



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

**ANNA LAURA ARTIGIANI ARANTES
KAREN BEATRIZ KUMAZAWA**

**EFEITO ANTIMICROBIANO ISOLADO E SINÉRGICO DOS EXTRATOS
DE ALÇAÇUZ E GUAÇATONGA CONTRA CEPA MULTIRRESISTENTE
DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

2022

**ANNA LAURA ARTIGIANI ARANTES
KAREN BEATRIZ KUMAZAWA**

**EFEITO ANTIMICROBIANO ISOLADO E SINÉRGICO DOS EXTRATOS DE
ALÇAÇUZ E GUAÇATONGA CONTRA CEPA MULTIRRESISTENTE DE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

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).

Kumazawa, Karen Beatriz

"Efeito antimicrobiano isolado e sinérgico dos extratos de alcaçuz e guaçatonga contra cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae*". / Karen Beatriz Kumazawa; Anna Laura Artigiani Arantes. - 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.

Orientador: Luciane Dias de Oliveira

Coorientador: Thaís Cristine Pereira

1. Biofilme. 2. *Casearia sylvestris*. 3. *Glycyrrhiza glabra* L. 4. *Klebsiella pneumoniae*. 5. Resistência microbiana. 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

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

Prof. Assoc. José Benedito Oliveira Amorim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 06 de julho de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho, primeiramente aos nossos pais, que sem eles nada disso seria possível.

A nossa orientadora, Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, que desde sempre nos trata com muito carinho e sempre esteve à disposição para nos ajudar e ensinar.

A nossa coorientadora, Profa. Thaís Cristine Pereira, que nos ensinou muito sobre as pesquisas laboratoriais, nos guiou na produção deste trabalho e sempre esteve à disposição para esclarecer dúvidas e nos ajudar a qualquer momento, sempre com animação e um sorriso no rosto.

AGRADECIMENTOS

Eu, Anna Laura, agradeço primeiramente a Deus, por tudo que tenho em minha vida e por tudo que conquistei até agora, e peço a Ele para me dar sabedoria para conquistar muito mais.

A minha mãe, Márcia Artigiani Arantes e ao meu pai, Wagner Arantes, por todo amor, incentivo e apoio incondicionais. Agradeço por estarem sempre presentes em minha vida e por tudo que me proporcionaram. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Pedro Favero Perez, que sempre estive ao meu lado em todos os momentos. Agradeço seu companheirismo, apoio, amor e incentivo em tudo que faço. Obrigada pela ajuda para finalização deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial meu tio, Eduardo Fernandes Massucci, minha tia, Miriam Cristina Artigiani Massucci e minha prima, Maithê Artigiani Massucci, por toda ajuda e amor comigo. Agradeço todos os momentos ao lado de vocês.

A minha dupla de sempre, Karen Beatriz Kumazawa, que está comigo desde o primeiro dia de faculdade. Obrigada por todos os momentos juntas, por sua amizade e carinho comigo. Sem você toda a trajetória nesta faculdade seria mais difícil. Agradeço sua participação neste trabalho, o qual depois de muita dedicação, conseguimos finalizá-lo juntas.

Eu, Karen, agradeço aos meus pais, Terezinha e Paulo, que estiveram do meu lado durante esses anos de curso, fazendo de tudo para que eu chegasse até aqui. Mesmo estando longe de casa, sempre se mostraram presentes a cada gesto de carinho, amor e cuidado comigo. Levo no meu coração todas as nossas idas em família para a rodoviária, onde me deixavam no domingo à noite para que

eu pudesse retornar às aulas, sempre levando junto a nossa cachorrinha Hannah.

Ao meu irmão, Victor, por quem tenho muita admiração e sempre acreditou no meu potencial, falando que era possível sim chegar até aqui.

Aos meus tios, Luiza e Silvio, que me ajudaram muito durante a faculdade, além de acreditarem e torcerem para o meu sucesso.

A minha dupla inseparável, Anna Laura, com quem tive a sorte de encontrar na faculdade e dividir minha vida ao longo desses anos. E, para finalizar essa etapa tão importante das nossas vidas, onde estamos apresentando o trabalho de conclusão de curso, não podia ser de outra forma a não ser juntas.

Juntas, gostaríamos de agradecer a nossa orientadora, Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, pelos ensinamentos que nos permitiram apresentar um melhor desempenho ao longo do curso. Agradecemos também pelas aulas dadas com excelência, que nos manifestou interesse pela matéria, levando a procurá-la como orientadora desse trabalho e pela oportunidade e atenção nos dada.

A nossa coorientadora, Profa. Thaís Cristine Pereira, por toda a ajuda, paciência, disposição e empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Aos nossos amigos mais próximos, por compartilharem tantos momentos de aprendizado, crescimento, conquistas, acertos, erros e muitas risadas. Obrigada por todo o companheirismo ao longo desse percurso e por tornarem tudo mais leve, vocês foram essenciais nessa jornada.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realização do curso.

Juntas, gostaríamos de agradecer a nossa orientadora, Profa. Assoc. Luciane Dias

de Oliveira, pelos ensinamentos que nos permitiram apresentar um melhor desempenho ao longo do curso. Agradecemos também pelas aulas dadas com excelência, que nos manifestou interesse pela matéria, levando a procurá-la como orientadora desse trabalho e pela oportunidade e atenção nos dada.

A nossa coorientadora, Profa. Thaís Cristine Pereira, por toda a ajuda, paciência, disposição e empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Aos nossos amigos mais próximos, por compartilharem tantos momentos de aprendizado, crescimento, conquistas, acertos, erros e muitas risadas. Obrigada por todo o companheirismo ao longo desse percurso e por tornarem tudo mais leve, vocês foram essenciais nessa jornada.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realização do curso.

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se você fosse viver para sempre”. Mahatma Gandhi.

