



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

SABRINA FERREIRA DOS SANTOS LIBERATO

**EXTRATOS DE ROMÃ E HAMAMÉLIS: existe ação antimicrobiana
sobre cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella
pneumoniae* multirresistentes?**

SABRINA FERREIRA DOS SANTOS LIBERATO

EXTRATOS DE ROMÃ E HAMAMÉLIS: existe ação antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* E *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes?

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

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

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. 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).

Liberato, Sabrina Ferreira dos Santos

Extratos de romã e hamamélis: existe ação antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes? / Sabrina Ferreira dos Santos Liberato. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.
Orientador: Luciane Dias De Oliveira.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. *Punica granatum*. 4. *Hamamelis virginiana*. 5. Medicamentos fitoterápicos. I. De Oliveira, Luciane Dias, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profª Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profª. Dra. Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo

Universidade Paulista (Unip)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de Agosto de 2021.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosana Ferreira dos Santos (*in memorian*) e Adilson Ubiratã Liberato (*in memorian*), por terem me dado o dom da vida.

À minha tia-mãe, Adelice Irani Liberato Pires, por todo amor, carinho e apoio. Agradeço por estar sempre ao meu lado, por ser a minha mãe, meu exemplo e minha amiga. Sou e sempre serei eternamente grata por tudo o que faz por mim!

Aos meus irmãos, Guilherme Augusto dos Santos Brito, Gabriel Vinicius Lopes da Silva, Sara Santos Castelani Coelho, Fernando Liberato Pires e Ticiane Dianari de Melon Liberato. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, por todas as conversas, conselhos e risadas. Agradeço por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Arthur Gonçalves Moreira, por estar sempre ao meu lado, me apoiar e acreditar em mim. Obrigada por ser compreensivo e por dividir a vida comigo.

A minha querida orientadora Luciane Dias de Oliveira, que desde o primeiro dia me trata com muito carinho e está sempre a disposição para me ajudar e ensinar. Sou muito grata a Deus por ter colocado você em minha vida, você me ensinou muitas coisas sobre pesquisa, ciência, empatia, dedicação, perseverança e humildade. Você é uma mulher incrível que eu me orgulho de ter como modelo!

A minha querida e inesquecível professora Vivian Cristina Castilho da Costa Hyodo, seu carinho incondicional e amor sempre me renovam, obrigada por me ensinar tanto sobre a biologia e a vida!

Aos meus companheiros de laboratório, Thaís, Vanessa, Pamela, Ana Luiza,

Ellen, Patrícia e Lucas, obrigada pela amizade, companheirismo e suporte.

Aos meus amigos da graduação, Diogo Nadir, Isabelle Correa, Jean Serão, Jessica Mayume, Monique Lopes, Renata Lorraine e Vivian Faria. Obrigada pelo apoio e carinho infinito! Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo seu infinito amor e bondade, por nunca me desamparar e por me fazer forte nos momentos de aflição.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida, no período de 05/02/2020 até 05/08/2021.

Agradeço a minha orientadora Luciane Dias de Oliveira, pois, sem o seu apoio e orientação eu não teria chegado até aqui. Agradeço a sua imensa dedicação e empenho, por estar sempre disposta a fazer impossível pelos seus alunos e ser tão presente!

A minha companheira de profissão e de laboratório, Thais Cristine Pereira, que foi fundamental para a elaboração deste trabalho. Foi quem me incentivou a fazer o mestrado e me apoiou durante todo o trajeto. Agradeço por sua amizade, pelos dias que dividimos no laboratório, pelos chás da tarde que compartilhamos aos risos e por estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por trazer felicidade e leveza para o meu dia-a-dia.

Ao meu amigo Lucas de Paula Ramos, por todos os ensinamentos, paciência, carinho, risadas e amizade.

As minhas amigas Vanessa e Pamela, que sempre estiveram de prontidão para tirar minhas dúvidas e me ensinar. Agradeço também pelos momentos alegres e descontraídos que compartilhamos.

A minha amiga Mariana Vegian, que me apoiou e acreditou em mim, por todas as nossas conversas, risadas e conselhos. Agradeço também por me apresentar o

PreVest, sem o seu convite e suporte eu nunca teria conseguido coragem para lecionar. Mari maravilha, você é incrível!

Aos meus amigos e colegas Ellen, Patrícia, Juliani, Maíra, Lívia, Leonardo, Daphne, Ju Goncale, Marignês, Simone la Pena, Profa Ucha e Taciano, por sempre estarem dispostos a me ajudar, pelo carinho, amizade e por todos os momentos que passamos juntos.

Às Professoras Liliana Scorzoni, Regina El Dib, Juliana Campos Junqueira, Luana M. R. de Vasconcellos, Marianne Spalding, Cristina Marcucci por estarem sempre dispostas a ajudar e ensinar. Agradeço pelo carinho, carisma e amizade.

Aos membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação Sandra, Carolina e Bruno; do Escritório de Apoio à Pesquisa e Internacionalização Michele e Carlos Guedes, também ao técnico André e à secretária Carla por estarem sempre a disposição para nos ajudar e solucionar nossas dúvidas, por toda gentileza, atenção e carisma.

A minha amiga, professora e bióloga favorita Vivian Hyodo, por ter sido a base de toda a minha formação, por ser meu exemplo e inspiração.

Agradeço aos meus colegas de faculdade Diogo Nadir, Isabelle Correa, Jean Serão, Jessica Mayume, Monique Lopes, Renata Lorraine e Vivian Faria, por alegrarem os meus dias desde a graduação, me apoiarem e estar presente em todos os momentos da minha vida. Jamais encontrarei palavras que expressem adequadamente a minha gratidão a vocês!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Extrato de plantas	16
3.2 Bactérias multirresistentes.....	16
3.3 Atividade antimicrobiana sobre as formas planctônicas das bactérias.....	18
3.3.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM)	18
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes monomicrobiano	20
3.3.2.1 Formação do biofilme	21
3.3.2.2 Tratamento com os extratos.....	22
3.3.2.3 Avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste MTT	22
3.3.3 Teste de sinergismo pelo método de <i>checkerboard</i>	24
3.4 Análise estatística	27
4 RESULTADO	28
4.1 Determinação da CIM e CMM.....	28
4.2 Avaliação do efeito combinado dos extratos <i>P. granatum</i> e <i>H. virginiana</i> ...	29
4.3 Atividade antimicrobiana dos extratos isolados sobre biofilmes monomicrobianos	31
4.4 Atividade antimicrobiana dos extratos combinados sobre biofilmes monotípicos	46
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	64

Liberato SFS. Extratos de romã e hamamélis: existe ação antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes? [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

Acinetobacter baumannii e *Klebsiella pneumoniae* são patógenos prioritários globais resistentes a antibióticos, portanto, é relevante encontrar métodos alternativos para controlá-los, e os fitoterápicos têm sido investigados para essa finalidade. Em vista disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* (hamamélis) e do extrato hidroalcólico de *Punica granatum* (romã) isolados e em combinação sobre cepas ATCC e clínicas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Primeiramente, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Microbicida Mínima (CMM) pelo teste de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), após, o potencial antimicrobiano da combinação entre esses extratos foi analisado sobre esses micro-organismos por meio da técnica “checkerboard”. Posteriormente, a redução da atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada pelo teste de MTT (contato de 5 min e 24h), para tanto a CMM e as duas concentrações acima dela foram utilizadas. A concentração correspondente a 2X a CMM dos extratos combinados foi utilizada no teste de MTT para o tratamento dos biofilmes no tempo de 5 min e 24h. Os extratos isolados e combinados apresentaram ação microbicida contra *A. baumannii* e *K. pneumoniae* na forma planctônica. O extrato de romã apresentou CMM de 1,71 a 3,43 mg/mL para *A. baumannii* e de 3,43 a 13,75 mg/mL para *K. pneumoniae*, enquanto que Hamamélis exibiu CMM de 12,5 a 25 mg/mL para *A. baumannii* e de 25 a 50 mg/mL para *K. pneumoniae*. O uso combinado dos extratos resultou em treze concentrações aditivas para *A. baumannii* e quinze para *K. pneumoniae*. A redução de viabilidade em biofilmes de *A. baumannii* chegou a 64,94% para o extrato de romã, e 83,45% para o extrato de Hamamélis. *K. pneumoniae* apresentou redução máxima de 75,66% com extrato de Romã e de 76,56% com o extrato de Hamamelis. A redução do biofilme variou conforme a concentração e cepa quando tratado com a combinação dos extratos. Com isso, pode-se concluir que os extratos apresentam importante ação antibacteriana e antibiofilme sobre os patógenos avaliados, podendo ser considerados potenciais agentes terapêuticos para o combate destes patógenos.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. *Klebsiella pneumoniae*. *Punica granatum*. *Hamamelis virginiana*. Medicamentos fitoterápicos. Antibacterianos.

Liberato SFS. Pomegranate and witch hazel extracts: is there antimicrobial action on clinical strains of multiresistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae? [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae are global priority antibiotic resistant pathogens, therefore, it is relevant to find alternative methods to control them, and herbal medicines have been investigated for this purpose. In view of this, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the glycolic extract of Hamamelis virginiana (witch hazel) and the hydroalcoholic extract of Punica granatum (pomegranate) isolated and in combination on ATCC and clinical strains of A. baumannii and K. pneumoniae. First, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Microbicide Concentration (MMC) were determined by the broth microdilution test, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), after which the antimicrobial potential of the combination of these extracts was analyzed on these microorganisms through the “checkerboard” technique. Subsequently, the reduction of the metabolic activity of biofilms was evaluated by the MTT test (5 min and 24h contact), for both the CMM and the two concentrations above it were used. The concentration corresponding to 2X the CMM of the combined extracts was used in the MTT test for the treatment of biofilms in a time of 5 min and 24h. The isolated and combined extracts showed microbicidal action against A. baumannii and K. pneumoniae in the planktonic form. The pomegranate extract showed MMC from 1.71 to 3.43 mg/mL for A. baumannii and from 3.43 to 13.75 mg/mL for K. pneumoniae, while Witch Hazel exhibited MMC from 12.5 to 25 mg µg/ml for A. baumannii and from 25 to 50 mg/ml for K. pneumoniae. The combined use of the extracts resulted in thirteen additive concentrations for A. baumannii and fifteen for K. pneumoniae. The viability reduction in A. baumannii biofilms reached 64.94% for the pomegranate extract, and 83.45% for the Witch Hazel extract. K. pneumoniae showed a maximum reduction of 75.66% with Pomegranate extract and 76.56% with Hamamelis extract. Biofilm reduction varied according to concentration and strain when treated with the combination of extracts. Thus, it can be concluded that the extracts have an important antibacterial and antibiofilm action on the evaluated pathogens, and can be considered potential therapeutic agents to combat these pathogens.

Keywords: Acinetobacter baumannii. Klebsiella pneumoniae. Punica granatum. Hamamelis virginiana. Herbal medicines. Antibacterials.

1 INTRODUÇÃO

O primeiro antimicrobiano a ser descoberto foi o arsênico derivado de arsfenamina conhecido como salvarsan, um fármaco sintetizado por Ehrlich em 1910 para tratar a sífilis. Na década de 30, Domagk desenvolveu uma nova classe de antibiótico: as sulfonamidas e, em 1928, Fleming descobriu a penicilina que foi um grande marco na história dos antibióticos (Mohr, 2016; Saga, Yamaguchi, 2009). Os anos seguintes da descoberta da penicilina foram chamados de “idade do ouro”, durante esse período novos antibióticos surgiram. Como previu Fleming a alta demanda de antibióticos levou a população a uma era de abuso, o uso excessivo e inadequado dos antimicrobianos por meio de seleção resultou no surgimento de cepas resistentes (Lobanovska, Pilla, 2017; Mason et al., 2018; Ventola, 2015).

A resistência bacteriana pode ser do tipo intrínseca ou adquirida, a resistência intrínseca é aquela que ocorre devido a uma característica estrutural ou funcional das bactérias, como ocorre com *Klebsiella pneumoniae* que é naturalmente imune a ampicilina devido a produção de β -lactamase e a resistência adquirida pode ocorrer por meio de transdução, conjugação e transformação e podendo ser transferida entre bactérias da mesma espécie e espécies diferentes (Exner et al., 2017). Outra forma de exercer a resistência antimicrobiana é por meio da formação de biofilmes, estruturas formadas por bactérias ligadas entre si e a superfícies envolvidas por uma matriz polimérica extracelular. O biofilme aumenta a resistência bacteriana ao sistema imunológico, a desinfetantes e antibióticos (Banin et al., 2017), quando as bactérias estão na forma de biofilmes apresentam resistência antimicrobiana significativamente maior em relação às células planctônicas (Sun et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos prioritários globais resistentes a antibióticos, nessa lista as bactérias Gram-negativas ganharam um destaque por apresentarem maior resistência a antibióticos quando comparado as Gram-positivas, isso ocorre devido à impermeabilidade relativamente maior na membrana externa das bactérias Gram-negativas (Banin et al., 2017; Hall, Mah, 2017).

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram-negativa que ocupa o

primeiro lugar da lista de patógenos prioritários da OMS e anteriormente era considerado um patógeno de baixo grau, no entanto, tornou-se endêmico em hospitais devido ao rápido desenvolvimento de resistência e à sua notável capacidade de suportar ambientes adversos (Hardin et al., 2018; Lin, Lan, 2014). *A. baumannii* pode ocasionar uma variedade de infecções, como: infecção do trato respiratório inferior (Gai et al., 2019; Grosse-Onnebrink et al., 2019) principalmente pneumonia associada à ventilação mecânica (Metan et al., 2020; Sarda et al., 2019), bacteremia (Zhou et al., 2019), infecção do sistema nervoso central (Liang et al., 2019), pericardite (Liu et al., 2019) e ventriculite (Chen et al., 2019).

De acordo com Centers for Disease Control and Prevention (2013), a maioria das cepas de *A. baumannii* associadas à infecção são multirresistentes e, nos Estados Unidos (EUA), estima-se que 7300 infecções por *A. baumannii* ocorram a cada ano resultando em 500 mortes. Morfin-Otero e Dowzicky (2012) avaliaram o aumento da resistência de *A. baumannii* entre 2004 e 2009 e observaram que no Oriente Médio as maiores taxas de resistência foram apresentadas em 2009 para ceftriaxona (83,6%), piperacilina-tazobactam (82,0%) e ceftazidima (80,3%). Rizk e El-Khier (2019) observaram que metade dos *A. baumannii* isolados de pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) são resistentes aos aminoglicosídeos, amicacina e gentamicina. A resistência a múltiplos antibióticos também foi observada em um hospital do Paquistão, onde 96,7% dos isolados de *A. baumannii* eram multirresistente e 9,6% apresentavam resistência a colistina, que é considerada terapia de última linha para tratar infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente (Al-Kadmy et al., 2020; Hameed et al., 2019). Acredita-se que *A. baumannii* é resistente a quase todos os antibióticos utilizados na prática clínica (Lin, Lan, 2014), e essa resistência é creditada a uma variedade de mecanismos, incluindo a modificação do sítio alvo, enzimas de inativação, bomba de efluxo, porinas, presença de lipopolissacarídeo e a troca de genes de resistência (Abdi et al., 2020; Dijkshoorn et al., 2007; Skariyachan et al., 2019).

Além de *A. baumannii* outra bactéria que merece destaque devido a crescente resistência a múltiplos fármacos é *K. pneumoniae*, que tem sido um grande desafio para os cuidados de saúde em todo o mundo (Gomez-Simmonds, Uhlemann, 2017). *K. pneumoniae* é uma espécie Gram-negativa em forma de bastonete pertencente à família das Enterobacteriaceae conhecida por causar

pneumonia (Gao et al., 2019), infecções do trato urinário (Liu et al., 2020), infecções na corrente sanguínea (Namikawa et al., 2019), fascíte necrosante (Rahim et al., 2019), meningite (Xu et al., 2019) e outras doenças nosocomiais. *K. pneumoniae* está entre os agentes mais desafiadores das infecções hospitalares por apresentar resistência aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, limitando as opções terapêuticas no tratamento clínico das doenças (Blin et al., 2017). Yu et al. (2019) avaliaram o perfil de resistências de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados em um hospital universitário e revelaram que todas as cepas são resistentes aos antibióticos: cefalosporinas, penicilinas, quinolonas e carbapenêmicos. Acredita-se que a resistência a múltiplos fármacos apresentada por *K. pneumoniae* esteja relacionada a presença de plasmídeos (Wang et al., 2020), bomba de efluxo (Lv et al., 2020), cápsula com lipopolissacarídeo (Opoku-Temeng et al., 2019), produção de enzimas (Keshi et al., 2019), entre outros.

A. baumannii e *K. pneumoniae* são as principais causadoras de infecções nosocomiais em todo o mundo, além de serem patógenos prioritários, esses micro-organismos também fazem parte do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae), micro-organismos conhecidos por causar infecções hospitalares e conseguir “escapar” dos antibióticos (Bhagirath et al., 2019; Nakonieczna et al., 2019).

Estudos recentes, realizados em diferentes hospitais, investigaram as infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes e os principais patógenos encontrados foram *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, sendo possível observar que o número de patógenos resistentes aos antibióticos é maior principalmente nas UTIs (Berberian et al., 2019; Lee et al., 2019). A presença desses patógenos em hospitais tem contribuído com o aumento dos danos colaterais da atual pandemia de COVID-19 (Lai et al., 2021). A COVID-19 é uma síndrome respiratória aguda grave causada por um coronavírus denominado SARS-CoV-2, foi relatado pela primeira vez em dezembro de 2019 em uma província chinesa e desde então tem se espalhado pelo mundo (Sharifipour et al., 2020). Cerca de 15% dos pacientes com COVID-19 precisam de tratamento intensivo com suporte de ventilação mecânica, favorecendo o surgimento de infecções nosocomiais. A coinfeção bacteriana em pacientes com infecções virais

respiratórias são causas frequentes de mortalidade em pandemias (Möhlenkamp, Thiele, 2020; Westblade et al., 2021). Ramadan et al. (2020) verificaram que 10,7% dos pacientes internados com COVID-19 em um hospital do Egito apresentaram coinfeção bacteriana, *K. pneumoniae* correspondeu a 28,5% dos isolados e *A. baumannii* foi encontrado em 9,5% das amostras. Resultado semelhante foi obtido por Vijay et al. (2021) que investigou a incidência de coinfeção em pacientes internados em dez hospitais indianos, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* foram os patógenos predominantes nas amostras, correspondendo a 29,3 e 21,07%, respectivamente. Dentre os isolados de *K. pneumoniae* foi observado que 91,7% era resistente a ceftriaxona, 82% resistente a fluoroquinolonas, 79,2% foram resistentes a combinações de inibidores de β -lactamase, piperacilina / tazobactam. *A. baumannii* apresentou resistência a quase todos os antibióticos testados, a maior porcentagem foi observado sobre a ceftazidima (96%), seguida por meropenem (94%).

