MDR Strains. *Romanian Biotechnological Letters*. 2016;21(4);11782-90.
- [44] Stefanović OD, Stanojević DD, Comić LR. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Pol Pharm*. 2012 May-Jun;69(3):457-63. PMID: 22594260.