RESUMO

Arantes AA, Kumazawa KB. Efeito antimicrobiano isolado e sinérgico dosextratos de alcaçuz e guaçatonga contra cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* [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 dos extratos glicólicos de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris*) isolados e combinados sobre culturas planctônicas e biofilmes de cepas multirresistente epadrão de *Klebsiella pneumoniae*. **Material e métodos:** A análise antimicrobiana dos extratos foi realizada pelo teste de ensaio de microdiluição, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A9, e a combinação dos extratos foi analisada pela técnica *checkerboard*. As concentrações mais efetivas foram aplicadas sobre biofilmes por 5 min e 24 h de tratamento, sendo a viabilidade celular quantificada pelo teste MTT. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA complementado por *Tukey Test* (5%). **Resultados:** Os valores obtidos demonstraram CIM e CMM de 50 mg/mL (alcaçuz) e de 3,1 mg/mL (guaçatonga) frente às cepas de *K. pneumoniae*. Quando combinados, os extratos apresentaram quatro concentrações aditivas e duas sinérgicas para a cepa clínica. Em biofilmes, o extrato de alcaçuz reduziu a viabilidade em 83,6% e 66,6% após 5 min de contato com a cepa padrão e clínica, respectivamente. Após 24h de tratamento, as reduções chegaram a 84,7% (cepa 820195). Já guaçatonga reduziu 37,5% do biofilme da cepa padrão (5 min de contato). **Conclusão:** Os extratos de alcaçuz e guaçatonga isolados apresentaram ação antimicrobiana para as cepas de *K. pneumoniae* e quando combinados apresentaram efeitos aditivos e sinérgicos contra a cepa clínica multirresistente. Alcaçuz possui ação antibiofilme contra as duas cepas nos diferentes tempos de contato, já guaçatonga apresentou ação antibiofilme somente para a cepa padrão após 5 min de tratamento.

Palavras-chave: Biofilme; *Casearia sylvestris*; *Glycyrrhiza glabra* L.; *Klebsiella pneumoniae*; Resistência microbiana.

ABSTRACT

Arantes AA, Kumazawa KB. Isolated and synergistic antimicrobial effect of licorice and guaçatonga extracts against multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* [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 activity of hydroalcoholic extracts of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) and guaçatonga (*Casearia sylvestris*) isolated and combined on planktonic cultures and biofilms of multidrug-resistant and standard strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Material and methods:** The antimicrobial analysis of the extracts was performed using the microdilution test, recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M7-A9 standard, and the combination of extracts was analyzed by the checkerboard technique. The most effective concentrations were applied on biofilms for 5 min and 24 h of treatment, and cell viability was quantified by the MTT test. Data were statistically analyzed by ANOVA complemented by Tukey Test (5%). **Results:** The values obtained showed MIC and MMC of 50 mg/mL (licorice) and 3.1 mg/mL (guaçatonga) against the strains of *K. pneumoniae*. When combined, the extracts showed four additive and two synergistic concentrations for the clinical strain. In biofilms, licorice extract reduced viability by 83.6% and 66.6% after 5 min of contact with the standard and clinical strain, respectively. After 24h of treatment, the reductions reached 84.7% (strain 820195). On the other hand, guaçatonga reduced 37.5% of the biofilm of the standard strain (5 min of contact). **Conclusion:** The isolated licorice and guaçatonga extracts showed antimicrobial action against the strains of *K. pneumoniae* and when combined they showed an additive and synergistic effect against the clinical strain. Licorice has antibiofilm action against both strains at different contact times, while guaçatonga showed a significant reduction only for the standard strain after 5 min of treatment.

Keywords: Biofilm; *Casearia sylvestris*; *Glycyrrhiza glabra* L.; *Klebsiella pneumoniae*; Microbial resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Extratos vegetais	13
2.2 Atividade antimicrobiana dos extratos.....	13
2.2.1 Micro-organismos.....	13
2.3 Determinação da ação antimicrobiana	15
2.3.1 Preparo do inóculo	15
2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	15
2.5 Ensaio <i>Checkerboard</i>	17
2.6 Avaliação dos extratos sobre biofilmes	18
2.7 Análise estatística	19
3 RESULTADOS.....	20
3.1 Avaliação da ação antimicrobiana dos extratos isolados	20
3.2 Avaliação da ação combinada dos extratos de alcaçuz e guaçatonga.....	20
3.3 Atividade antibiofilme dos extratos	21
3.3.1 Tratamentos do biofilme por 5 min	21
3.3.2 Tratamento do biofilme por 24h	23
4 DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa que é encontrada usualmente na superfície da mucosa em animais ou em ambientes como água, solo e dispositivos médicos. Em humanos, concentra-se no trato gastrointestinal e algumas poucas na nasofaringe, por onde a bactéria pode entrar na circulação sanguínea ou em outros tecidos, causando infecções graves. É considerada uma das principais causas de infecções hospitalares causando pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e pneumonia adquirida em unidade de terapia intensiva (UTI) [1]. Além disso, causa uma ampla gama de outras infecções graves, incluindo infecções do trato urinário, bacteremias e abscessos hepáticos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos [2].

Nesse contexto, o combate a essa espécie é de suma importância, visto que o surgimento de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos em todo o mundo tornou-se motivo de preocupação, onde β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e cepas produtoras de carbapenemases foram isoladas com frequência [3]. Como consequência dessa resistência aos antibióticos, infecções simples, como infecções do trato urinário (ITUs), tornaram-se recalcitrantes ao tratamento, e infecções mais graves, como pneumonias e bacteremias, tornaram-se cada vez mais fatais [2]. A capacidade desse patógeno de formar biofilmes em dispositivos inseridos, como cateter urinário, tem sido proposta como um dos mecanismos importantes em infecções nosocomiais e persistentes [3].

Dito isso, um importante fator a ser levado em consideração é o surgimento da pandemia ocasionada pelo coronavírus (SARS-CoV-2), na qual o número de internações em UTIs aumentou drasticamente e, consequentemente, infecções hospitalares também. À vista disso, foi comprovado que o comprometimento do sistema imunológico de pacientes infectados com coronavírus, pode causar um aumento nos surtos de bactérias multirresistentes (MDR) em pacientes nas UTIs [4], o que reforça a importância do combate a essa espécie.

Tendo em vista a resistência das bactérias aos antibióticos usuais e o aumento de casos de internações em UTIs durante a pandemia, a busca por novas alternativas terapêuticas se tornou essencial, sendo uma delas a fitoterapia que tem

ganhado notoriedade. O uso de medicamentos fitoterápicos é bem estabelecido e amplamente reconhecido quanto a sua segurança e eficácia, bem como aceito pelas autoridades sanitárias nacionais. Tradicionalmente empregados, os medicamentos à base de plantas nativas ou derivados de ervas têm sido muito populares desde tempos imemoriais; e hoje, esses medicamentos têm despertado muita atenção em todo o mundo, devido à sua origem natural e potencial nutracêutico [5,6].