De acordo com Walsh (2003), todo antibiótico introduzido no uso clínico tem utilização limitada, pois na presença contínua desse antibiótico bactérias serão selecionadas devido aos mecanismos intrínsecos e adquiridos. A busca por fármacos alternativos para o tratamento de infecções microbianas tem aumentado e os fitoterápicos são uma alternativa para superar a resistência microbiana (Siebra et al., 2016). A fitoterapia faz parte da medicina natural, e consiste na utilização dos vegetais para o tratamento de doenças e melhora da saúde (Palharin et al., 2008).

A utilização de plantas para fins terapêuticos é muito antiga e está profundamente relacionada com a evolução do homem. Cerca de 40% dos medicamentos foram desenvolvidos direta ou indiretamente utilizando produtos naturais, assim distribuídos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (Brasil., 2016; Oliveira et al., 2006). Desde a Declaração de Alma-Ata, em 1978, a OMS tem salientado a necessidade de se valorizar o uso de plantas medicinais no contexto terapêutico, acredita-se que aproximadamente 80% da população mundial utilizam plantas ou seus compostos na atenção primária à saúde (Anvisa, 2018). Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), onde se encontram as plantas medicinais que possuem potencial para fornecer produtos de interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde).

Dentre as plantas de interesse do SUS, *Punica granatum* (Punicaceae) popularmente conhecida como romã, é uma árvore utilizada como agente terapêutico desde a antiguidade (Vučić et al., 2019; Wang et al., 2018). *P. granatum* apresenta diversas indicações medicinais, como: radioprotetor (Thotambailu et al., 2018), antifúngico (Bassiri-Jahromi et al., 2018; Kumar et al., 2020), anticâncer (Bassiri-Jahromi, 2018), vasculoprotetores (Wang et al., 2018), antioxidante (Jacob et al., 2018), antidiabético (Barathikannan et al., 2016; Tang et al., 2018), antiviral (Moradi et al., 2019) e antibacteriano (Joshi et al., 2019). Os efeitos terapêuticos de *P. granatum* são atribuídos aos taninos, flavonoides, esteroides, fenólicos, glicosídeos cardíacos, antocianinas, alcalóides e outros fitoquímicos bioativos (Jacob et al., 2018; Trabelsi et al., 2020).

O extrato aquoso de *P. granatum* apresentou ação antimicrobiana sobre algumas espécies de interesse odontológico como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Enterococcus faecalis* (Mallya et al., 2019; Millo et al., 2017) e estudos anteriores também demonstraram a ação de diferentes extratos de *P. granatum* sobre bactérias resistentes de interesse médico como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Khan et al., 2017; Trabelsi et al., 2020). O potencial antibiofilme do extrato de *P. granatum* foi demonstrado sobre biofilmes de *S. aureus* resistente à meticilina, *E. coli*, *Candida albicans*, *S. sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *E. faecalis* e nanopartículas de prata tratadas com extrato etanólico foram capazes de reduzir o biofilme de cepas ATCC de *P. aeruginosa* (Bakkiyaraj et al., 2013; Habibipour et al., 2019; Vahid Dastjerdi et al., 2014). A atividade antibacteriana de *P. granatum* sobre *A. baumannii* e *K. pneumoniae* já foi relatada anteriormente (Khan et al., 2017; Rafiq et al., 2016), porém, não são encontrados na literatura estudos que avaliem a ação do extrato hidroalcolico sobre biofilme de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* multirresistente, portanto, o presente trabalho irá contribuir para uma maior elucidação do potencial antimicrobiano desse extrato.

Assim como *P. granatum*, *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae) é uma planta utilizada na medicina tradicional há muitos anos (Solis-Arevalo et al., 2019) principalmente no tratamento de doenças dermatológicas (Amaturo et al., 2020; Reuter et al., 2010; Trüeb, 2014). Estudos anteriores também comprovam a ação anti-hemorragica, antiviral, anti-câncer, antitripanossoma e antigenotóxico de *H.*

virginiana (Dauer et al., 2003; Habtemariam, 2002; Jain et al., 2016; Sánchez-Tena et al., 2012; Theisen et al., 2014). Os efeitos terapêuticos de *H. virginiana* são atribuídos aos compostos fenólicos, flavonóis e principalmente aos taninos (Duckstein et al., 2012; Duckstein, Stintzing, 2011; Touriño et al., 2008)

A atividade antibacteriana de *H. virginiana* foi avaliada contra culturas planctônicas de *S. aureus* resistente a metilicina, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e mostrou atividade inibidora contra todos os micro-organismos avaliados, além de inibir a toxina produzida por *S. aureus* (Rasooly et al., 2020b). Kiran et al. (2008) descreveram a atividade antibacteriana do hamamelitanino (tanino encontrado na casca de *H. virginiana*) sobre *S. aureus* e *S. epidermidis*, demonstrando que os resultados são interessantes para o tratamento de infecções estafilocócicas. Kirsch et al. (2020) revelaram que o chá de folha de *H. virginiana* reduz a colonização inicial o biofilme em placas de esmalte bovino. A ação antibacteriana de *H. virginiana* é pouco relatada na literatura, esse estudo trará resultados inovadores sobre o efeito antibacteriano e antibiofilme do extrato glicólico de *H. virginiana* sobre os patógenos prioritários *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

Grandes partes dos estudos que avaliam a atividade biológica dos extratos de plantas verificam a sua ação isolada, entretanto, os extratos podem ser utilizados de forma combinada para aumentar a eficácia antimicrobiana e diminuir o surgimento de bactérias resistentes (Shekar et al., 2018), as bactérias resistentes aos fármacos são amplamente registradas na literatura e as infecções causadas por essas bactérias aumentam o tempo de internação dos pacientes (Arefian et al., 2016), custam milhões aos governos (Schmier et al., 2016; Zimlichman et al., 2013) e de acordo com O'Neill, (2016) até o ano de 2050 dez milhões de mortes por ano irão ocorrer devido à resistência antimicrobiana. Diante deste contexto, torna-se necessário investigar a ação antibacteriana dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* isolados e em combinação sobre os patógenos prioritários *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, a fim de elucidar suas propriedades terapêuticas, determinando assim sua aplicabilidade em um processo infeccioso de interesse médico-odontológico.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *P. granatum* e *H. virginiana*, isolados e em combinação, sobre cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *H. virginiana* e do extrato hidroalcolólico de *P. granatum*, isolados e em combinação, sobre as formas planctônicas de quatro cepas clínicas multirresistentes de cada espécie (*A. baumannii* e de *K. pneumoniae*), determinando a Concentração Inibitória e Microbicida Mínima (CIM e CMM), além da atividade sinérgica;
- b) analisar a ação antibiofilme dos extratos isolados e em combinação após contato de 5 min e 24h sobre biofilmes monotípicos das quatro cepas clínicas multirresistentes (*A. baumannii* e de *K. pneumoniae*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extrato de plantas

Os extratos avaliados nesse estudo são: extrato glicólico de *H. virginiana* (lote: 218069) obtido das partes aéreas da planta (folhas e flores) com concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol e o extrato hidroalcólico de *P. granatum* (lote:0016300120) obtido a partir da casca do fruto desidratado com teor alcoólico de 50 a 60%, na concentração de 55 mg/mL, ambos adquiridos da empresa Apis Flora® (Ribeirão Preto, SP).

3.2 Bactérias multirresistentes

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada sobre quatro cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* (Quadro 1).

Quatro cepas de *A. baumannii* foram fornecidas pelo Laboratório do Hospital Regional de São José dos Campos – SP, e as outras quatro cepas clínicas de *K. pneumoniae* foram fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlín de São José dos Campos, estado de São Paulo (Quadros 2 e 3).

Quadro 1 - Cepas bacterianas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* utilizadas nesse estudo

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ATCC 19606	ATCC 4352
H557	1533557
566006	884724
58004	426533
86005	820195

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *K. pneumoniae* fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin

Antibiótico	Cepas de <i>K. pneumoniae</i>			
	1533557	884724	426533	820195
Ácido clavulânico + Amoxi.	-	R	R	R
Amicacina	-	S	S	S
Ampicilina	-	R	R	R
Ampicilina + Sulbac.	-	R	R	R
Aztreonam	-	S	R	-
Cefepime	-	R	R	R
Cefotaxima	-	S	R	-
Cefoxitina	-	R	R	R
Ceftazidima	-	I	R	-
Cefuroxime	-	R	R	R
Ciprofloxacina	R	R	R	R
Clindamicina	S	-	-	-
Cloranfenicol	S	-	-	-
Colistina	-	S	S	R
Daptomicina	S	-	-	-
Eritromicina	R	-	-	-
Ertapenem	-	R	R	R
Fosfomicina	-	R	-	R
Gentamicina	R	R	R	S
Imipenem	-	S	R	R
Levofloxacina	-	R	R	R
Linezolida	S	-	-	-
Meropenem	-	S	R	R
Minociclina	S	-	-	-
Oxacilina	R	-	-	-
Piperacilina + Tazobactam	-	R	R	R
Rifampicina	S	-	-	-
Tigeciclina	-	S	I	S
Tobramicina	-	R	R	S
Trimetropim/Sulfa.	S	R	R	R
Vancomicina	S	-	-	-

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

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

Quadro 3 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *A. baumannii* fornecidas pelo Laboratório do Hospital Regional de São José dos Campos – SP

Antibiótico	Cepas de <i>A. baumannii</i>			
	H557	566006	58004	86005
Ertapenem	R	R	R	R
Imipenem	R	R	R	R
Meropenem	R	R	R	R

Legenda: R: Resistente.

Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório do Hospital Regional de São José dos Campos – SP.

3.3 Atividade antimicrobiana sobre as formas planctônicas das bactérias

3.3.1 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM)

Para determinar a CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), normas M07-A9 (2012) que descreve testes com bactérias. A diluição dos extratos foi realizada em microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai, Índia) em cada poço, para cada grupo experimental de micro-organismo foi utilizado 10 poços. Após, 100 µL do extrato puro (*P. granatum* com 55 mg/mL de concentração ou *H. virginiana* com 200 mg/mL de concentração) foram adicionados apenas no primeiro poço de cada grupo, e a partir deste poço foram realizadas 10 diluições seriadas. As diluições testadas estão demonstradas no Quadro 4.

Quadro 4 – Diluições dos extratos para a determinação da CIM e CMM

Concentrações dos Extratos (mg/mL) em Microdiluição										
Poço	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
<i>P. granatum</i>	13,75	6,87	3,43	1,71	0,85	0,42	0,21	0,1	0,05	0,02
<i>H. virginiana</i>	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09

Fonte: Elaborado pelo autor.

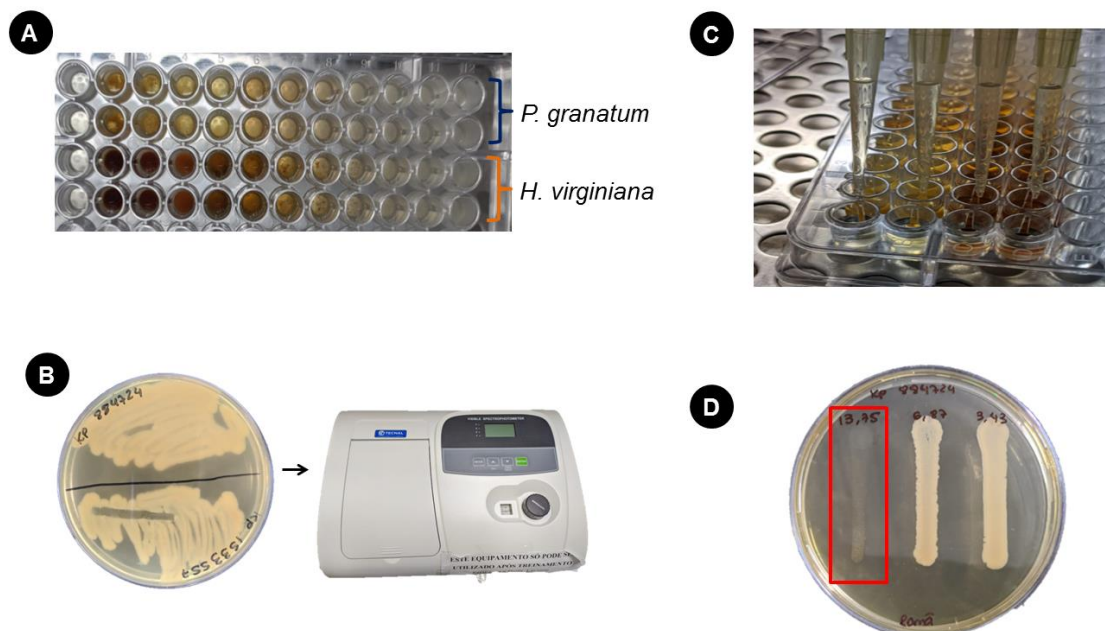
Após, o preparo das diluições dos extratos, foi iniciado o preparo da suspensão de micro-organismos. Primeiramente as cepas de micro-organismos foram descongeladas, semeadas em placa de petri contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI - Himédia) e incubadas a 37°C por 24h para que fossem reativadas.

Passado o período de incubação, uma alíquota da colônia bacteriana foi diluída em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e a suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 625 nanômetros (nm) e densidade óptica de 0,08 (aproximadamente 10^8 células/mL) da qual se fez diluições para obter 10^6 células/mL, conforme recomendações da CLSI. Após a padronização, 100 µL da solução com os micro-organismos foram adicionados nos poços contendo as diluições dos extratos.

A coluna 1 da microplaca de 96 poços foi utilizada como controle negativo, ou seja, nos poços dessa coluna foram adicionado 200 µL meio *Mueller Hinton*. Para controle positivo a coluna 12 foi utilizada, aos poços dessa coluna foram adicionados 100 µL de meio *Mueller Hinton* e 100 µL da solução padronizada de micro-organismo. Após a adição do micro-organismo a microplaca ficou incubada em estufa por 24h a 37°C. Os testes foram realizados em duplicata. Após a incubação, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvação.

Para que a CMM dos extratos fosse determinada, 10 µL da CIM, da concentração anterior e da concentração posterior a ela foram semeado em ágar BHI pela técnica de gota, sendo a placa inclinada em ângulo de 90° para a gota escorrer. Após 48h de incubação, foi avaliado o crescimento de colônias, a CMM foi determinada na menor concentração semeada onde não houve crescimento de colônias (Figura 1).

Figura 1 – Sequência representativa do procedimento para a determinação da CIM e CMM dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana*



Legenda: A) extratos diluídos em microplaca contendo meio de cultura *Mueller Hinton*; B) Exemplo de cepa semeada para padronização em espectrofotômetro; C) Inóculo padronizado sendo adicionado a diluições dos extratos; D) Resultado da CMM após incubação por 24h a 37 °C; Caixa vermelha: indicação da CMM determinada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

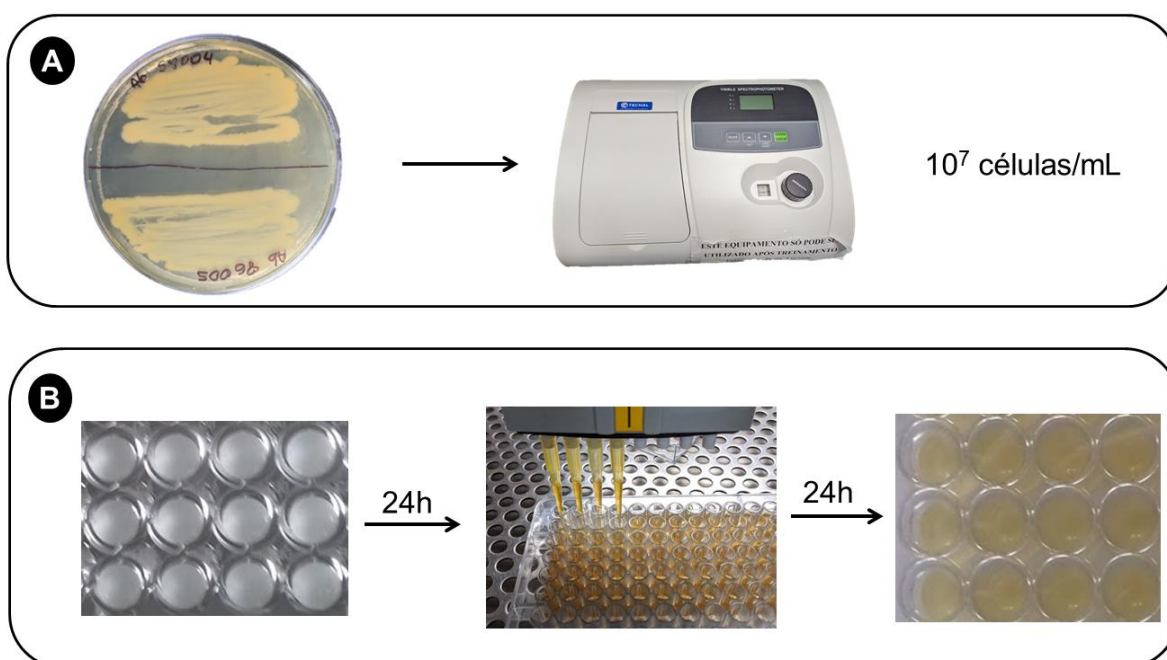
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes monomicrobiano

A partir dos resultados obtidos pelo teste de microdiluição em caldo, as concentrações dos extratos (*H. virginiana* e *P. granatum*) acima da CMM foram testadas sobre biofilmes monotípicos *in vitro*.

3.3.2.1 Formação do biofilme

Primeiramente os micro-organismos foram semeados em ágar BHI e incubados por 24 h em estufa a 37°C. Após incubação, foi realizada a suspensão em salina (NaCl 0,9%) e padronização em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) contendo 10^7 células/mL. Para a formação dos biofilmes monotípicos foram adicionados 100 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - HiMedia®, Mumbai, Índia) por poço da microplaca de 96 poços (N=12/grupo) e adicionados também 100 µL de suspensão microbiana padronizada. As microplacas ficaram incubadas por 24h em estufa a 37 °C com agitação de 75 rpm. Após esse período, o meio de cultura foi trocado e a microplaca ficou incubada por mais 24 h nas mesmas condições, totalizando um período de formação de biofilme de 48 h (Figura 2).

Figura 2 – Sequência representativa do preparo do biofilme monomicrobiano



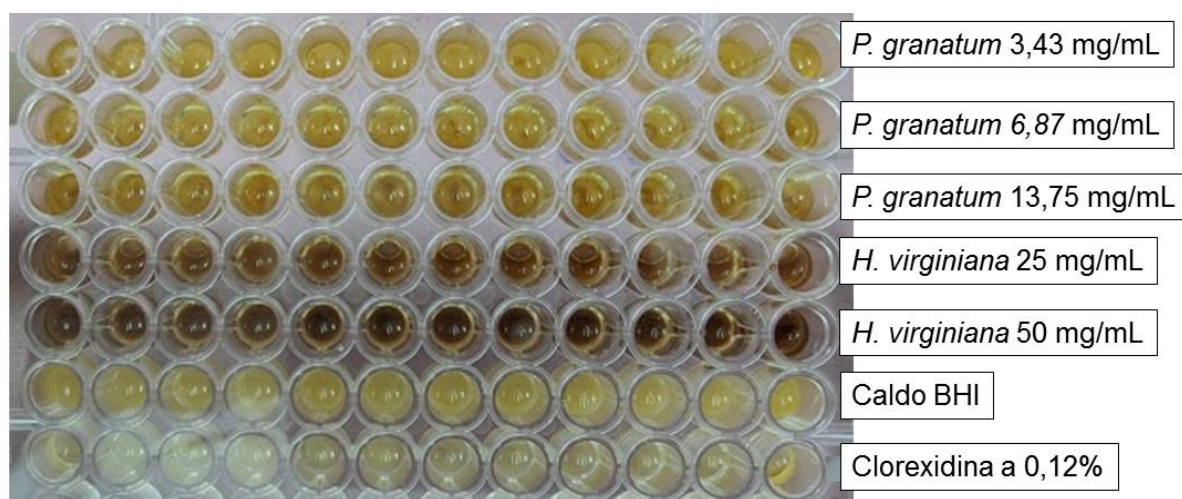
Legenda: A) Cepa semeada para padronização em espectrofotômetro contendo 10^7 células/mL; B) Poços de microplaca com caldo BHI e inóculo padronizado após incubação de 48h com formação de biofilme no fundo da placa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2.2 Tratamento com os extratos

Após a formação dos biofilmes, os mesmos foram colocados em contato com os extratos *P. granatum* e *H. virginiana* (isolados e em combinação) por 5 min e 24 h em concentrações a partir da CMM. Para o controle positivo foi utilizada a clorexidina 0,12% e o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - HiMedia®, Mumbai, Índia) foi utilizado como controle negativo, para todos os tratamentos foi utilizado o volume de 200 µL/poço. Posteriormente, as soluções foram descartadas e o biofilme lavado duas vezes com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Figura 3).

Figura 3 – Figura representativa dos respectivos tratamentos sobre o biofilme



Fonte: Elaborado pelo autor.

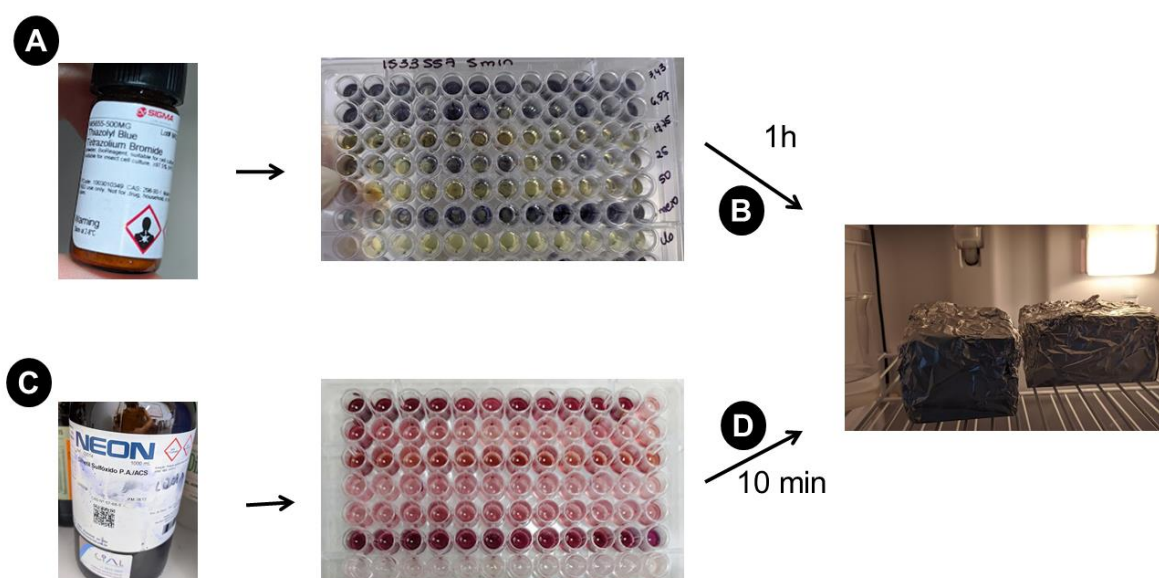
3.3.2.3 Avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste MTT

Para verificar o efeito antimicrobiano dos tratamentos foi realizado o teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) que indica a viabilidade celular da bactéria, através da análise da atividade metabólica. Para

tanto, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (~0,5%, Sigma Aldrich Co.®, Alemanha) em cada poço e a microplaca ficou incubada por 1 h ao abrigo da luz a 37 °C. Em seguida a solução de MTT foi retirada e 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço, a placa ficou 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 (Figura 4). Em seguida a placa foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm e as densidades ópticas obtidas foram convertidas em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo por meio da fórmula abaixo:

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

Figura 4 – Metodologia para avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste MTT



Legenda: A) Adição de 100 µL da solução de MTT em cada poço da microplaca; B) Incubação pelo período de 1h a 37°C ao abrigo da luz; C) Adição de 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO) em cada poço da microplaca; D) Incubação pelo período de 10 min a 37°C ao abrigo da luz, para posterior agitação e leitura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.3 Teste de sinergismo pelo método de *checkerboard*

O efeito da combinação dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* foi avaliado pela técnica *checkerboard* (tabuleiro de xadrez), de acordo com Fratini et al. (2017); Lee et al. (2011); Scandorieiro et al. (2016) e Solarte et al. (2017), com modificações.

A CMM de cada extrato isolado foi utilizada como referências para avaliar o efeito combinado dos extratos. Inicialmente em microplacas de 96 poços foram adicionados 50 µL de meio de cultura *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai, Índia), nos poços da coluna (vertical) foram adicionado 50 µL do extrato de *H. virginiana* e a partir deste foram realizadas 9 diluições seriadas contendo 50 µL. A diluição seriada do segundo extrato (*P. granatum*) foi realizada separadamente em uma placa de 24 poços, posteriormente 50 µL de cada concentração do extrato foram distribuídos em cada poço das linhas (horizontal) da microplaca, para obter todas as concentrações possíveis dos dois extratos (Quadro 5).

Quadro 5 – Esquema representativo da combinação do extrato de *H. virginiana* e *P. granatum* na microplaca de 96 poços, simulando a técnica do tabuleiro de xadrez

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	6,87 25	6,87 12,5	6,87 6,25	6,87 3,12	6,87 1,56	6,87 0,78	6,87 0,39	6,87 0,19	6,87 0,09	6,87 0,04	13,75
B	C-	3,43 25	3,43 12,5	3,43 6,25	3,43 3,12	3,43 1,56	3,43 0,78	3,43 0,39	3,43 0,19	3,43 0,09	3,43 0,04	6,87
C	C-	1,71 25	1,71 12,5	1,71 6,25	1,71 3,12	1,71 1,56	1,71 0,78	1,71 0,39	1,71 0,19	1,71 0,09	1,71 0,04	3,43
D	C-	0,85 25	0,85 12,5	0,85 6,25	0,85 3,12	0,85 1,56	0,85 0,78	0,85 0,39	0,85 0,19	0,85 0,09	0,85 0,04	1,71
E	C-	0,42 25	0,42 12,5	0,42 6,25	0,42 3,12	0,42 1,56	0,42 0,78	0,42 0,39	0,42 0,19	0,42 0,09	0,42 0,04	0,85
F	C-	0,21 25	0,21 12,5	0,21 6,25	0,21 3,12	0,21 1,56	0,21 0,78	0,21 0,39	0,21 0,19	0,21 0,09	0,21 0,04	0,42
G	C-	0,10 25	0,10 12,5	0,10 6,25	0,10 3,12	0,10 1,56	0,10 0,78	0,10 0,39	0,10 0,19	0,10 0,09	0,10 0,04	0,21
H	C-	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,1

Legenda: esquema das diluições combinadas dos extratos, onde as concentrações de *H. virginiana* estão representadas na cor preta e as concentrações de *P. granatum* pela cor vermelha. O controle negativo está representado por C-.

Fonte: Elaborado pelo autor.

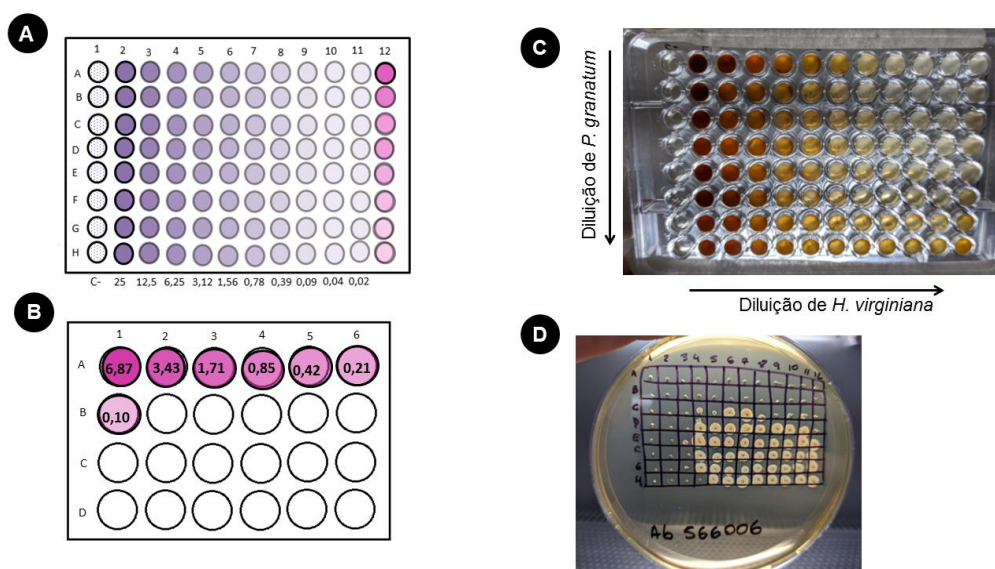
Na coluna 1 da microplaca foram adicionados 200 µL de meio de cultura *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai, Índia) para o controle de esterilidade (C-). Na Linha H e na coluna 12 foi realizado o teste de CMM dos extratos isolados. Posterior às diluições foi acrescentado 100 µL do inóculo padronizado contendo 10^6 células/mL. Após incubação por 24 h a 37°C, com o auxílio de uma haste estéril foi coletado uma alíquota de cada poço da microplaca de 96 poços e transferido para uma placa de petri contendo ágar BHI, essa placa ficou em estufa por 24h a 37°C, passado esse período foi possível analisar em quais concentrações não houve crescimento de micro-organismo e a CMM foi determinada (Figura 5) (Fratini et al., 2017; Lee et al., 2011; Solarte et al., 2017). Para a avaliação da interação entre os extratos foi feito o calculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), o ICIF é a soma das concentrações inibitórias fracionadas de cada um dos extratos, que é definido como o MMC de cada extrato combinado dividido pelo MMC do extrato sozinho conforme representado na formula a seguir:

ICIF: (CMM *P. granatum* na combinação) + (CMM *H. virginiana* na combinação)

(CMM *P. granatum*)(CMM *H. virginiana*)ICIF: CIF (*P. granatum*) + CIF (*H. virginiana*)

A combinação será considerada sinérgica quando o ICIF $\leq 0,5$, aditivo quando ICIF $> 0,5$ e ≤ 1 , indiferente quando ICIF > 1 e < 4 e antagonista quando o ICIF for ≥ 4 (Lee et al., 2011; Scandorieiro et al., 2016).

Figura 5 – Representação da metodologia do *checkerboard*



Legenda: A) Representa a microplaca de 96 poços contendo as concentrações diluídas do extrato de *H. virginiana*. B) Demonstra a placa de 24 poços contendo as concentrações diluídas do extrato de *P. granatum*. C) Microplaca de 96 poços com a combinação dos extratos diluídos. D) Placa de petri com a CMM dos extratos combinados após 24h de incubação a 37 °C.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos que apresentaram distribuição normal foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%, os dados que não passaram pelo teste de normalidade foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* com nível de significância de 5%.

4 RESULTADO

4.1 Determinação da CIM e CMM

Durante o ensaio de microdiluição foi observada a turvação do meio devido a coloração do extrato, não sendo possível determinar a CIM, portanto, nesse estudo o valor da CMM será considerado para os ensaios de biofilme e *checkerboard*.

Os extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* apresentaram concentração microbica para todas as cepas avaliadas (Tabelas 1 e 2). O extrato de *P. granatum* exibiu o melhor resultado para ambas as espécies bacterianas, os valores de CMM variou de 1,71 a 3,43 mg/mL para *A. baumannii* e 3,43 a 13,75 mg/mL para *K. pneumoniae*. O extrato de *H. virginiana* foi microbica para *A. baumannii* nas concentrações de 12,5 e 25 mg/mL e para *K. pneumoniae* os valores de CMM foram de 25 e 50 mg/mL.

Tabela 1 – CMM dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* para cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *A. baumannii*

Cepas de <i>A. baumannii</i>	CMM de <i>P. granatum</i>	CMM de <i>H. virginiana</i>
ATCC 19606	1,71 mg/mL	12,5 mg/mL
58004	3,43 mg/mL	12,5mg/mL
86005	1,71 mg/mL	25 mg/mL
566006	1,71 mg/mL	25 mg/mL
H557	1,71 mg/mL	25 mg/mL

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – CMM dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* para cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae*

Cepas de <i>K. pneumoniae</i>	CMM de <i>P. granatum</i>	CMM de <i>H. virginiana</i>
ATCC 4352	13,75 mg/mL	25 mg/mL
1533557	3,43 mg/mL	25 mg/mL
884724	13,75 mg/mL	25 mg/mL
426533	13,75 mg/mL	50 mg/mL
820195	3,43 mg/mL	25 mg/mL

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Avaliação do efeito combinado dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana*

A combinação dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* (Tabela 3) apresentou valores aditivos ($ICIF > 0,5$ e ≤ 1) para as cepas 86005, 566006 e H557 de *A. baumannii* e para as cepas 820195, 426533 e 884724 de *K. pneumoniae*. *P. granatum* reduziu o valor da CMM em até 17x para *A. baumannii* e 16x em *K. pneumoniae*, já o extrato de *H. virginiana* reduziu 2x o valor da CMM para *A. baumannii* e 32x em *K. pneumoniae*. Para a cepa 1533557 de *K. pneumoniae* e 58004 de *A. baumannii* o efeito combinado dos extratos foi indiferente ($ICIF > 1$ e < 4).