Nessa perspectiva, diversos princípios ativos naturais obtiveram notoriedade, em virtude de sua comprovada eficácia em aplicações terapêuticas. Dentre eles, destaca-se o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) e a guaçatonga (*Casearia sylvestris*).

Três plantas originais da família *Leguminosae*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *G. inflata* Bat. e *G. glabra* L. são prescritos como alcaçuz. Seus cortes das raízes secas são amplamente utilizados em prescrições clínicas. A importância farmacêutica do alcaçuz reside na sua capacidade de produzir uma grande variedade de metabolitos secundários. Eles foram relatados com antitumoral [7,8], antimicrobiano [9,10], antiviral [11,12], anti-inflamatório [13,14], antidiabético [15,16], imunorregulação [17,18], hepatoprotetora [19,20], atividades neuroprotetoras [21,22] e funções do tipo de hormônio cortical adrenal [23,24].

Assim, o alcaçuz tem se mostrado como um excelente compostoterapêutico, pois causa distúrbios mínimos nas funções fisiológicas do organismo e exerce ação terapêutica em diversas patologias. Além disso, é especialmente indicado para crianças, pois a glicirrizina (GC), um composto isolado do alcaçuz, é 50 vezes mais doce que o açúcar, o que facilita muito a aceitação das crianças [25].

A *Casearia sylvestris*, conhecida popularmente por guaçatonga, é uma representante do gênero *Casearia* e pertencente à família *Flacourtiaceae*. Com base na sua morfologia, são reconhecidas 2 variedades: *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *língua*. Devido a sua relevância etnofarmacêutica, ela é uma das 71 espécies vegetais listadas na Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde Brasileiro [26], possuindo inúmeras aplicações farmacológicas, como atividades antidiarreica, antitérmica, depurativa, antirreumatizante, cicatrizante e anti-inflamatória, sendo também utilizados para o tratamento de picadas de cobras [27]. É encontrada em vários biomas, incluindo a Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga e Pantanal. No Brasil,

assim como em outros países latino-americanos, a *C. sylvestris* é usada como extratos brutos e infusões na medicina popular [26].

Diante da necessidade de investigar novos compostos antimicrobianos e a escassez de estudos utilizando fitoterápicos em cepas multirresistentes, o presente estudo avaliou *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos glicólicos de alcaçuz e guaçatonga sobre cultura planctônica e sobre biofilmes de cepa clínica multirresistente (820195) e cepa padrão (ATCC 4352) de *Klebsiella pneumoniae*, em diferentes tempos de contato (5 min e 24 h).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extratos vegetais

Os extratos glicólicos de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Casearia sylvestris* (guaçatonga) foram adquiridos comercialmente (Distriol, Bom Jesus dos Perdões, SP), na concentração de 200 mg/mL (20%) diluído em propilenoglicol.

2.2 Atividade antimicrobiana dos extratos

2.2.1 Micro-organismos

A avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos foi realizada sobre cepa clínica multirresistente (820195) e cepa padrão (ATCC 4352) de *Klebsiella pneumoniae* provenientes do Laboratório Bioclin do grupo Policlin (São José dos Campos, SP), e pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia (ICT- Unesp), respectivamente. O perfil de resistência a antibióticos da cepa clínica *K.*

pneumoniae (820195) foi fornecido pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin (São José dos Campos -SP) (Quadro 1).

Quadro 1 - Perfil de resistência da cepa clínica 820195 de *K. pneumoniae*

(continua)

Antibiótico	<i>K. pneumoniae</i> (820195)
Ácido clavulânico + Amoxi.	R
Amicacina	S
Ampicilina	R
Ampicilina + Sulbac.	R
Aztreonam	-
Cefepime	R
Cefotaxima	-
Cefoxitina	R
Ceftazidima	-
Cefuroxime	R
Ciprofloxacina	R
Clindamicina	-
Cloranfenicol	-
Colistina	R
Daptomicina	-
Eritromicina	-
Ertapenem	R
Fosfomicina	R
Gentamicina	S
Imipenem	R
Levofloxacina	R
Linezolida	-
Meropenem	R
Minociclina	-
Oxacilina	-

Quadro 1 - Perfil de resistência da cepa clínica 820195 de *K. pneumoniae*

(conclusão)

Antibiótico	<i>K. pneumoniae</i> (820195)
Piperacilina+ Tazobactam	R
Rifampicina	-
Tigeciclina	S
Tobramicina	S
Trimetropim/Sulfa.	R
Vancomicina	-

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

Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin (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 meio sólido, *Brain Heart Infusion* (BHI - Himédia) para reativação. Em seguida foram incubados por 24 h, em estufa bacteriológica, à temperatura de 37°C. Após esse período, com auxílio da alça bacteriológica estéril foram inoculadas colônias em tubos contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e diluídas. Posteriormente foram padronizados em espectrofotômetro (Biotec) na concentração de em 10^6 células/mL, de acordo com as recomendações preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A9.

2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado o

método de microdiluição em caldo (CLSI, norma M7-A9). O teste foi realizado em microplacas, onde foram adicionados 100 µL de caldo *Mueller Hinton* (Himedia, Mumbai, Índia) em todos os poços testes. Posteriormente, 100 µL 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 incubadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) em estufa bacteriológica (37°C), e foram padronizados em espectrofotômetro em 10⁶ células/mL. Em seguida, os inóculos padronizados foram adicionados em todos os poços, no volume de 100 µL, exceto no controle de esterilidade do meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 37°C. Após o período de incubação, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvação, no qual indica ausência de crescimento bacteriano.

Para que a Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato fosse determinada, foi inoculado uma alíquota (5 µL) dos poços em ágar BHI, e após 48 h de incubação à 37°C, foi observada a CMM por meio da menor concentração em que não houve crescimento de colônias.

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

Concentrações dos extratos de alcaçuz e guaçatonga em microdiluição										
Poço	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
Alcaçuz	50	25	12,5	6,2	3,1	1,5	0,7	0,3	0,1	0,09
Guaçatonga	50	25	12,5	6,2	3,1	1,5	0,7	0,3	0,1	0,09

Legenda: Valores expressos em mg/mL.