Tabela 3 – Valores da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* isolados e combinados, e a verificação da atividade da combinação sobre cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *A. baumannii*

Cepa	CMM isolado		CMM combinado		ICIF	Redução da CMM		Atividade
	Pg	Hv	Pg	Hv		Pg	Hv	
ATCC 19606	3,43	25	1,71	12,5	1	2	2	Aditivo
ATCC 19606	3,43	25	0,85	12,5	0,75	4	2	Aditivo
ATCC 19606	3,43	25	0,42	12,5	0,62	8	2	Aditivo
ATCC 19606	3,43	25	0,21	12,5	0,56	16	2	Aditivo
ATCC 19606	3,43	25	0,1	12,5	0,53	34	2	Aditivo
ATCC 19606	3,43	25	1,71	3,12	0,62	2	8	Aditivo
Ab 86005	1,71	25	0,85	12,5	0,99	2	2	Aditivo
Ab 86005	1,71	25	0,42	12,5	0,74	4	2	Aditivo
Ab 86005	1,71	25	0,21	12,5	0,62	8	2	Aditivo
Ab 86005	1,71	25	0,1	12,5	0,55	17	2	Aditivo
Ab 566006	1,71	25	0,85	12,5	0,99	2	2	Aditivo
Ab H557	1,71	25	0,85	12,5	0,99	2	2	Aditivo
Ab H557	1,71	25	0,42	12,5	0,74	4	2	Aditivo

Legenda: Pg: *Punica granatum*; Hv: *Hamamelis virginiana*; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Valores da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* isolados e combinados, e a verificação da atividade da combinação sobre cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae*

Cepa	CMM isolado		CMM combinado		ICIF	Redução da CMM		Atividade
	Pg	Hv	Pg	Hv		Pg	Hv	
ATCC 4352	13,75	25	3,43	12,5	0,74	4	2	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	6,87	25	1	2	2	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	6,87	12,5	0,75	2	4	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	6,87	6,25	0,62	2	8	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	6,87	3,12	0,56	2	16	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	6,87	1,56	0,53	2	32	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	3,43	25	0,75	4	2	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	3,43	12,5	0,5	4	4	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	1,71	25	0,62	8	2	Aditivo
Kp 426533	13,75	50	0,85	25	0,56	16	2	Aditivo
Kp 884724	13,75	25	6,87	12,5	1	2	2	Aditivo
Kp 884724	13,75	25	6,87	6,25	0,75	2	4	Aditivo
Kp 820195	3,43	25	1,71	12,5	1	2	2	Aditivo
Kp 820195	3,43	25	1,71	6,25	0,75	2	4	Aditivo
Kp 820195	3,43	25	1,71	3,12	0,62	2	8	Aditivo

Legenda: Pg: *Punica granatum*; Hv: *Hamamelis virginiana*; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Atividade antimicrobiana dos extratos isolados sobre biofilmes monomicrobianos

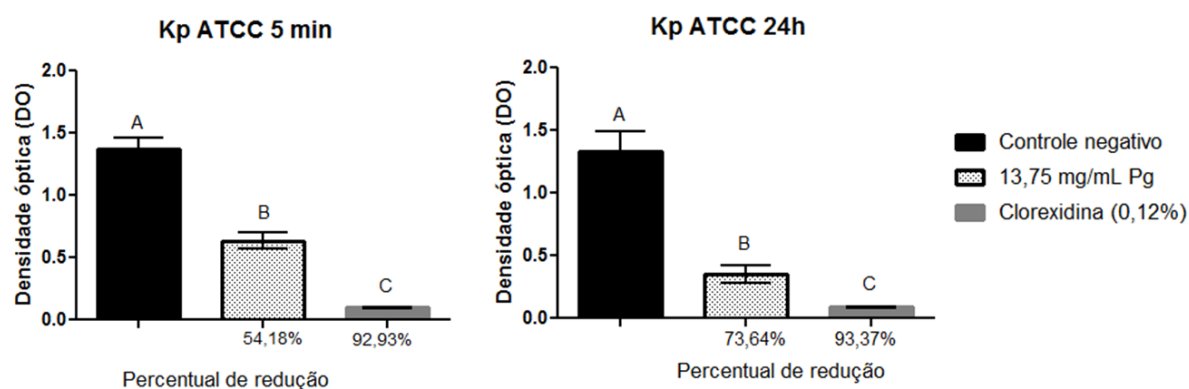
Para os testes em biofilme a CMM e as duas concentrações acima foram utilizadas.

O Extrato de *P. granatum* na concentração de 13,75 mg/mL promoveu a redução de 54,18% do biofilme da cepa ATCC 4253 após tratamento de 5 minutos. A aplicação por 24h da mesma concentração promoveu redução de 73,64% do biofilme (Figura 6).

O extrato de *H. virginiana* após contato de 5 min promoveu as reduções de 20,98% e 35,52% do biofilme da cepa ATCC 4253 com as concentrações de 25 e 50

mg/mL, respectivamente. E o extrato aplicado por 24 horas promoveu uma redução de 84,38% com a concentração de 25 mg/mL, enquanto a concentração de 50 mg/mL reduziu 77,53% do biofilme (Figura 7).

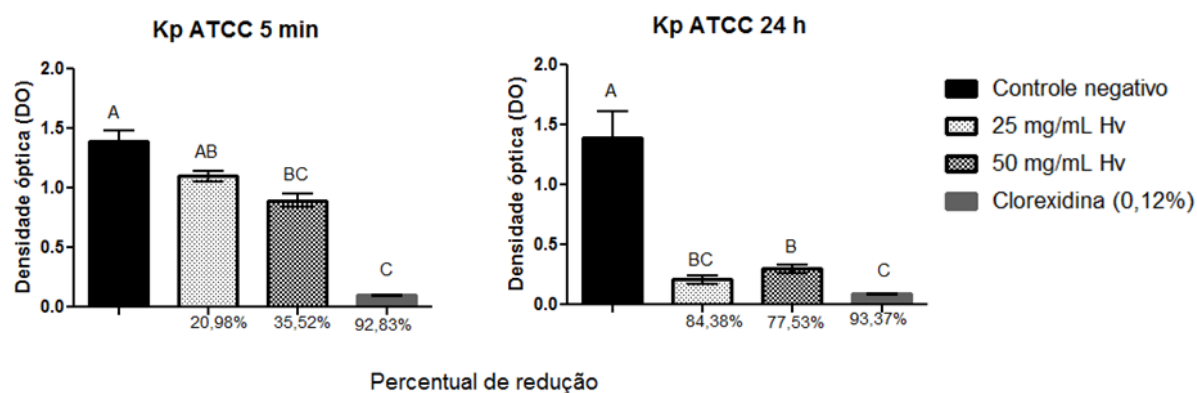
Figura 6 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa ATCC 4253 por 5 minutos e 24 horas



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa ATCC 4253



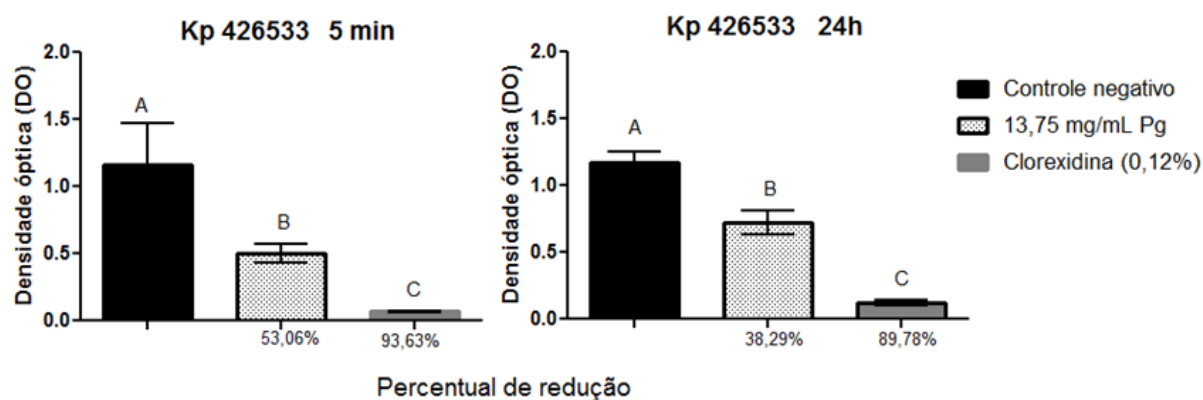
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b" e "c" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato de *P. granatum* na concentração de 13,75 mg/mL reduziu 53,06% da atividade metabólica da cepa Kp 426533 após tratamento de 5 min. E no tratamento de 24h a mesma concentração reduziu 38,29% do biofilme (Figura 8).

O tratamento com o extrato de *H. virginiana* na concentração de 50 mg/mL promoveu redução significativa ($p \leq 0.05\%$) do biofilme da cepa Kp 426533, tanto no tratamento de 5 min quanto no tratamento de 24h, conforme observado na Figura 9. Sendo que a exposição de 24h apresentou maior porcentagem de redução (76,56%) em comparação com o tratamento de 5 min (64,18%).

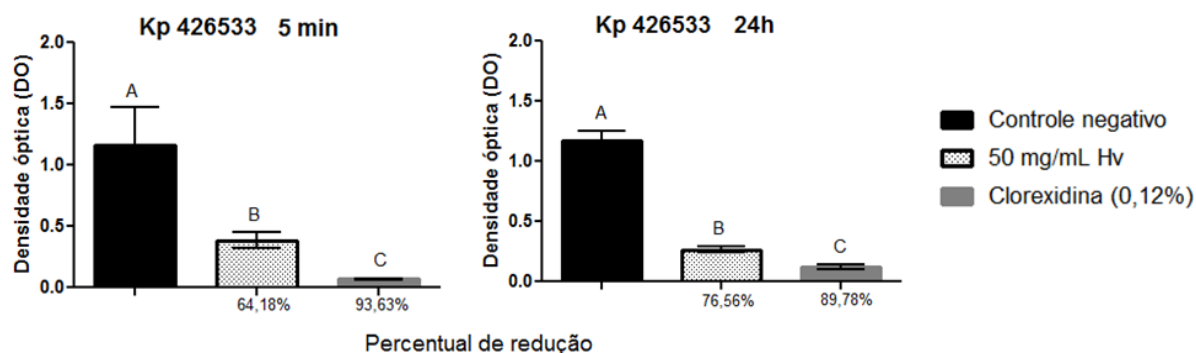
Figura 8 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Kp 426533



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Kp 426533



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

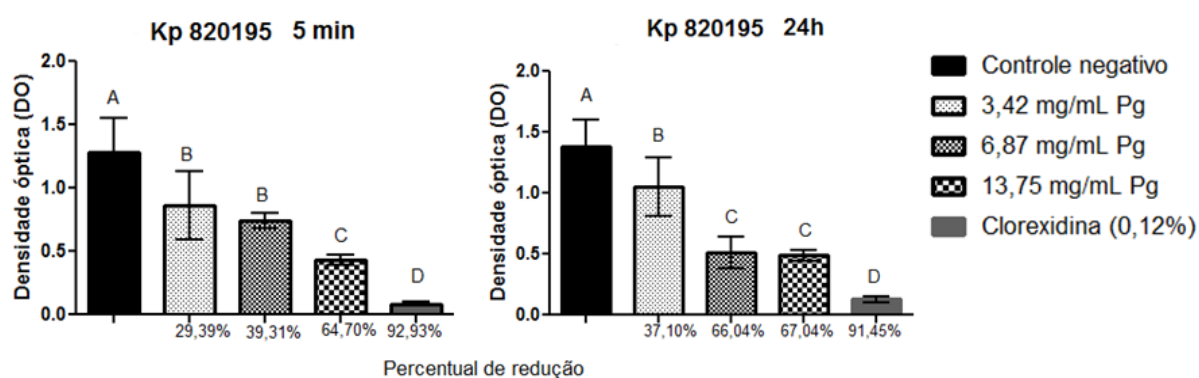
Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato de *P. granatum* reduziu significativamente ($p \leq 0,05\%$) o biofilme da cepa Kp 820195 em todas as concentrações testadas. O biofilme foi reduzido em 29,39% quando tratada com 3,42 mg/mL do extrato por 5 min, 6,87 mg/mL reduziu

39,31% e 13,75 mg/mL reduziu 64,70% do biofilme. Todos os grupos tratados pelo período de 24h apresentaram redução com significância estatística ($p \leq 0,05\%$) comparado ao grupo controle (Figura 10).

Para a cepa 820195 o tratamento por 5 min com as concentrações de 25 e 50 mg/mL do extrato de *H. virginiana* promoveram a redução de 68,83% e 76,36%, respectivamente. E no tratamento por 24h o extrato reduziu 68,34% e 62,58% nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, respectivamente. Em ambos os períodos de tratamento houve significância estatística de $p \leq 0,05\%$ entre os tratamentos e o grupo controle (Figura 11).

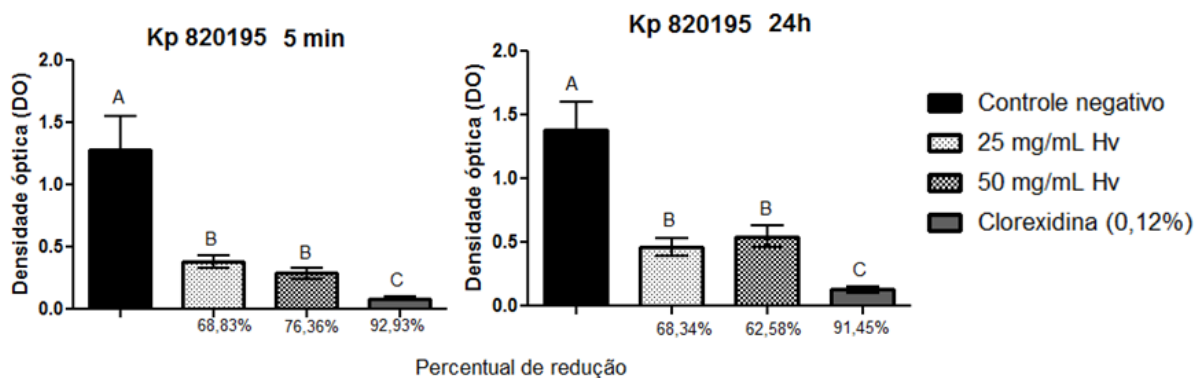
Figura 10 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Kp 820195 por 5 minutos e 24 horas



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Kp 820195 por 5 minutos e 24 horas



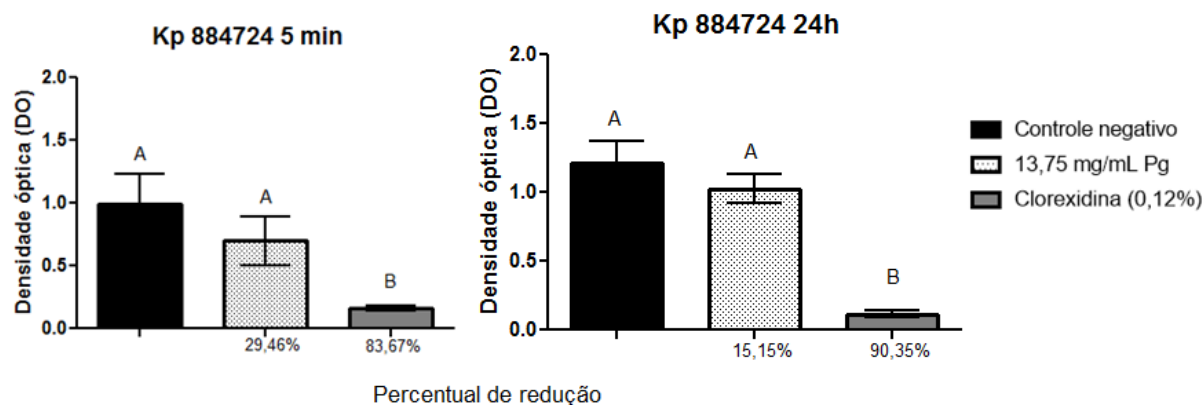
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min e 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b" e "c" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A cepa Kp 884724 foi a que apresentou maior resistência ao tratamento com o extrato de *P. granatum* na concentração de 13,75 mg/mL, tanto no período de 5 min quanto 24h não houve diferença estatística ($p \leq 0,05\%$) na redução do biofilme em relação ao grupo controle (Figura 12).

O tratamento por 5 min com o extrato de *H. virginiana* na concentração de 25 mg/mL reduziu o biofilme em 40,84%, 50 mg/mL foi capaz de reduzir 50,30%. O extrato na concentração de 25 mg/mL reduziu 75,28% do biofilme após 24h de tratamento, o resultado foi semelhante estatisticamente ($p \leq 0,05\%$) ao grupo tratado com clorexidina (0,12%) (Figura 13).

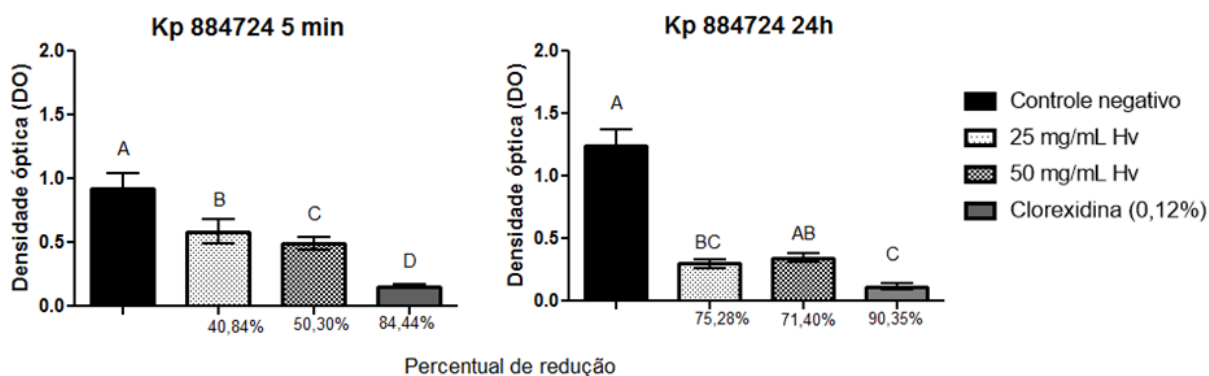
Figura 12 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Kp 884724 por 5 minutos e 24 horas



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min e 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a" e "b" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Kp 884724 por 5 minutos e 24 horas.



Legenda: Os dados do tratamento de 5min apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

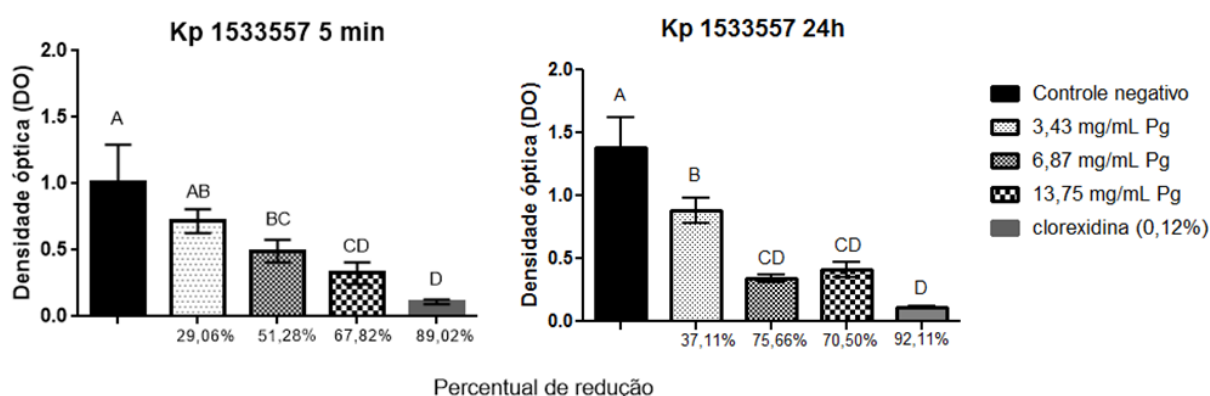
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a cepa Kp 1533557 o extrato de *P. granatum* na concentração de 3,43 mg/mL reduziu 29,06% do biofilme após tratamento por 5 min. Com 6,87 mg/mL a

redução promovida foi de 51,28% e com 13,75 mg/mL a redução foi de 67,82%. As mesmas concentrações foram avaliadas sobre o biofilme pelo período de 24h e todos apresentaram reduções significativas estatisticamente ($p \leq 0,05\%$), sendo que as concentrações 6,87 e 13,75 mg/mL não tiveram diferenças estatísticas em relação ao grupo clorexidina, conforme mostra a Figura 14.

O extrato de *H.virginiana* também demonstrou ação antibiofilme para a cepa Kp 1533557, onde a concentração de 25 mg/mL reduziu 29,91% do biofilme e 50 mg/mL reduziu 60,14%, após contato de 5 min. No tratamento por 24h as reduções foram significativas estatisticamente ($p \leq 0,05\%$) e com similaridade entre as diferentes concentrações, na concentração de 25 mg/mL houve redução de 50,59% do biofilme e com 50 mg/mL a redução foi de 55,81%, conforme Figura 15.

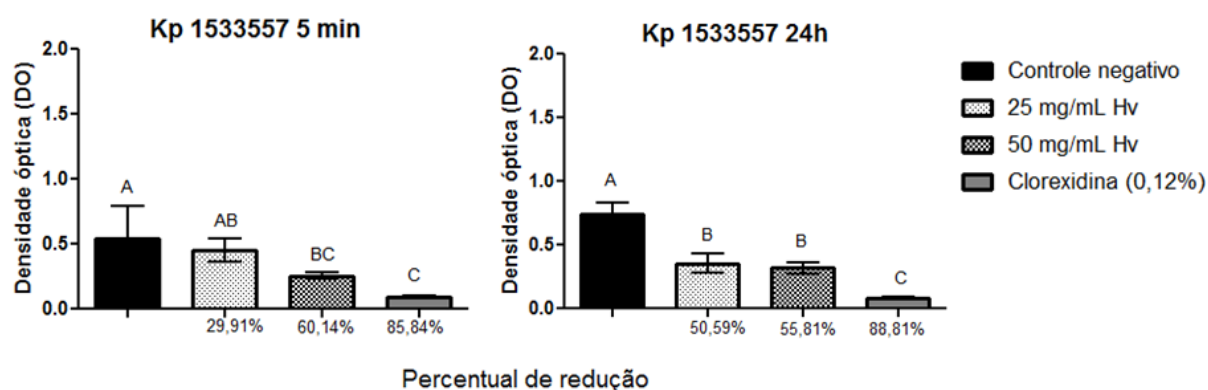
Figura 14 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Kp 1533557



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min e 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Kp 1533557



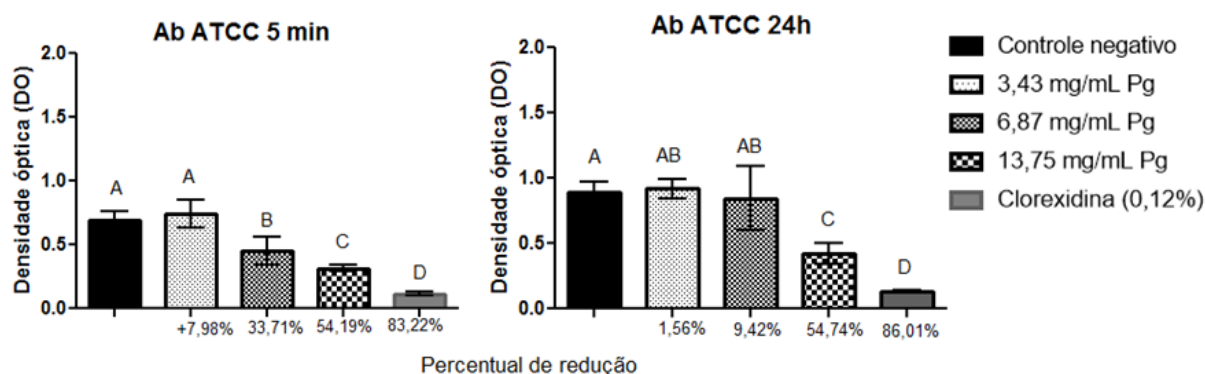
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento por 5 min da cepa ATCC de *A. baumannii* com o extrato de *P. granatum* nas concentrações de 6,87 e 13,75 mg/mL apresentaram reduções estatisticamente significante ($p \leq 0,05\%$) quando comparadas ao grupo controle de crescimento, com reduções de 33,71% e 54,19%, respectivamente. A concentração de 3,43 mg/mL promoveu o crescimento do biofilme em 7,98%, demonstrando semelhança estatística em relação ao grupo controle de crescimento. Após a exposição por 24h o extrato nas concentrações de 3,43 e 6,87 mg/mL reduziu 1,56% e 9,42% do biofilme, respectivamente. Não apresentando diferença estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo controle. Já o extrato na concentração de 13,75 mg/mL reduziu 54,74% do biofilme, mostrando diferença estatística com o grupo controle (Figura 16).

Ab ATCC após 5 min de exposição ao extrato de *H. virginiana* na concentração de 25 mg/mL teve seu biofilme reduzido em 14,54% e 50 mg/mL diminuiu 42,63% do biofilme. Quando comparado ao grupo controle todos os grupos testes obtiveram redução com significância estatística ($p \leq 0,05\%$). Após exposição por 24h ao extrato na concentração de 25 mg/mL houve redução de 33,97% do biofilme e 50 mg/mL promoveu a redução de 59,18%, os valores podem ser observados na Figura 17.

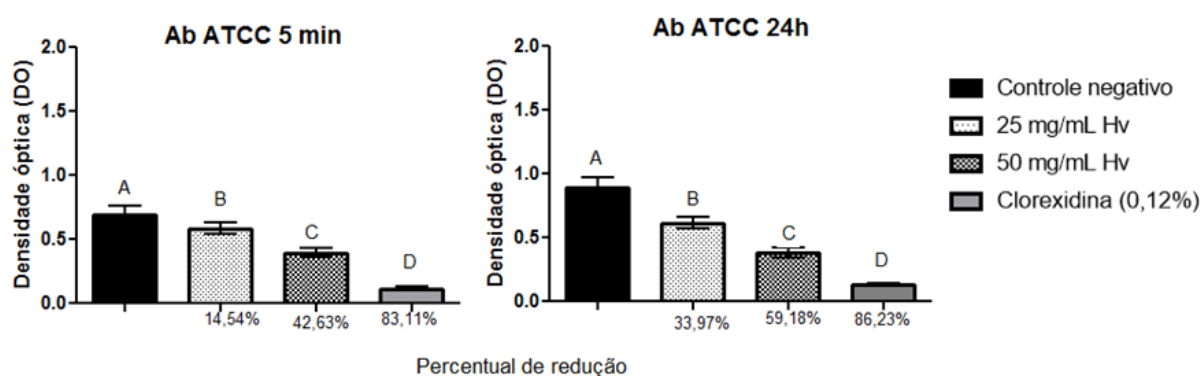
Figura 16 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Ab ATCC por 5 minutos e 24 horas



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Ab ATCC por 5 minutos e 24 horas



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

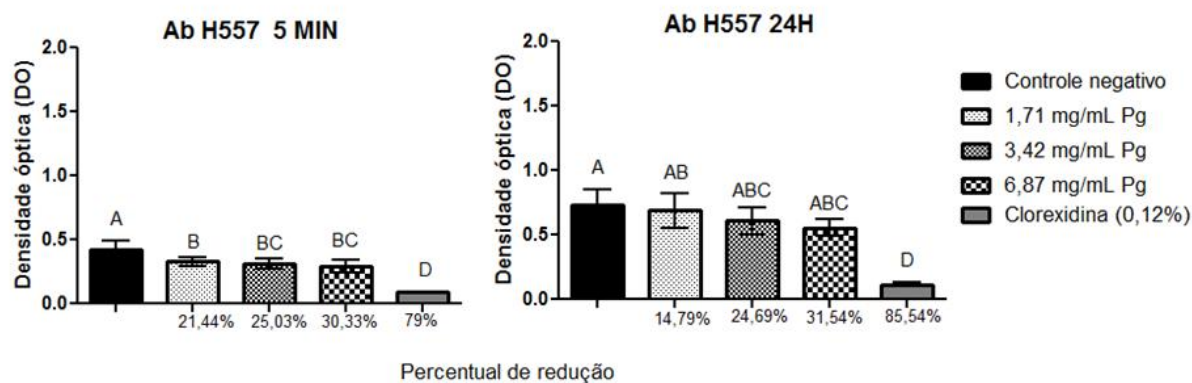
Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações testadas por 5 min sobre o biofilme da cepa Ab H557 apresentaram semelhanças estatísticas entre si e diferença entre o grupo controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$). A concentração de 1,71 mg/mL reduziu 21,44% do biofilme, enquanto 3,42 mg/mL e 6,87 mg/mL promoveram redução de 25,03% e

30,33%, respectivamente. Ab H557 apresentou 31,54% de redução do biofilme com a maior concentração do extrato avaliada, 6,87 mg/mL. 3,43 mg/mL promoveu a diminuição de 24,69% e 1,71 mg/mL diminuiu 14,79%. Os valores podem ser conferidos na Figura 18.

O biofilme da cepa Ab H557 após 5 min de contato com 25 mg/mL do extrato de *H. virginiana* foi reduzido em 7,19% e não apresentou diferença estatística com o grupo controle de crescimento. A redução do biofilme foi estatisticamente semelhante ao grupo clorexidina após tratamento com 50 mg/mL do extrato. Ambas as concentrações avaliadas reduziram o biofilme bacteriano após tratamento por 24h, demonstrando valores estatisticamente semelhantes entre si, porém diferente do grupo controle, conforme observado na Figura 19.

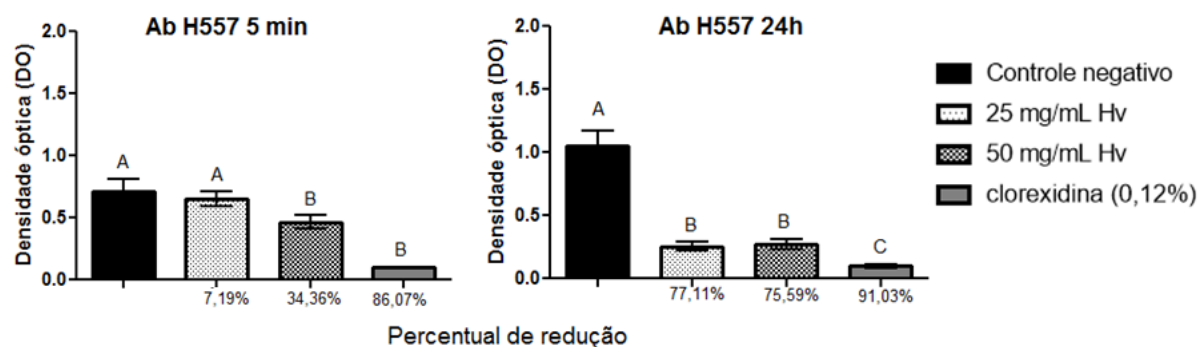
Figura 18 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Ab H557 por 5 minutos e 24 horas



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Ab H557 por 5 minutos e 24 horas



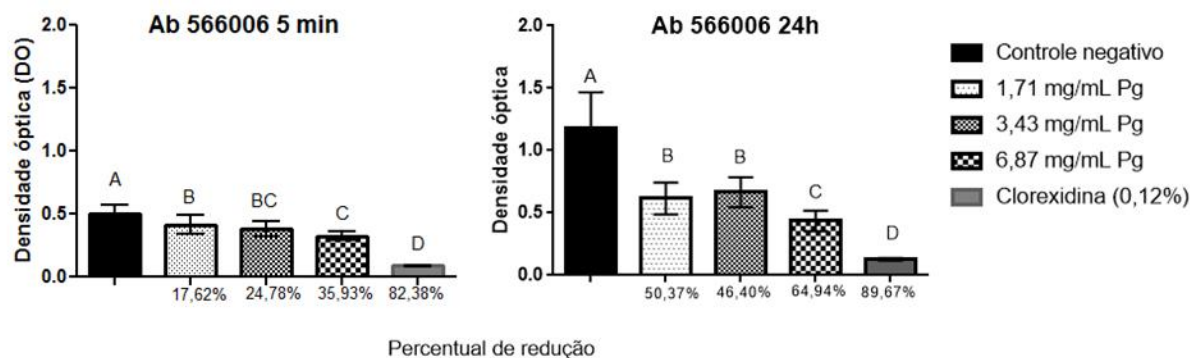
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b" e "c" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O biofilme de Ab 566006 após exposição de 5 min ao extrato de *P. granatum* apresentou maior redução (35,93%) quando tratado com 6,87 mg/mL, as concentrações 1,71 e 3,43 mg/mL reduziram 17,62% e 24,78% do biofilme, respectivamente. No tratamento de 24h as concentrações 1,71 e 3,43 mg/mL não apresentaram diferença estatísticas significantes entre si, porem ambas as concentrações foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05\%$) do grupo controle de crescimento. A concentração de 6,87 mg/mL reduziu em 64,94% o biofilme bacteriano, conforme mostra a Figura 20.

O extrato de *H. virginiana* na concentração de 25 mg/mL promoveu o crescimento bacteriano em 1,99% após contato de 5 min, não demonstrando diferença estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo controle de crescimento. No entanto, a concentração de 50 mg/mL reduziu 55,54% do biofilme, após contato pelo mesmo período. O tratamento por 24h com o extrato nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, demonstrou diferença estatística com o grupo controle de crescimento e o biofilme foi reduzido em 69,26% e 71,87%, respectivamente (Figura 21).

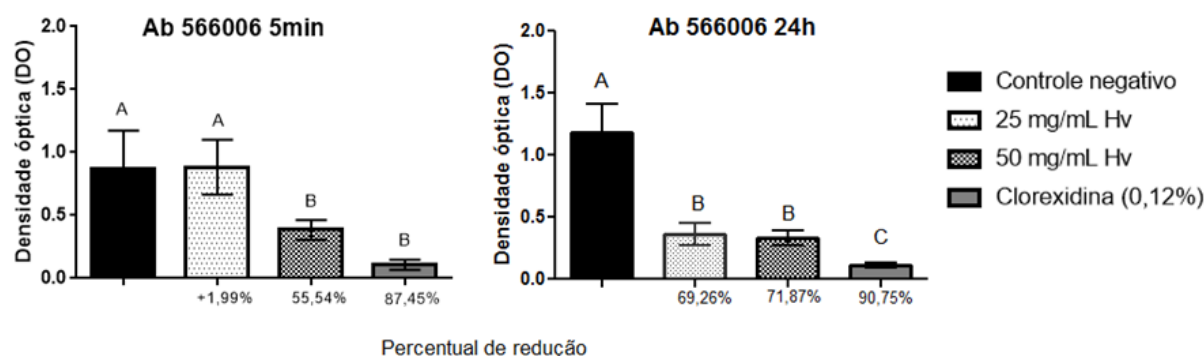
Figura 20 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Ab 566006 por 5 minutos e 24 horas



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Ab 566006 por 5 minutos e 24 horas



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b” e “c” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

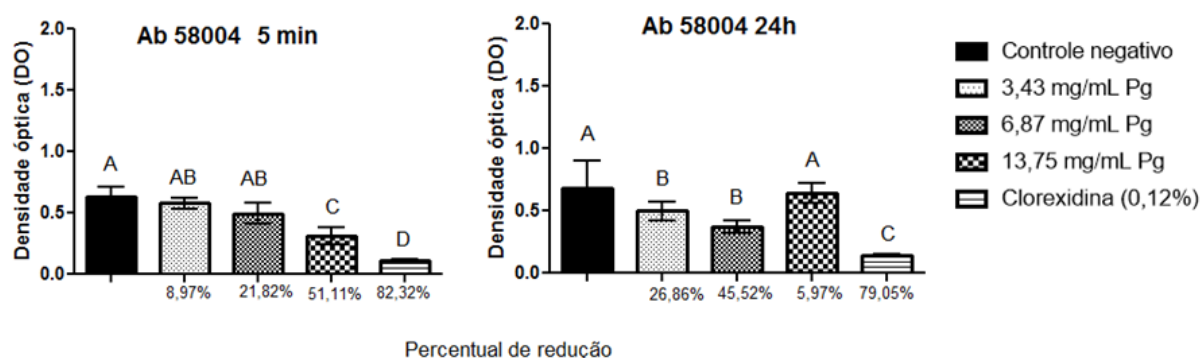
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o tratamento por 5 min o extrato de *P. granatum* causou a redução de 8,97% do biofilme de Ab 58004 na concentração de 3,43 mg/mL e 6,87 mg/mL reduziu 21,82%, ambas as concentrações promoveram redução sem significância

estatística ($p \leq 0,05\%$) comparada ao grupo controle de crescimento. No entanto, a concentração de 13,75 mg/mL reduziu 21,11% do biofilme. A redução percentual promovida pelo extrato na concentração de 3,43 mg/mL após 24h de exposição foi de 26,86% e 6,87 mg/mL reduziu em 45,52% o biofilme. A concentração de 13,75 mg/mL promoveu a redução de 5,97%, não demonstrando diferença estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo controle de crescimento, conforme demonstrado na Figura 22.