Fonte: elaborado pela autora

2.5 Ensaio *Checkerboard*

O efeito sinérgico da combinação dos extratos foi avaliado pela técnica *checkerboard* (tabuleiro de xadrez), de acordo com Odds [28] e Ušjak et al. [29] com modificações. A técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, e determina o tipo de interação entre os extratos em: sinérgico, antagônico ou indiferente. Para as combinações dos extratos, foram utilizados como referência os valores de CIM previamente obtidos, sendo que serão preparadas concentrações de cada extrato, iniciando com 2 vezes a CIM seguindo diluições em base 2 [29]: 2xCIM, CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/6, CIM/8, CIM/16. Para tanto, 50 µL de cada diluição do extrato 1 (alcaçuz) foram adicionados no eixo x (horizontal) da microplaca enquanto 50 µL das diluições do extrato 2 (guaçatonga) foram adicionados no eixo y (vertical) da microplaca, de modo a obter todas as combinações possíveis entre as concentrações dos extratos previamente preparadas. Em seguida, foi adicionado o inóculo microbiano, padronizado em 10⁶ células/mL, totalizando volume de 200 µL em cada poço, exceto no controle negativo que receberá caldo MH [29]. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, e após as CIMs foram determinadas como as menores concentrações das combinações que inibirem o crescimento microbiano, pela ausência visível de turbidez [29]. Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos, foi adotado o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), que classifica as combinações em sinérgicas, aditivas, indiferente ou antagônicas. O ICIF é calculado por meio da soma da concentração inibitória fracionada (CIF) do extrato 1 + a CIF do extrato 2. A ICIF pode ser definida como: uma combinação é considerada sinérgicaa uma ICIF ≤ 0,5, aditiva quando ICIF é > 0,5 e ≤ 1,0, indiferente quando ICIF > 1 e ≤ 4 e antagonista em ICIF > 4,0. A mesma fórmula será utilizada para calcular o índice de concentração bactericida fracionária (ICBF), usando valores CBM em vez de CIM [28]. Para isso, uma alíquota de cada um dos poços foi semeada em ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 h e foi determinada ICBF de acordo com a ausência de crescimento microbiano nas placas. Todos os testes foram realizados em triplicata. Com base nos resultados dos testes de *checkerboard*, somente as associações que apresentarem sinergismo foram utilizadas nos próximos testes.

2.6 Avaliação dos extratos sobre biofilmes

Os biofilmes foram formados em fundo de microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 100 µL de caldo BHI, e 100 µL dos micro-organismos padronizados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) a 10^7 células/mL. 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 isolados (CMM, 2 x CMM e 4 x CMM), combinados (ação aditiva e sinérgica) e controles pelos períodos de 5 min e 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. Como controle positivo foi utilizada a solução de clorexidina e como controle negativo o caldo BHI. Após os tratamentos, as soluções foram descartadas e o biofilme foi lavado com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%).

A ação antibiofilme dos extratos foi avaliada por meio do teste de viabilidade do micro-organismo MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) em que foram adicionados 100 µL da solução 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 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* sobe agitação constante por 10 min. Após este período, as placas foram lidas em leitora de microplaca em 570 nm, as densidades ópticas obtidas foram convertidas, por meio da fórmula apresentada abaixo, em percentual de redução de viabilidade do micro-organismo:

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

2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com *software Graphpad prism 5.0*. Os dados obtiveram distribuição normal 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 Avaliação da ação antimicrobiana dos extratos isolados

Os extratos glicólicos de alcaçuz e guaçatonga possuem atividade bactericida sobre contra a cepa clínica (820195) e cepa padrão (ATCC 4352) de *K. pneumoniae*, sendo os valores de CIM e CMM demonstrados na Tabela I.

Tabela I – CIM e CMM dos extratos de alcaçuz e guaçatonga para a cepa clínica (820195) e cepa padrão (ATCC 4352) de *K. pneumoniae*

Extratos	CIM	CMM	Efeito
Alcaçuz	50 mg/mL	50 mg/mL	Bactericida
Guaçatonga	3,1 mg/mL	3,1 mg/mL	Bactericida

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Avaliação da ação combinada dos extratos de alcaçuz e guaçatonga

Diante dos resultados obtidos, não foram encontradas concentrações aditivas e sinérgicas para a cepa padrão ATCC 4352 de *K. pneumoniae*. Já para a cepa clínica 820195 foram encontradas quatro combinações aditivas e duas sinérgicas, conforme demonstrado na Tabela II.

Tabela II – Avaliação da ação combinada dos extratos de alcaçuz e guaçatonga

	Uso isolado CIM		Combinação		Valores ICIF	Efeito da combinação
Combinação	Alc	Gtg	Alc	Gtg		
Alc + Gtg	50	3,1	12	1,5	0,72	Aditivo
Alc + Gtg	50	3,1	6	1,5	0,60	Aditivo
Alc + Gtg	50	3,1	3	1,5	0,54	Aditivo
Alc + Gtg	50	3,1	1,5	1,5	0,51	Aditivo
Alc + Gtg	50	3,1	0,7	1,5	0,49	Sinérgico
Alc + Gtg	50	3,1	0,3	1,5	0,48	Sinérgico

Legenda: CIM – Concentração Inibitória Mínima; ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionária; Alc- alcaçuz; Gtg – guaçatonga.
 Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Atividade antibiofilme dos extratos

3.3.1 Tratamentos do biofilme por 5 min

Em relação ao extrato isolado de alcaçuz, quando testado em biofilme de *K. pneumoniae* ATCC 4352 por 5 min, as concentrações de 50 e de 100 mg/mL tiveram redução estatística significativa em relação ao grupo controle, com 18,3% e 37,8%, respectivamente. Já a concentração de 200 mg/mL de alcaçuz foi a que apresentou o maior percentual de redução da viabilidade com 83,6%, apresentando diferença estatística com grupo controle e semelhança com a clorexidina (Figura 1A). Já a cepa clínica 820195, as concentrações de 50 e 100 mg/mL de alcaçuz não tiveram reduções estatísticas significativas quando comparada ao controle, com 10,1% e 12,2% de redução, respectivamente. Por sua vez, a concentração de 200 mg/mL de alcaçuz teve a maior redução de viabilidade com 66,6%, apresentando diferença estatística com o grupo controle e redução semelhante com o grupo tratado com a

clorexidina (Figura 1B).