O extrato de *H. virginiana* após contato de 5 min foi capaz de reduzir com significância estatística ($p \leq 0,05\%$) o biofilme bacteriano da cepa Ab 58004 nas três concentrações avaliadas, sendo elas 12,5 mg, 25 mg e 50 mg/mL. E as reduções promovidas foram semelhantes estatisticamente ($p \leq 0,05\%$) ao grupo tratado com clorexidina a 0,12%. O efeito antibiofilme também foi demonstrado no tratamento de 24h com o extrato (Figura 23), onde foi observado redução dependente da dose, as concentrações mais altas do extrato (25 e 50 mg/mL) apresentaram as maiores porcentagens de redução (69,84% e 79,66%, respectivamente).

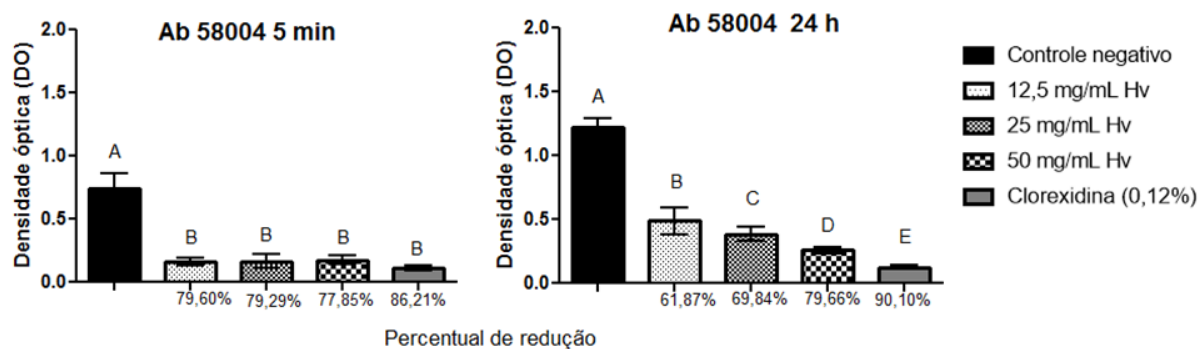
Figura 22 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Ab 58004 por 5 minutos e 24 horas



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Ab 58004 por 5 minutos e 24 horas



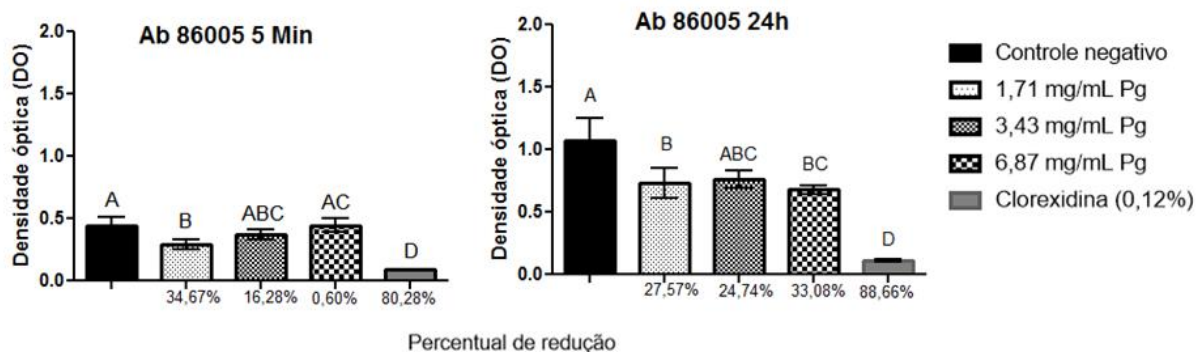
Legenda: Todos os tratamentos apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c", "d" e "e" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a cepa Ab 86005 as concentrações de 3,43 e 6,87 mg/mL do extrato *P. granatum* não apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,05\%$) na redução do biofilme em comparação com o grupo controle de crescimento após tratamento de 5 min. No entanto, a concentração de 1,71 mg/mL reduziu 34,67% do biofilme bacteriano após o mesmo período de exposição. O biofilme foi reduzido em 27,54% quando exposto a 1,71 mg/mL do extrato por 24 h, 3,43 mg/mL reduziu 24,74% e 6,87 mg/mL reduziu 33,08% do biofilme. Os valores podem ser observados na Figura 24.

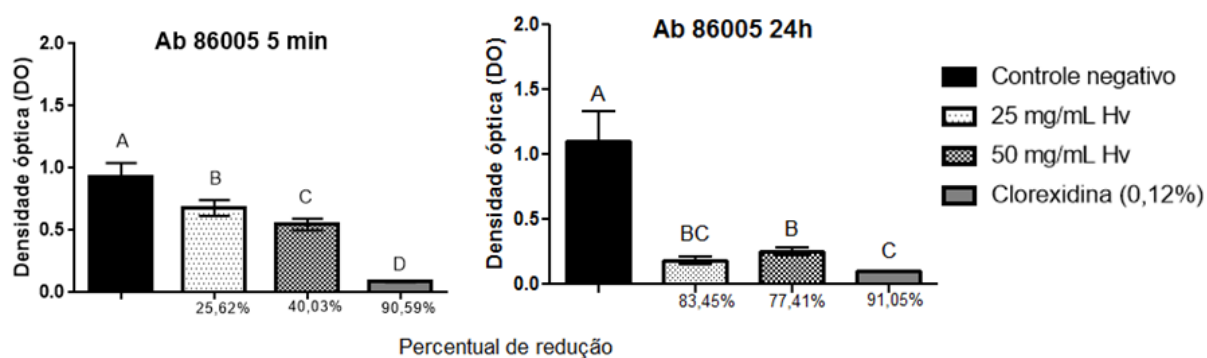
H. virginiana reduziu em 25,62% e 40,03% o biofilme da cepa Ab 86005 após 5 min de contato com as concentrações de 25 e 50 mg/mL, respectivamente. Ambos os tratamentos demonstraram diferença estatística ($p \leq 0,05\%$) com relação ao grupo controle de crescimento. O extrato na concentração de 25 mg/mL reduziu 83,45% do biofilme bacteriano após contato de 24h, demonstrando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo tratado com clorexidina a 0,12% pelo mesmo período. A redução após exposição ao extrato na concentração de 50 mg/mL foi de 77,41%, conforme observado na Figura 25.

Figura 24 - Ação antibiofilme do extrato de *P. granatum* sobre a cepa Ab 86005 por 5 minutos e 24 horas



Legenda: Os tratamentos de 5 min e 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c" e "d" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Ação antibiofilme do extrato de *H. virginiana* sobre a cepa Ab 86005 por 5 minutos e 24 horas



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

4.4 Atividade antimicrobiana dos extratos combinados sobre biofilmes monotípicos

Para avaliar o efeito combinado dos extratos sobre biofilmes monotípicos

foram utilizadas a menor concentração mínima combinada e duas concentrações acima da concentração mínima combinada.

Todas as concentrações dos extratos combinados avaliadas no biofilme das cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Valores da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* combinados para avaliação sobre cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae*

Cepa	MMC combinado		ICIF	2X MMC combinado	
	Pg	Hv		Pg	Hv
ATCC 4352	3,43	12,5	0,74	13,75	50
Kp 426533	6,87	1,56	0,53	27,5	6,25
Kp 820195	1,71	3,12	0,62	6,87	12,5
Kp 884724	6,87	6,25	0,75	27,5	25

Legenda: Pg: *Punica granatum*; Hv: *Hamamelis virginiana*; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada.

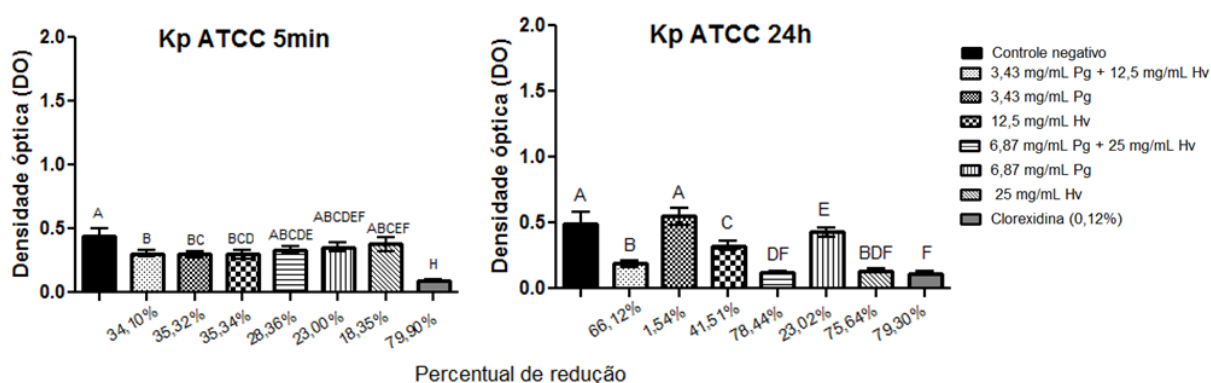
Fonte: Elaborado pelo autor.

P. granatum na concentração de 3,43 mg/mL reduziu 35,32% do biofilme da cepa ATCC de *K. pneumoniae* no tratamento de 5 min, a mesma concentração após o período de 24h promoveu a redução de 1,54% do biofilme. Quando exposto a 12 mg/mL do extrato de *H. virginiana* por 5 min o biofilme foi reduzido em 35,34%, e a redução promovida após o tratamento de 24h com foi de 41,51%. Os extratos combinado de *P. granatum* e *H. virginiana* (3,43 mg/mL Pg + 12,5 mg/mL Hv) apresentaram ação antibiofilme com diferença estatisticamente significantes ($p \leq 0,05\%$) em relação ao grupo controle de crescimento nos dois períodos de tratamento, com redução de 34,10% e 66,12% após contato de 5 min e 24h.

O tratamento por 5 min com 2x a CMM dos extratos combinados (6,87 mg/mL Pg + 25 mg/mL Hv) diminuiu 28,36% do biofilme bacteriano. O contato de 24h promoveu redução de 78,44%, apresentando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) com grupo tratado com clorexidina a 0,12%. *P. granatum* reduziu em 18,35% o biofilme

com a concentração de 6,87 mg/mL no tratamento de 5 min e 23,02% no tratamento de 24h. Com 25 mg/mL do extrato de *H. virginiana* a redução promovida foi de 18,35% após 5 min de contato e com 24h de exposição a redução foi de 75,64%. Os valores podem ser observados na Figura 26.

Figura 26 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa ATCC de *K. pneumoniae* por 5 minutos e 24 horas



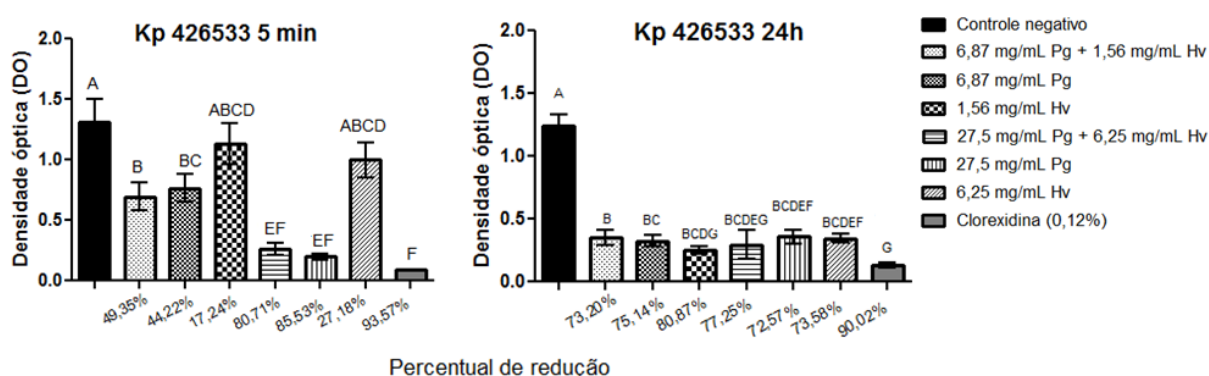
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f”, “g” e “h” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A combinação dos extratos na concentração de 6,87 mg/mL Pg + 1,56 mg/mL Hv promoveu a redução de 49,35% da atividade metabólica da cepa Kp 426533 em 5 min de contato e 73,20% após exposição de 24h. Com 6,87 mg/mL do extrato de *P. granatum* o biofilme foi reduzido em 44,22% em 5 min de contato, a redução foi maior no tratamento de 24h, onde o percentual de redução foi de 75,14%. Cinco minutos de exposição a 1,56 mg/mL do extrato de *H. virginiana* promoveu 17,24 % de redução da atividade metabólica. A mesma concentração no tratamento de 24h reduziu 80,87% do biofilme, demonstrando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo tratado com clorexidina a 0,12%. Ao aumentar 2x a concentração combinada dos extratos (27,5 mg/mL Pg + 6,25 mg/mL Hv) a redução foi de 80,71% e 77,25% nos tratamentos de 5 min e 24h, respectivamente.

P. granatum promoveu a redução de 85,53% após 5 min de exposição demonstrando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) ao grupo tratado com clorexidina a 0,12%. O tratamento de 24h promoveu redução de 72,57%. Com 6,25 mg/mL do extrato de *H. virginiana* a atividade metabólica foi reduzida em 27,18% com 5 min de contato, revelando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo controle de crescimento. A mesma concentração foi capaz de reduzir 73,58% do biofilme após tratamento de 24h, conforme observado na Figura 27.

Figura 27 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa Kp 426533 por 5 minutos e 24 horas



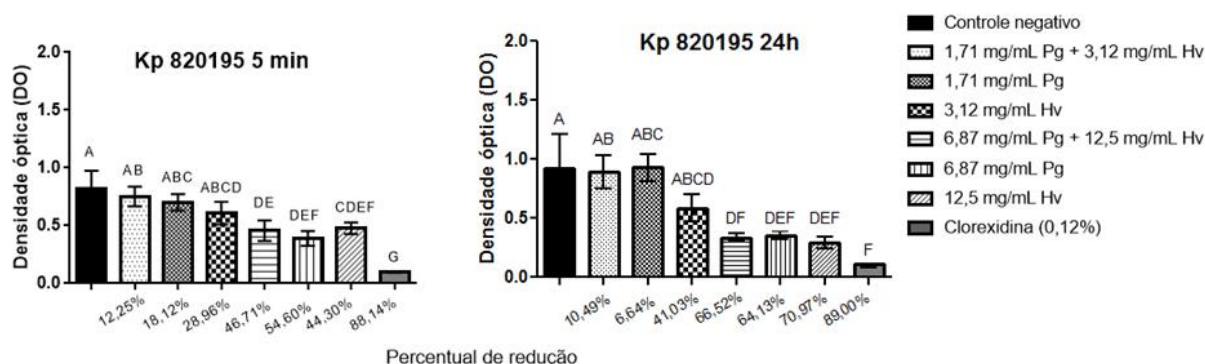
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min e 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn's* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c", "d", "e", "f" e "g" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a cepa Kp 820195, o tratamento de 5 min com os extratos combinados na concentração de 1,71 mg/mL Pg + 3,12 mg/mL Hv apresentou redução de 12,25% da atividade metabólica e 10,49% do biofilme foi reduzido quando as mesmas concentrações foram avaliadas pelo período de 24h. Após o tratamento por 5 min o extrato de *P. granatum* causou a redução de 18,12% do biofilme na concentração de 1,71 mg/mL, ao aumentar o tempo de tratamento para 24h, a mesma concentração do extrato foi capaz de reduzir 6,64% do biofilme. *H. virginiana* na concentração de 3,12 mg/mL reduziu em 28,96% e 41,03% o biofilme bacteriano após exposição de 5 min e 34h, respectivamente. Os extratos combinados na

concentração de 6,87 mg/mL Pg + 12,5 mg/mL Hv reduziram em 46,71% o biofilme com 5 min de contato e 66,52% após 24h. O extrato de *P. granatum* reduziu com significância estatística ($p \leq 0,05\%$) o biofilme na concentração de 6,87 mg/mL após 5 min de tratamento, o percentual de redução foi maior quando o biofilme foi exposto por 24h ao tratamento, exibindo redução de 64,13%. Com 12,5 mg/mL do extrato de *H. virginiana* o biofilme foi reduzido em 44,30% após tratamento de 5 min e com 24h de exposição ao extrato houve redução de 70,97% do biofilme, demonstrando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) com o grupo tratado com clorexidina a 0,12% (Figura 28).

Figura 28 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa Kp 820195 por 5 minutos e 24 horas



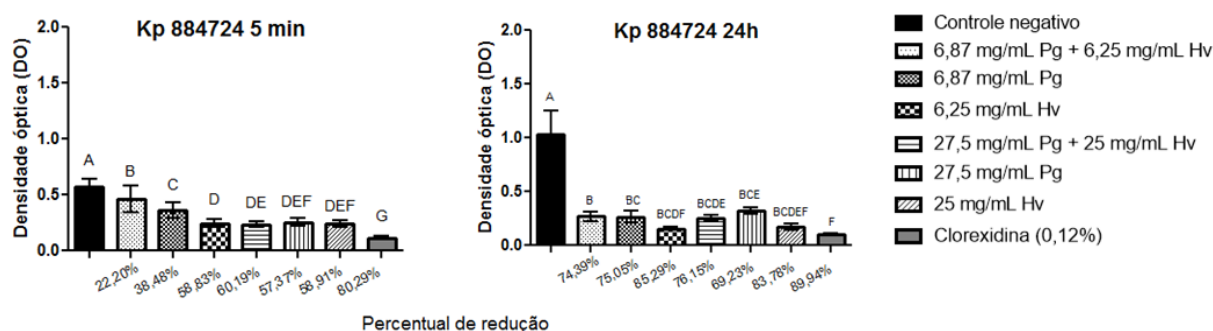
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min e 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c", "d", "e", "f" e "g" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento de 5 min com a combinação dos extratos na concentração de 6,87 mg/mL Pg + 6,25 mg/mL Hv sobre a cepa Kp 884724 reduziu 22,20% do biofilme, com a exposição de 24h a redução foi de 74,39%. Houve redução de 38,48% da atividade metabólica do biofilme quando tratado com 6,87 mg/mL de *P. granatum* por 5 min, a mesma concentração promoveu redução de 75,05% no tratamento de 24h. *H. virginiana* diminuiu em 58,83% o biofilme após contato de 5 min com a concentração de 6,25 mg/mL, a redução observada no tratamento de 24h

foi semelhante estatisticamente ($p \leq 0,05\%$) ao grupo tratado com clorexidina a 0,12%, resultando na diminuição de 85,29% do biofilme. Ao aumentar a concentração dos extratos combinados para 27,5 mg/mL Pg + 25 mg/mL Hv a redução do biofilme foi de 60,19% e 76,15% nos tratamentos de 5 min e 24h, respectivamente. Após 5 min de exposição ao extrato de *P. granatum* na concentração de 27,5 mg/mL houve redução de 57,37%, ao aumentar o período de exposição para 24h a redução foi de 69,23%. A concentração de 25 mg/mL do extrato de *H. virginiana* promoveu reduções de 58,91% e 83,78% nos tratamentos de 5 min e 24h, respectivamente. Os valores podem ser observados na Figura 29.

Figura 29 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa Kp 884724 por 5 minutos e 24 horas



Legenda: Os dados do tratamento de 5 min apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de Kruskal wallis suplementado pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c", "d", "e", "f" e "g" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações dos extratos combinados avaliadas no biofilme das cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *A. baumannii* estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Valores da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana* combinados para avaliação sobre cepas ATCC e clínicas multirresistentes de *A. baumannii*

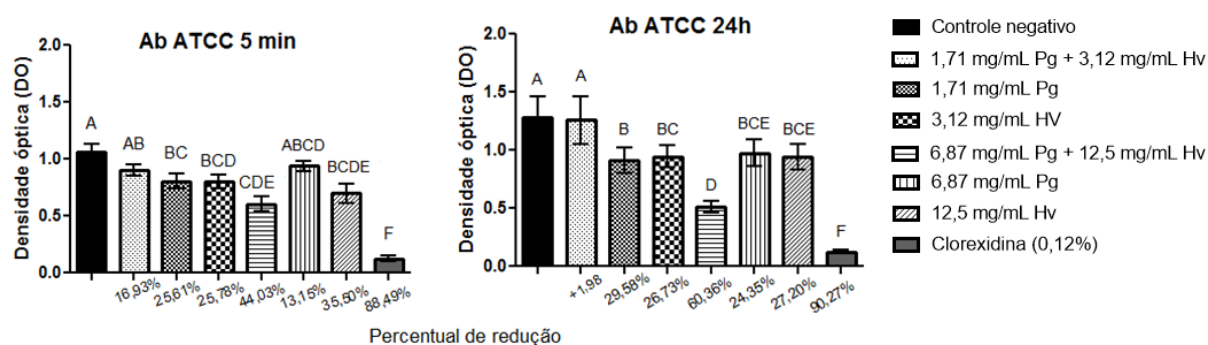
Cepa	MMC combinado		ICIF	2X MMC combinado	
	Pg	Hv		Pg	Hv
ATCC 19606	1,71	3,12	0,62	6,87	12,5
Ab 86005	0,1	12,5	0,55	0,42	50
Ab 566006	0,85	12,5	0,99	3,43	50
Ab H557	0,42	12,5	0,74	1,71	50

Legenda: Pg: *Punica granatum*; Hv: *Hamamelis virginiana*; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a cepa ATCC de *A. baumannii* a combinação dos extratos na concentração de 1,71 mg/mL Pg + 3,12 mg/mL Hv promoveu 16,93% de redução do biofilme após contato de 5 min. O tratamento de 24h promoveu o crescimento de 1,98% do biofilme e foi estatisticamente semelhante ($p \leq 0,05\%$) ao grupo controle de crescimento. *P. granatum* na concentração de 1,71 mg/mL diminuiu 25,61% do biofilme no contato de 5 min, ao aumentar o tempo de tratamento para 24h a redução foi de 29,58%. O extrato de *H. virginiana* na concentração de 3,12 mg/mL reduziu em 25,78% e 26,73% o metabolismo bacteriano após contato de 5 min e 24h, respectivamente. A exposição por 5 min aos extratos combinados nas concentrações 6,87 mg/mL Pg + 12,5 mg/mL Hv reduziu em 44,03% o biofilme, aumentar o tempo de exposição para 24h promoveu 60,36% de redução da atividade metabólica. Quando exposto a 6,87 mg/mL do extrato de *P. granatum* por 5 min o biofilme apresentou redução de 13,15%, com o tratamento de 24h a redução foi de 24,35%. Com 12,5 mg/mL do extrato de *H. virginiana* a redução foi de 35,50% após o período de 5 min, o percentual de redução no tratamento de 24h foi de 27,20%, como mostra a Figura 30.

Figura 30 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa ATCC de *A. baumannii* por 5 minutos e 24 horas



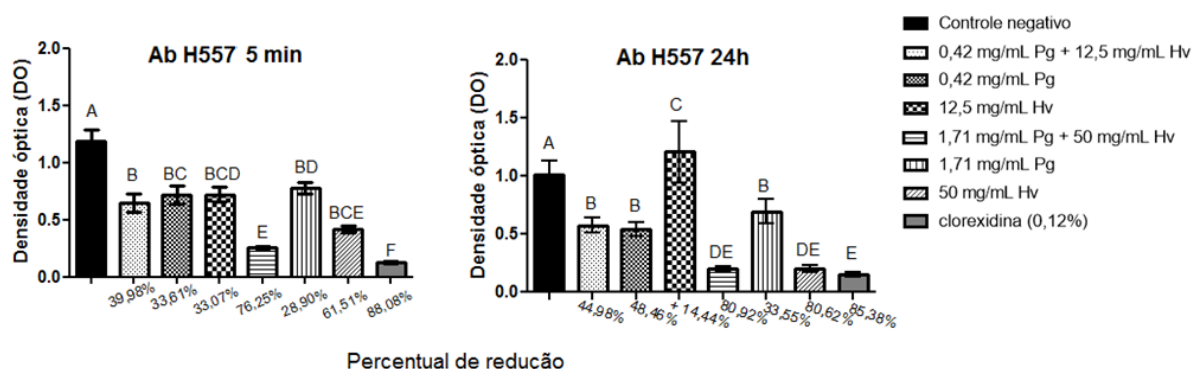
Legenda: Os dados do tratamento de 5 min não obtiveram distribuição normal, portanto, foram analisados pelo teste de *Kruskal wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ($p \leq 0,05\%$). Os dados do tratamento de 24h apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A combinação dos extratos na concentração de 0,42 mg/mL Pg + 12,5 mg/mL Hv promoveram a redução de 39,98% do biofilme da cepa Ab H557 após contato de 5 min. Após exposição de 24h aos extratos combinados na mesma concentração houve redução de 44,98% da atividade metabólica. Com 0,42 mg/mL de *P. granatum* foi possível reduzir em 33,61% e 48,46% do biofilme nos tratamentos de 5 min e 24h, respectivamente. *H. virginiana* na concentração de 12,5% diminuiu 33,07% do biofilme após contato de 5 min. A mesma concentração do extrato promoveu o aumento de 14,44% do biofilme após exposição de 24h. A combinação dos extratos na concentração de 1,71 mg/mL Pg + 50 mg/mL Hv ocasionou em 76,25% de redução do biofilme após tratamento de 5 min. A exposição de 24h a mesma concentração do extrato reduziu 80,92% do biofilme, demonstrando semelhança estatística ($p \leq 0,05\%$) em comparação ao grupo tratado com clorexidina a 0,12%. Ao ser exposto por 5 min ao extrato de *P. granatum* na concentração de 1,71 mg/mL o biofilme foi reduzido em 28,90%, ao aumentar o tempo de exposição para 24h a redução foi de 33,55%. O tratamento de 5 min com o extrato de *H. virginiana* na concentração de 50 mg/mL diminuiu 61,51% do biofilme. Quando tratado por 24h com a mesma concentração do extrato o biofilme

foi reduzido em 80,62%. Os valores estão indicados na Figura 31.

Figura 31 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa Ab H557 por 5 minutos e 24 horas

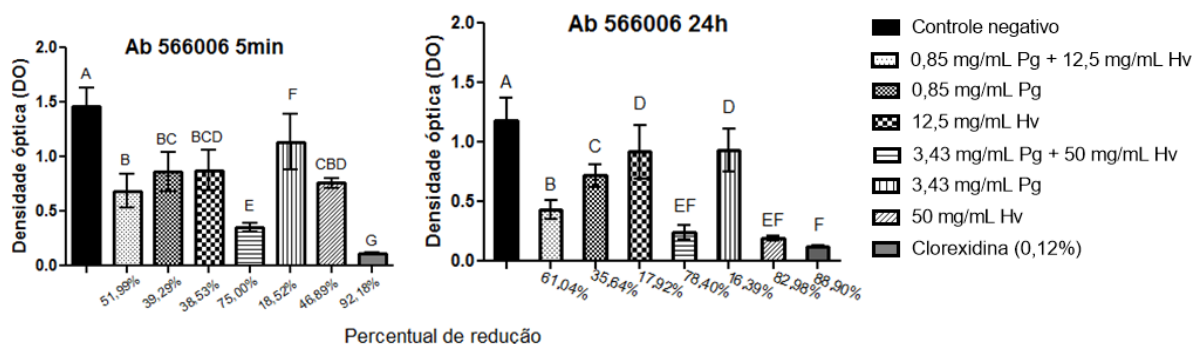


Legenda: Todos os tratamentos apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a cepa Ab 566006 a combinação dos extratos na concentração de 0,85 mg/mL Pg + 12,5 mg/mL Hv promoveu reduções de 51,99% e 61,04% no tratamento de 5 min e 24h, respectivamente. Após exposição de 5 min ao extrato de *P. granatum* na concentração de 0,85 mg/mL foi possível observar redução de 39,29% do biofilme, o tratamento de 24h resultou em 35,64% de redução. Com 12,5 mg/mL do extrato de *H. virginiana* foi possível observar redução de 38,53% do biofilme no tratamento de 5 min e 17,92% com a exposição de 24h. Os extratos combinados na concentração de 3,43 mg/mL Pg + 50 mg/mL Hv reduziram em 75% o biofilme com 5 min de contato e 78,40% após 24h, ambos os períodos de tratamento prouziram redução significativa ($p \leq 0,05\%$). O extrato de *P. granatum* reduziu em 18,52% o biofilme na concentração de 6,87 mg/mL após 5 min de tratamento, o percentual de redução foi de 16,39% para o tratamento de 24h com a mesma concentração do extrato. As reduções obtidas com a aplicação do extrato de *H. virginiana* na concentração de 50 mg/mL foram de 46,89% e 82,98% nos tratamentos de 5 min e 24h, respectivamente. O percentual de redução pode ser observado na Figura 32.

Figura 32 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa Ab 566006 por 5 minutos e 24 horas

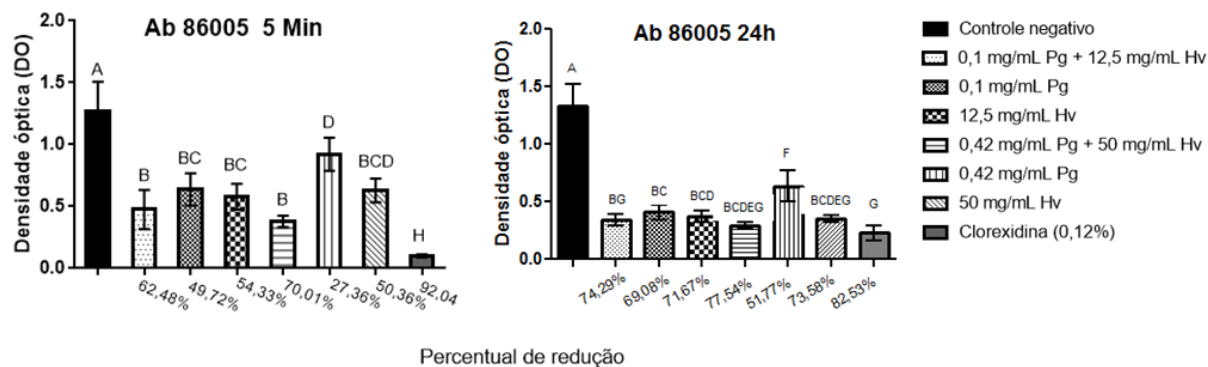


Legenda: Todos os tratamentos apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$). As letras "a", "b", "c", "d", "e", "f" e "g" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A combinação dos extratos na concentração de 0,1 mg/mL Pg + 12,5 mg/mL Hv promoveu a redução de 62,48% do biofilme da cepa Ab 86005 em 5 min de contato e 74,29% após exposição de 24h. Com 0,1 mg/mL do extrato de *P. granatum* o biofilme foi reduzido em 49,72% em 5 min de contato, a redução foi maior no tratamento de 24h, onde o percentual de redução foi de 69,08%. Com 5 min de exposição o extrato de *H. virginiana* na concentração de 1,56 mg/mL promoveu 54,33 % de redução da atividade metabólica bacteriana, a mesma concentração reduziu 71,67% do biofilme após tratamento de 24h. A combinação dos extratos na concentração de 0,42 mg/mL Pg + 50 mg/mL Hv reduziu 70,01% do biofilme após 5 min de contato e o aumento da exposição para 24h proporcionou redução de 77,54% do biofilme. *P. granatum* na concentração de 0,42 mg/mL promoveu a redução de 27,36% após 5 min de exposição e o tratamento de 24h promoveu redução de 51,77%. Com 50 mg/mL do extrato de *H. virginiana* a atividade metabólica foi reduzida em 50,36% com 5 min de contato, a mesma concentração foi capaz de reduzir 73,58% do biofilme após tratamento de 24h, conforme observado na Figura 33.

Figura 33 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* combinados e isolados sobre a cepa Ab 86005 por 5 minutos e 24 horas



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A crescente resistência bacteriana frente aos fármacos disponíveis tem aumentado a busca por novos antimicrobianos e os fitoterápicos têm sido investigados para esta finalidade. Existe na literatura trabalhos que comprovam o efeito antimicrobiano do extrato de plantas (Aleksic Sabo, Knezevic, 2019; Lagha et al., 2019; Meccatti et al., 2021), boa parte desses estudos investigam a ação isolada dos extratos, no entanto o uso combinado desses extratos podem aumentar a eficácia antimicrobiana e diminuir o surgimento de bactérias resistentes (Shekar et al., 2018).

No presente estudo foi verificada a atividade antimicrobiana dos extratos naturais de *P. granatum* (romã) e *H. virginiana* (hamamélis). A seleção destes extratos para os testes foi embasada em achados na literatura que comprovaram efetividade microbida dos extratos (Cheesman et al., 2021; Elshafie et al., 2021; Rasooly et al., 2020a; Trabelsi et al., 2020). Entretanto, poucos estudos verificaram a ação desses extratos sobre bactérias multirresistente, principalmente quando estas estão organizadas em biofilme.

Os extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* apresentaram efeito antibacteriano em todas as cepas testadas, porém, a sensibilidade aos extratos variou em relação à cepa e concentração utilizada. Neste estudo *P. granatum* na concentração de 1,71 mg/mL foi microbida para três cepas multirresistente de *A. baumannii* e para a cepa ATCC 19606, as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram maiores valores de CMM variando de 3,43 mg/mL a 13,75 mg/mL. Peršurić et al. (2020) verificaram o efeito antibacteriano do extrato etanólico da casca de *P. granatum* sobre *A. baumannii* (ATCC 19606) utilizando o teste de microdiluição em caldo e o efeito microbida foi observado após aplicação de 6,4 mg/mL do extrato. A diferença entre as concentrações provavelmente está relacionada ao tipo de solvente utilizado, uma vez que o presente estudo fez a utilização de extrato hidroalcolico e Peršurić et al. (2020) utilizaram o extrato etanólico. Magangana et al. (2020) verificaram que o processamento também influencia nas propriedades farmacológicas e fitoquímica de *P. granatum*. Chebaibi e Filali, (2013) verificaram a atividade antimicrobiana de extratos aquosos de *P. granatum* sobre bactérias

resistentes, os extratos foram elaborados utilizando metodologias diferentes (decocção, infusão e maceração). O extrato aquoso elaborado por decocção da casca de romã apresentou os melhores resultados, 1,56 mg/mL do extrato foi microbicida para *A. baumannii* resistente e o extrato não demonstrou efeito antimicrobiano para a cepa de *K. pneumoniae* resistente, esse resultado é semelhante ao obtido em nesse estudo, onde as cepas de *K. pneumoniae* avaliada se mostraram mais resistente ao extrato em relação as cepas de *A. baumannii*. As cepas de *K. pneumoniae* utilizadas nesse estudo apresentam resistência a diferentes classes de antibióticos, acreditamos que a maior resistência demonstrada por *K. pneumoniae* pode ser atribuída a presença de mais de um mecanismos de resistência como: inativação ou alteração de drogas, alteração do sítio alvo, mudança na permeabilidade da membrana, bomba de efluxo, aquisição de plasmídeos (Santajit, Indrawattana, 2016).

No presente estudo, as CMM do extrato de *H. virginiana* variaram entre 12,5 e 50 mg/mL. Verificou-se que a concentração de 25 mg/mL foi a CMM que apresentou a melhor efetividade para as cepas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Apenas a cepa Kp 426533 teve a CMM de 50 mg/mL. Embora seja considerado um antisséptico, estudos sobre a atividade antimicrobiana desse extrato são escassos. Cheesman et al. (2021) avaliaram o efeito inibitório de diferentes extratos de *H. virginiana* (aquoso, hexano, metanólico e clorofórmico) sobre cepas de *Streptococcus* e *Staphylococcus* spp., todos os extratos apresentaram concentração mínima de crescimento para os micro-organismos avaliados, os autores afirmam que os extratos avaliados possuem grande potencial inibitório. Rasooly et al. (2020a) verificaram o efeito antibacteriano de um extrato de *H. virginiana* rico em compostos fenólicos, o extrato demonstrou ser inibitório para *A. baumannii* ATCC 19606 na concentração de 182 µg/mL e para *K. pneumoniae* ATCC 700603 teve ser crescimento inibido com 572 µg/mL do extrato. Os autores atribuem o efeito antimicrobiano de *H. virginiana* aos compostos fenólicos, como ácido gálico, galocatequina e epigallocatequina e a presença de taninos.