Com relação ao extrato isolado de guaçatonga, quando testado em biofilme de *K. pneumoniae* ATCC 4352 por 5 min, as concentrações de 6,2 e de 12,5 mg/mL apresentaram redução estatística significativa quando comparada ao grupo controle com 24,5% e 37,4% de redução da viabilidade, respectivamente. No que se diz respeito a clorexidina, houve redução da viabilidade em 80,5% (Figura 1C). Quando analisada a cepa clínica 820195, as concentrações de 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL do extrato de guaçatonga não obtiveram diferenças estatísticas significativas na redução da viabilidade do biofilme. Em relação a clorexidina, houve redução da viabilidade em 67,7% (Figura 1D).

Quando os extratos de alcaçuz e guaçatonga foram combinados e testados no biofilme da cepa clínica 820195 por 5 min, todas as combinações com diferentes concentrações não resultaram em redução da viabilidade do biofilme. Já a clorexidina obteve uma redução de 69% da viabilidade (Figura 1E).

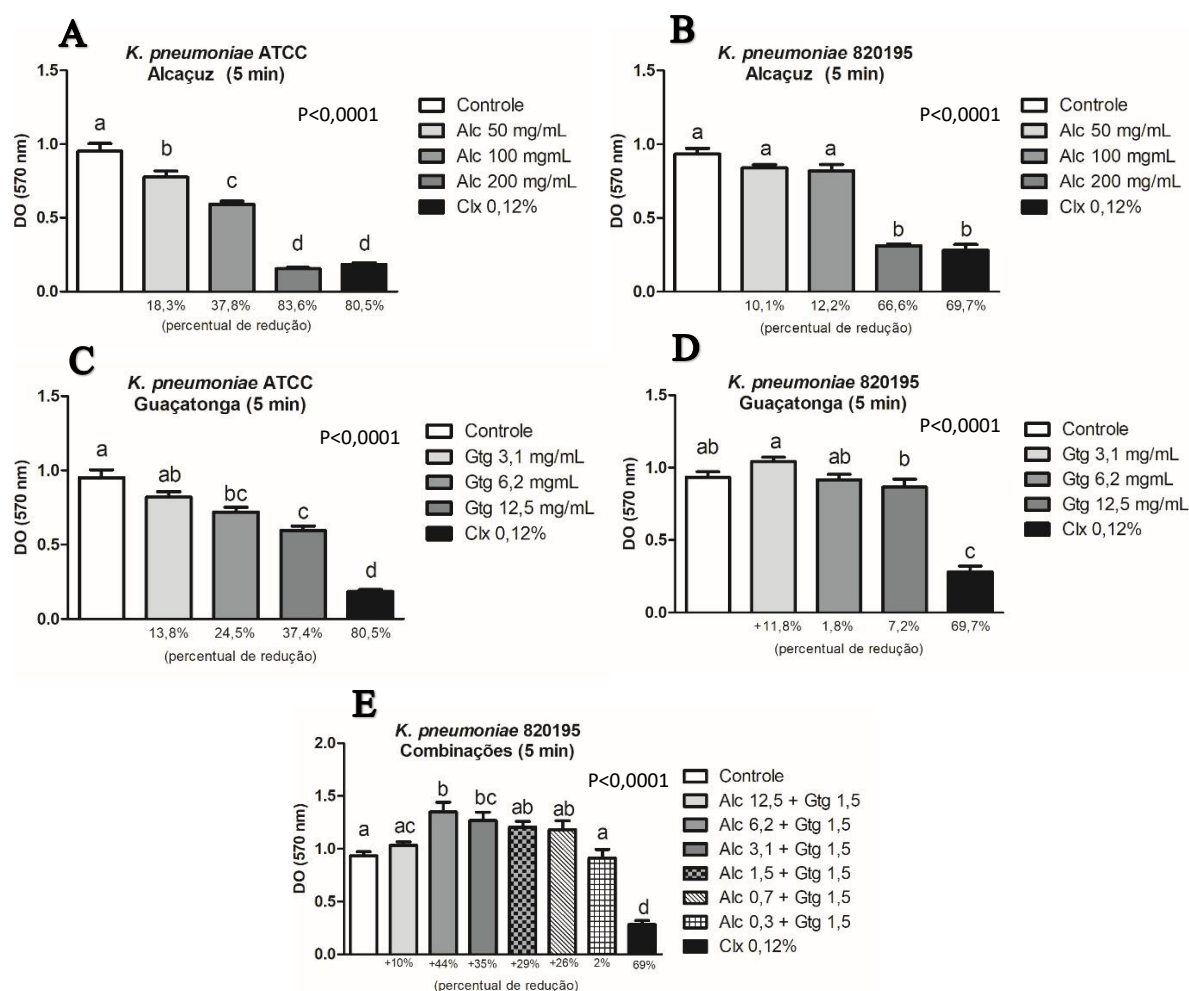


Figura 1 - Gráficos demonstrando a redução da viabilidade obtida pelo teste MTT após tratamento de 5 min com os extratos de alcaçuz e guaçatonga isolados [figura 1 A-D] e combinados [figura 1E] sobre biofilmes de *K. pneumoniae*. Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As letras demonstram a semelhanças ou diferenças estatísticas entre os grupos. DO – Densidade Óptica; Alc – Alcaçuz; Gtg – Guaçatonga; Clx – Clorexidina.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.2 Tratamento do biofilme por 24h

Em relação ao extrato isolado de alcaçuz, quando testado em biofilme de *K.*

pneumoniae ATCC por 24 h, a concentração 50 e 100 mg/mL foram as que apresentaram maior porcentagem de redução de viabilidade, com 89,4% e 91,8% respectivamente, em relação ao grupo controle. A concentração de alcaçuz 25mg/mL também teve redução significativa de 54% na viabilidade em relação ao grupo controle (Figura 2A). Já a cepa clínica 820195 com concentração 100 mg/mL foi a que apresentou maior porcentagem de redução de viabilidade, com 84,7%. Assim, houve diferença estatística em relação ao grupo controle e semelhança com a clorexidina. A concentração de alcaçuz 25 mg/mL teve um aumento de 24,4% na viabilidade e a de 50 mg/mL teve uma redução significativa de 65,3% na viabilidade, quando comparadas ao grupo controle (Figura 2B).

Em relação ao extrato isolado de guaçatonga, quando testado em biofilme de *K. pneumoniae* ATCC por 24 h, a concentração de 6,2 mg/mL apresentou redução de 2,8% na viabilidade e em 12,5 mg/mL apresentou redução de 4,2% na viabilidade, porém não teve diferença estatística com o grupo controle (Figura 2C). Já a cepa clínica 820195 com concentrações 3,1; 6,2 e 12,5 mg/mL tiveram aumento na viabilidade de 15,2%; 19,1% e 32,7% respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (Figura 2D).

Quando os extratos de alcaçuz e guaçatonga foram combinados e testados no biofilme da cepa clínica 820195 por 24 h, todas as combinações não resultaram em redução da viabilidade do biofilme. Já a clorexidina obteve uma redução de 90,8% na viabilidade (Figura 2E).

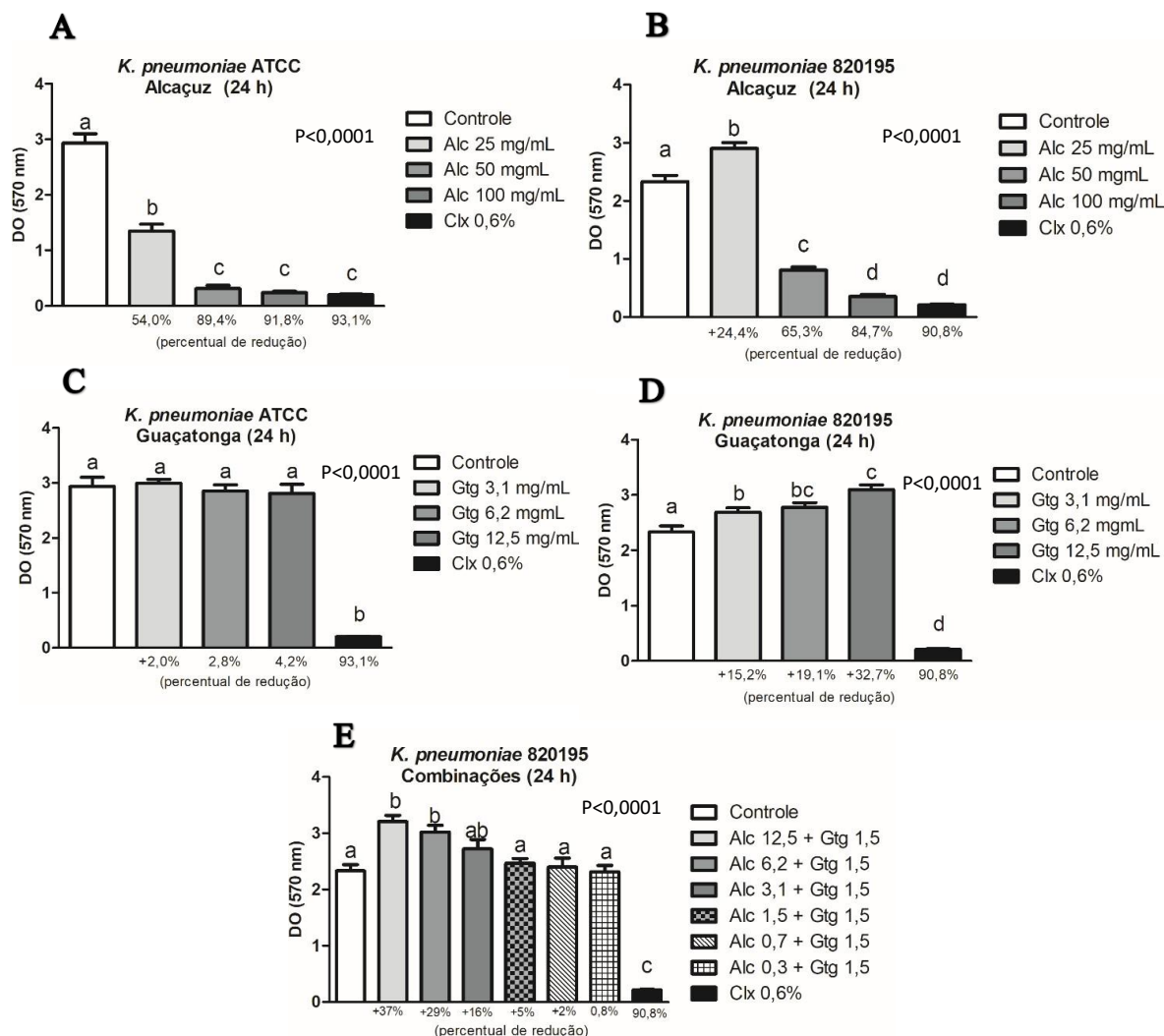


Figura 2- Gráficos demonstrando a redução da viabilidade obtida pelo teste MTT após tratamento de 24 h com os extratos de alcaçuz e guaçatonga isolados [figura 2A-D] e combinados [figura 2E] sobre biofilmes de *K. pneumoniae*. Todos os testes apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As letras demonstram a semelhanças ou diferenças estatísticas entre os grupos. DO – Densidade Óptica; Alc – Alcaçuz; Gtg – Guaçatonga; Clx – Clorexidina.

Fonte: Elaborado pela autora.

4 DISCUSSÃO

A busca por novas alternativas para combater a resistência antimicrobiana é um desafio e de interesse mundial, visto que, é frequente a propagação de novos micro-organismos e a mutação dos já existentes, acarretando uma acelerada disseminação da resistência aos antibióticos, e, por consequência, necessita-se de alternativas de tratamento aos antimicrobianos convencionais. A fitoterapia tem ganhado notoriedade e demonstra ser uma opção promissora [30]. Nesse enfoque, os resultados do presente estudo são pioneiros, não havendo até o momento na literatura estudos relacionando alcaçuz, guaçatonga contra *K. pneumoniae*. Entretanto, segundo Irani, Mahboubeh et al. [31] foram encontrados estudos relacionando a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos e aquosos da raiz dealcaçuz contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Diante desse estudo, para o extrato alcoólico de alcaçuz contra *Staphylococcus aureus*, os valores de CIM e CMM foram 2,5 e 10 mg/mL, respectivamente. Já para o extrato aquoso, os valores de CIM e CMM foram de 5 e 10 mg/mL, respectivamente. Em relação ao extrato alcoólico de alcaçuz contra *Bacillus subtilis*, os valores de CIM e CMM foram 2,5 e 5 mg/mL, respectivamente. Já para o extrato aquoso, os valores de CIM e CMM foram 20 e 40 mg/mL, respectivamente. A respeito do extrato alcoólico contra *Enterococcus faecalis*, os valores obtidos de CIM e CMM foram 5 e 40 mg/mL, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos, foi demonstrado que o alcaçuz tem ação antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Essa ação antimicrobiana também foi identificada em nosso estudo, no qual o extrato glicólico de alcaçuz obteve CIM e CMM de 50 mg/mL contra a cepa multirresistente e cepa padrão de *K. pneumoniae*, evidenciando também um potencial antimicrobiano. Além do efeito em cultura planctônica, foi constatado nesse estudo um efeito antibiofilme promissor, alcaçuz na concentração de 200 mg/mL reduziu 83,6 e 66,6% a atividade metabólica quando tratado por 5 min, para as cepas multirresistente e padrão. Para 24 h de tratamento com 100 mg/mL do extrato, as reduções foram de 91,8 e 84,7%, para as cepas multirresistente e padrão, respectivamente.

Segundo os estudos de Ribeiro SM et al. [32], foram apresentadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme de 12 extratos de *guaçatonga* (0,50 mg/mL) de diferentes biomas brasileiros e variedades (*sylvestris*, *lingua* e *intermediária*) testadas contra *Streptococcus mutans*. Dito isso, os resultados mostraram que três extratos da Mata Atlântica da variedade *sylvestris* reduziram $\geq 50\%$ a viabilidade de *S. mutans*. Para biofilmes desta bactéria, três extratos reduziram em $\geq 91\%$ e 100% da biomassa microbiana. A partir desses resultados foi observado a ação antibiofilme da *guaçatonga* contra *S. mutans*, já nos estudos realizados com *K. pneumoniae* ATCC e extrato glicólico de *guaçatonga*, observou-se também ação antimicrobiana com valor de CIM de 3,1 mg/mL, apresentando ação bactericida. Em relação à ação antibiofilme de *guaçatonga*, quando os biofilmes foram tratados por 5 min, na concentração 12,5 mg/mL houve redução de 37,4% na viabilidade em relação ao grupo controle.

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 sejam desenvolvidas a fim de definir os níveis terapêuticos de novos extratos, além da realização de mais estudos a partir da combinação de outras substâncias, para potencializar os espectros obtidos, resultando assim em novas alternativas terapêuticas que auxiliam a resolução dessa problemática de grande relevância no sistema de saúde global. Os resultados obtidos nesse estudo trazem dados relevantes com relação ao potencial antimicrobiano dos extratos de alcaçuz e *guaçatonga* contra *K. pneumoniae*, e demonstram que esses extratos podem ser candidatos para novas formulações terapêuticas contra esses patógenos.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos glicólicos de alcaçuz e guaçatonga apresentam ação antimicrobiana contra cepas multirresistente e padrão de *Klebsiella pneumoniae*. Quando combinados, resultaram em 4 concentrações aditivas e 2 sinérgicas contra a cepa clínica de *K. pneumoniae*. Com relação a ação antibiofilme, alcaçuz apresentou reduções significativas da viabilidade do biofilme após 5 min e 24 h de tratamento contra as duas cepas, já o extrato de guaçatonga teve sua ação antibiofilme demonstrada somente para a cepa padrão após 5 min de contato. Quando combinados os extratos nas concentrações aditivas e sinérgicas, não houve redução significativa dos biofilmes, portanto, os extratos isolados apresentaram melhor ação antibiofilme.

REFERÊNCIAS

1. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Aug 28;17(17):6278. doi: 10.3390/ijerph17176278. PMID: 32872324; PMCID: PMC7503635.
2. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Jun 15;80(3):629-61. doi: 10.1128/MMBR.00078-15. PMID: 27307579; PMCID: PMC4981674.
3. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Oct;363(20):fnw219. doi: 10.1093/femsle/fnw219. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27664057.
4. García-Meniño I, Forcelledo L, Rosete Y, García-Prieto E, Escudero D, Fernández J. Spread of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* among COVID-19-infected patients: The storm after the storm. *J Infect Public Health*. 2021 Jan;14(1):50-52. doi: 10.1016/j.jiph.2020.11.001. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33341484; PMCID: PMC7713590.
5. World Health Organization - WHO. Traditional Medicine Strategy 2002–2005 [internet]. World Health Organization: Geneva; 2002. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67163>.
6. World Health Organization (WHO). WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems. Geneva; World Health Organization: 2004. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43034/9241592214_eng.pdf
7. Wang KL, Hsia SM, Chan CJ, Chang FY, Huang CY, Bau DT, et al. Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Apr;17(4):337-49. doi: 10.1517/14728222.2013.756869. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23327692.
8. Li S, Zhu JH, Cao LP, Sun Q, Liu HD, Li WD, et al. Growth inhibitory in vitro effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line. *Neurol Sci*. 2014 Jul;35(7):1115-20. doi: 10.1007/s10072-014-1661-4. Epub 2014 Feb 11. PMID: 24514918.
9. Ahn SJ, Cho EJ, Kim HJ, Park SN, Lim YK, Kook JK. The antimicrobial effects of deglycyrrhized licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both

planktonic and biofilm cultures. *Anaerobe*. 2012 Dec;18(6):590-6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.005. Epub 2012 Oct 30. PMID: 23123832.

10. Long DR, Mead J, Hendricks JM, Hardy ME, Voyich JM. 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):241-7. doi: 10.1128/AAC.01023-12. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23114775; PMCID: PMC3535912.

11. Kwon HJ, Kim HH, Ryu YB, Kim JH, Jeong HJ, Lee SW, et al. In vitro anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Bioorg Med Chem*. 2010 Nov 1;18(21):7668-74. doi: 10.1016/j.bmc.2010.07.073. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20850329.

12. Feng Yeh C, Wang KC, Chiang LC, Shieh DE, Yen MH, San Chang J. Water extract of licorice had anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jul 9;148(2):466-73. doi: 10.1016/j.jep.2013.04.040. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23643542; PMCID: PMC7126896.

13. Chandrasekaran CV, Deepak HB, Thiyagarajan P, Kathiresan S, Sangli GK, Deepak M, et al. Dual inhibitory effect of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™) on COX and LOX products. *Phytomedicine*. 2011 Feb 15;18(4):278-84. doi: 10.1016/j.phymed.2010.08.001. Epub 2010 Sep 22. PMID: 20864324.

14. Wu TY, Khor TO, Saw CL, Loh SC, Chen AI, Lim SS, et al. Anti-inflammatory/Anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*. *AAPS J*. 2011 Mar;13(1):1-13. doi: 10.1208/s12248-010-9239-4. Epub 2010 Oct 22. PMID: 20967519; PMCID: PMC3032091.

15. Mae T, Kishida H, Nishiyama T, Tsukagawa M, Konishi E, Kuroda M, et al. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2003 Nov;133(11):3369-77. doi: 10.1093/jn/133.11.3369. PMID: 14608046.

16. Li J, Lee YS, Choi JS, Sung HY, Kim JK, Lim SS, et al. Roasted licorice extracts dampen high glucose-induced mesangial hyperplasia and matrix deposition through blocking Akt activation and TGF-beta signaling. *Phytomedicine*. 2010 Aug;17(10):800-10. doi: 10.1016/j.phymed.2010.02.004. Epub 2010 Apr 10. PMID: 20382513.

17. Hong YK, Wu HT, Ma T, Liu WJ, He XJ. Effects of *Glycyrrhiza glabra* polysaccharides on immune and antioxidant activities in high-fat mice. *Int J Biol Macromol*. 2009 Jul 1;45(1):61-4. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2009.04.001. Epub 2009 Apr 11. PMID: 19447260.

18. Li X, He X, Liu B, Xu L, Lu C, Zhao H, et al. Maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells induced by Radix Glycyrrhizae polysaccharide. *Molecules*. 2012 May 30;17(6):6557-68. doi: 10.3390/molecules17066557. PMID: 22728353; PMCID: PMC6268382.
19. Abe K, Ikeda T, Wake K, Sato T, Sato T, Inoue H. Glycyrrhizin prevents of lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury through down-regulation of matrix metalloproteinase-9 in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2008 Jan;60(1):91-7. doi: 10.1211/jpp.60.1.0012. PMID: 18251086; PMCID: PMC7166488.
20. Sharifzadeh M, Shamsa F, Shiran S, Karimfar MH, Miri AH, Jalalizadeh H, et al. A time course analysis of systemic administration of aqueous licorice extract on spatial memory retention in rats. *Planta Med*. 2008 Apr;74(5):485-90. doi: 10.1055/s-2008-1074494. Epub 2008 Apr 10. PMID: 18404595.
21. Zhao Z, Wang W, Guo H, Zhou D. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. *Behav Brain Res*. 2008 Dec 1;194(1):108-13. doi: 10.1016/j.bbr.2008.06.030. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18655806.
22. Michel HE, Tadros MG, Abdel-Naim AB, Khalifa AE. Prepulse inhibition (PPI) disrupting effects of *Glycyrrhiza glabra* extract in mice: a possible role of monoamines. *Neurosci Lett*. 2013 Jun 7;544:110-4. doi: 10.1016/j.neulet.2013.03.055. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23583589.
23. Kageyama K, Takayasu S, Moriyama T, Sakihara S, Suda T. A case of pseudoaldosteronism, accompanied with hypocalcemia and exaggerated ACTH response. *Endocr J*. 2004 Feb;51(1):83-7. doi: 10.1507/endocrj.51.83. PMID: 15004413.
24. Räikkönen K, Seckl JR, Heinonen K, Pyhälä R, Feldt K, Jones A, et al. Maternal prenatal licorice consumption alters hypothalamic-pituitary- adrenocortical axis function in children. *Psychoneuroendocrinology*. 2010 Nov;35(10):1587-93. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.04.010. Epub 2010 May 26. PMID: 20510523.
25. Obolentseva GV, Litvinenko VI, Ammosov AS, Popova TP, Sampiev AM. Pharmacological and therapeutic properties of licorice preparations (A review). *Pharm Chem j*. 1999;33(8):427-34. doi: 10.1007/BF02510095
26. Bueno PCP, Abarca LFS, Anhesine NB, Giffoni MS, Pereira FMV, Torres RB, et al. Intraspecific Chemical Variability and Biological Activity of *Casearia sylvestris* from Different Brazilian Biomes. *Planta Med*. 2021 Feb;87(1-02):148-159. doi: 10.1055/a-1301-0183. Epub 2020 Dec 21. PMID: 33348407.
27. Lipinski LC, Wouk AF, da Silva NL, Perotto D, Ollhoff RD. Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. *Afr J Tradit Complement Altern Med*.

2012 Jul 1;9(4):542-7. doi: 10.4314/ajtcam.v9i4.11. PMID: 23983390; PMCID: PMC3746646.

28. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jul;52(1):1. doi: 10.1093/jac/dkg301. Epub 2003 Jun 12. PMID: 12805255.

29. Ušjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. Antimicrobial Activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* 2019 Apr 10;131:186-196. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.015. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30980878.

30. Enioutina EY, Teng L, Fateeva TV, Brown JCS, Job KM, Bortnikova VV, Krepkova LV, Gubarev MI, Sherwin CMT. 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.

31. Irani M, Sarmadi M, Bernard F, Ebrahimi Pour GH, Shaker Bazarnov H. Leaves Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza glabra* L. *Iran J Pharm Res.* 2010 Fall;9(4):425-8. PMID: 24381608; PMCID: PMC3870067.

32. Ribeiro SM, Fracucelli ÉDO, Bueno PCP, de Castro MKV, Francisco AA, Cavaleiro AJ, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2019 Nov 12;19(1):308. doi: 10.1186/s12906-019-2717-z. PMID: 31718633; PMCID: PMC6852947.