O uso combinado de plantas pode potencializar os efeitos terapêuticos uma vez que diferentes compostos podem atuar sobre o mesmo ou diferentes alvos e vias, superar a resistência aos antimicrobianos, atuar sobre diferentes enzimas e transportadores metabólicos e diminuir os efeitos adversos (Yang et al., 2014).

Nesse trabalho o efeito combinado dos extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* foi investigado, foram encontradas 13 combinações aditivas ($ICIF > 0,5 \leq 1$) sobre as cepas de *A. baumannii* e 15 combinações aditivas para *K. pneumoniae*. O uso combinado dos extratos resultou na redução da concentração mínima necessária para promover os efeitos antimicrobianos, o que torna os resultados relevantes, visto que diminuir a concentração dos extratos pode reduzir o risco de efeitos colaterais (Silva et al., 2019). Os resultados encontrados nesse estudo além de demonstrar a potencialização do efeito inibitório de crescimento bacteriano proporcionado pela combinação dos extratos é o primeiro na literatura a relatar a interação desses extratos.

O extrato de *H. virginiana* em associação com antibióticos convencionais foi investigado por Cheesman et al. (2021) que encontraram duas combinações aditivas, o extrato aquoso combinado com cloranfenicol sobre *Streptococcus oralis* e o extrato metanólico associado a ciprofloxacina contra sobre *S. aureus*. Hacıoglu et al. (2017) verificaram o potencial antimicrobiano resultante da combinação de chás de ervas com antibióticos, o chá da flor de *P. granatum* combinado com ampicilina-sulbactam ou em associação com doxiciclina exibiu atividade aditiva ($ICIF 0,7$) sobre *A. baumannii* ATCC 19606. Embora as associações realizadas por Cheesman et al. (2021) e Hacıoglu et al. (2017) sejam diferentes das avaliadas por esse estudo houve relação entre os resultados, já que os extratos de *P. granatum* e *H. virginiana* apresentaram efeito aditivo sobre os micro-organismos avaliados.

O extrato de *P. granatum* promoveu redução significativa da atividade metabólica do biofilme de todas as cepas de *K. pneumoniae*, com resultados estatisticamente diferentes do controle de crescimento ($p \leq 0,05\%$), pelo período de 5 min e 24h. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliem o efeito antibiofilme de *P. granatum* sobre bactérias multirresistentes de *K. pneumoniae*. No entanto, o efeito antibiofilme do extrato foi investigado anteriormente por da Silva et al. (2019), que testaram concentrações de uma lectina da casca de *P. granatum* sobre o biofilme de *Escherichia coli* produtores de β -lactamase, houve redução do biofilme em concentrações de 50 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Os autores destacam ainda que a lectina interfere na expressão de genes relacionados com a formação do biofilme. A punicalagina é um importante composto bioativos de *P. granatum*, Xu et al. (2017) relataram que esse composto em concentrações acima de 16 $\mu\text{g/mL}$ reduz em até

90% o biofilme de *S. aureus* ATCC. *P. granatum* foi relatado anteriormente como modulador de quorum sensing interferindo na formação do biofilme bacteriano (Joshi et al., 2019), seu efeito antibiofilme também pode estar relacionado a presença de polifenóis que atuam como inibidores da bomba de efluxo (Dey et al., 2012).

A redução do biofilme de *A. baumannii* após tratamento com *P. granatum* variou entre as cepas e o período de tratamento. Foi observado que o extrato de *P. granatum* na concentração de 3,43 mg/mL promoveu o crescimento da cepa Ab ATCC 19606 após tratamento de 5 min, esse efeito pode estar relacionado a degradação de fenol, visto que, *A. baumannii* possui a capacidade de degradar fenol dependente da concentração (Shahryari et al., 2018) e estudos anteriores relatam que os polifenóis de *P. granatum* podem atuar como prebiótico para algumas bactérias (Li et al., 2015). Os diferentes perfis e mecanismos de resistência existente nas cepas avaliadas podem explicar a divergência no efeito antibacteriano dos polifenóis do extrato (Álvarez-Martínez et al., 2021).

De um modo geral, o extrato de *P. granatum* revelou ser capaz de reduzir o metabolismo de cepas de *A. baumannii* multirresistentes, apresentando reduções de até 64,94% para Ab 56006, 54,74% para ATCC 19606, 45,52% para Ab 58004, 34,67% para Ab 86005 e 31,54% para H557. Não foram encontrados na literatura artigos que avaliaram a ação antibiofilme de *P. granatum* sobre *A. baumannii*. No entanto, Mohsenipour e Hassanshahian (2015) relataram que 51,48% do biofilme de *P. aeruginosa* foi reduzido após tratamento com *P. granatum*. Bakkiyaraj et al. (2013) verificaram que 125 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ do extrato metanólico de *P. granatum* inibiu em quase 100% o biofilme de *S. aureus* e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), os pesquisadores também verificaram a atividade do ácido elágico isolado (principal componente do extrato) sobre esses micro-organismos e 25 $\mu\text{g/mL}$ do composto isolado promoveu redução acima de 80% do biofilme. Nostro et al. (2016) relataram que o extrato de *P. granatum* reduziu significativamente a biomassa do biofilme de *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* em relação ao grupo controle e atribuíram o efeito antimicrobiano ao composto apigenina presente no extrato.

O extrato de *H. virginiana* reduziu significativamente o biofilme dos dois micro-organismos avaliados. A redução para *A. baumannii* variou de 7,19% a 79,60% no tratamento de 5 min e 33,97% a 83,45% no tratamento por 24h, para *K. pneumoniae* o tratamento de 5 min promoveu reduções de 20,98% a 68,83% da

atividade metabólica e após 24h de contato o percentual de redução apresentado variou de 50,59% a 84,38%.

Embora tenham utilizado outra bactéria os resultados encontrados por Rasooly et al. (2020b) comprovam o efeito antibiofilme do extrato de *H. virginiana* e afirmam que o extrato atua sobre biofilmes pré-formados de *S. epidermidis* e evita o crescimento das células aderidas, os autores atribuem esse efeito ao polifenol hamamelitanino. Cobrado et al. (2012) investigaram a ação do hamamelitanino sobre cepas padrão e clínicas de *A. baumannii*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e constataram que 100 mg/mL diminuiu significativamente a atividade metabólica do biofilme de *A. baumannii* em 31,8%, *S. aureus* em 23% e *S. epidermidis* em 42,2%. Os autores afirmam que o hamamelitanino atua sobre quorum sensing dessas bactérias interferindo no biofilme. A ação antimicrobiana do hamamelitanino foi verificada em teste *in vivo* utilizando ratos Wistar infectados por MRSA e *S. epidermidis* meticilina resistentes (MRSE). O hamamelitanino controlou a carga microbiana e na concentração de 20 µg da substância já não havia crescimento microbiano (Kiran et al., 2008).

O biofilme da cepa Ab 566006 no tratamento de 5 min com 25 mg/mL de *H. virginiana* apresentou crescimento de 1,99%, acredita-se que este crescimento possa estar relacionado a grande presença de polifenóis como o pirogalol que atua no sequestro de radicais livres (Touriño et al., 2008), os radicais livre causam estresse na cultura bacteriana além de controlar seu crescimento, dessa forma, os polifenóis favorecem o crescimento bacteriano. Além disso, *A. baumannii* possui flexibilidade metabólica, esse patógeno possui proteínas regulatórias denominadas multicobre oxidase que atuam como catalisadoras na oxidação de vários substratos, como: fenóis guaiacol, pirogalol e catecol (Kaur et al., 2020).

Não foram encontrados na literatura estudos utilizando o extrato de *H. virginiana* em combinação sobre biofilmes bacterianos. No entanto, ao avaliar os resultados obtidos no presente estudo, os tratamentos com os extratos combinados de *P. granatum* e *H. virginiana* sobre os biofilmes bacterianos, é possível observar que em determinadas cepas e em diferentes concentrações a combinação promoveu maior redução metabólica do biofilme e em outras cepas a combinação do extrato exibiu redução menor do que a exercida pelos extratos isolados. Esse efeito pode ser explicado pela interação dos compostos fitoquímicos existente em cada um

dos extratos, visto que a interação de substâncias químicas podem se somar resultando em combinações sinérgicas, porém, a combinação de extratos também pode resultar em atividades aditivas, indiferentes ou até mesmo antagônicas (Kurin et al., 2012).

O extrato de *P. granatum* foi avaliado em combinação com o extrato de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) sobre o biofilme de *P. aeruginosa* resistente a antibiótico pelos pesquisadores Abu El-Wafa et al. (2020), *P. granatum* sozinho reduziu de 41,20% a 71,5% o biofilme das cepas avaliadas e *R. officinalis* diminuiu de 53,10% até 73,70% o biofilme das mesmas cepas. Quando combinados, os extratos promoveram redução de 76,5% até 85,40% dos biofilmes. Os autores afirmam que a interação dos extratos interfere na adesão das bactérias na superfície do biofilme, devido a redução da motilidade das bactérias. Embora a bactéria utilizada por Abu El-Wafa et al. (2020) seja diferente da utilizada nesse estudo, os resultados obtidos são semelhantes, uma vez que, o extrato de *P. granatum* associado a *H. virginiana* promoveu a maior redução do biofilme de algumas cepas.

As plantas são uma importante fonte de compostos terapêuticos que podem ser utilizados como antimicrobianos. O presente estudo demonstra o potencial antimicrobiano e antibiofilme dos extratos *P. granatum* e *H. virginiana*. As interações aditivas observadas nesse estudo também são importantes, uma vez que o uso combinado de extratos pode diminuir a concentração utilizada e potencializar o efeito antibacteriano. Assim, os resultados obtidos nesse estudo contribuem para o desenvolvimento de novas estratégias contra infecções causadas por *A. baumannii* e *K. pneumoniae*.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

- a) o extrato de *P. granatum* foi ativo para as 4 cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* avaliadas. A CMM para *A. baumannii* variou de 1,71 a 3,43 mg/mL e para *K. pneumoniae* a CMM variou de 3,43 a 13,75 mg/mL;
- b) o extrato de *H. virginiana* apresentou CMM para as 4 cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* avaliadas. A CMM para *A. baumannii* variou de 12,5 a 25 mg/mL e para *K. pneumoniae* a CMM variou de 25 a 50 mg/mL;
- c) a combinação dos extratos resultou em 7 combinações aditivas para as cepas multirresistentes de *A. baumannii* e 14 combinações aditivas para as cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*;
- d) ambos os extratos isolados e em combinação apresentaram ação antibiofilme sobre as cepas multirresistentes avaliadas.

REFERÊNCIAS*

- Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, et al. *Acinetobacter baumannii* efflux pumps and antibiotic resistance. *Infect Drug Resist.* 2020;13:423–34. doi: 10.2147/IDR.S228089.
- Abu El-Wafa WM, Ahmed RH, Ramadan MAH. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol.* 2020;51(3):1079–92. doi: 10.1007/s42770-020-00284-3. PMID: 32394240.
- Al-Kadmy IMS, Ibrahim SA, Al-Saryi N, Aziz SN, Besinis A, Hetta HF. Prevalence of Genes Involved in Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: First Report from Iraq. *Microb Drug Resist.* 2020;26(6):616–22. doi: 10.1089/mdr.2019.0243. PMID: 31816255.
- Aleksic Sabo V, Knezevic P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Ind Crop Prod.* 2019;132:413–29. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.02.051. PMID: 32288268.
- Álvarez-Martínez FJ, Rodríguez JC, Borrás-Rocher F, Barraji  n-Catal  n E, Micol V. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Sci Rep.* 2021;11(1):588. doi: 10.1038/s41598-020-80003-y. PMID: 33436818.
- Amaturo A, Meucci M, Mari FS. Treatment of haemorrhoidal disease with micronized purified flavonoid fraction and sucralfate ointment. *Acta Biomed.* 2020;91(1):139–41. doi: 10.23750/abm.v91i1.9361. PMID: 32191669.
- Anvisa. Primeiro suplemento do formul  rio de fitoter  picos da farmacopeia. Bras  lia: ANVISA; 2018.
- Arefian H, Hagel S, DiplWirt-Inf SH, DiplInf FR, Scherag A, Brunkhorst FM, et al. Extra length of stay and costs because of health care-associated infections at a German university hospital. *Am J Infect Control.* 2016;44:160–6. doi: 10.1016/j.ajic.2015.09.005. PMID: 26521700.
- Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling.* 2013;29(8):929–37. doi: 10.1080/08927014.2013.820825. PMID: 23906229.
- Banin E, Hughes D, Kuipers OP. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):450–2. doi: 10.1093/femsre/fux016. PMID: 28486583.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barathikannan K, Venkatadri B, Khusro A, Abdullah Al-Dhabi N, Agastian P, Valan Arasu M, et al. Chemical analysis of *Punica granatum* fruit peel and its in vitro and in vivo biological properties. *BMC Complement Altern Med*. 2016(16):264. doi: 10.1186/s12906-016-1237-3.

Bassiri-Jahromi S. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncol Rev*. 2018 Jan 30;12(1):345. doi: 10.4081/oncol.2018.345. PMID: 29441150

Bassiri-Jahromi S, Pourshafie MR, Ardakani EM, Ehsani AH, Doostkam A, Katirae F, et al. In vivo comparative evaluation of the pomegranate (*Punica granatum*) peel extract as an alternative agent to nystatin against oral candidiasis. *Iran J Med Sci*. 2018 May;43(3):296-304. PMID: 29892147

Berberian G, Brizuela M, Rosanova MT, Travaglianti M, Mastroiani A, Reijtman V, et al. Multidrug resistant Gram-negative infections in neonatology. *Arch Argent Pediatr*. 2019;117(1):6–11. doi: 10.5546/aap.2019.eng.6. PMID: 30652440.

Bhagirath AY, Li Y, Patidar R, Yerex K, Ma X, Kumar A, Duan K. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in gram-negative pathogens. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1781. doi: 10.3390/ijms20071781. PMID: 30974906.

Blin C, Passet V, Touchon M, Rocha EPC, Brisse S. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. *Environ Microbiol*. 2017;19(5):1881–98. doi: 10.1111/1462-2920.13689.

Brasil. Política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.

Centers for Disease Control and Prevention [internet]. Antibiotic resistance threats in the United States 2013:144. [cited 2020 Dec 1]; Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

Chebaibi A, Filali FR. Bactericidal activity and phytochemical screening of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel aqueous extracts. *J Med Plants Res*. 2013;7(14):887–91. doi: 10.5897/JMPR12.988.

Cheesman MJ, Alcorn S, Verma V, Cock IE. An assessment of the growth inhibition profiles of *Hamamelis virginiana* L. extrac against streptococcus and Staphylococcus spp. *J Tradit Complement Med*. 2021 Apr 1;11(5):457-65. doi: 10.1016/j.jtcme.2021.03.002. PMID: 34522640.

Chen F, Deng X, Wang Z, Wang L, Wang K, Gao L. Treatment of severe ventriculitis caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* by intraventricular lavage and administration of colistin. *Infect Drug Resist*. 2019;12:241–7. doi: 10.2147/IDR.S186646. PMID: 30718963.

Cobrado L, Azevedo MM, Silva-Dias A, Ramos JP, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1159–62. doi: 10.1093/jac/dks007. PMID: 22316569.

Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmüller S, Mersch-Sundermann V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry.* 2003;63(2):199–207. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00104-3. PMID: 12711142.

Dey D, Debnath S, Hazra S, Ghosh S, Ray R, Hazra B. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and metallo- β -lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(12):4302–9. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.001. PMID: 22982804.

Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(12):939–51. doi: 10.1038/nrmicro1789. PMID: 18007677.

Duckstein SM, Lorenz P, Stintzing FC. Conversion of phenolic constituents in aqueous *Hamamelis virginiana* leaf extracts during fermentation. *Phytochem Anal.* 2012;23(6):588–97. doi: 10.1002/pca.2359. PMID: 22434718.

Duckstein SM, Stintzing FC. Investigation on the phenolic constituents in *Hamamelis virginiana* leaves by HPLC-DAD and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(2):677–88. doi: 10.1007/s00216-011-5111-3. PMID: 21626454.

Elshafie HS, Caputo L, De Martino L, Sakr SH, De Feo V, Camele I. Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) leathery exocarp extract. *Plants.* 2021;10(1):1–9. doi: 10.3390/plants10010153. PMID: 33466616.

Exner M, Sanjay B, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control.* 2017;12:1–24. doi: 10.3205/dgkh000290. PMID: 28451516.

Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G, et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol Res.* 2017;195:11–7. doi: 10.1016/j.micres.2016.11.005.

Gai XY, Bo SN, Shen N, Zhou QT, Yin AY, Lu W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of ciprofloxacin in elderly Chinese patients with lower respiratory tract infections caused by Gram-negative bacteria. *Chinese Med J-Peking.* 2019;132(6):638–46. doi: 10.1097/CM9.000000000000136. PMID: 30855292.

Gao B, Li X, Yang F, Chen W, Zhao Y, Bai G, et al. Molecular epidemiology and risk factors of ventilator-associated pneumonia infection caused by carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Front Pharmacol*. 2019 Mar 22;10:262. doi: 10.3389/fphar.2019.00262. PMID: 30967778

Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 1):S18–27. doi: 10.1093/infdis/jiw378. PMID: 28375514.

Grosse-Onnebrink J, Rudloff J, Kessler C, Werner C, Dougherty GW, Kerschke L, et al. *Acinetobacter baumannii* Is a risk factor for lower respiratory tract infections in children and adolescents with a tracheostomy. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(10):1005–9. doi: 10.1097/INF.0000000000002421. PMID: 31568139

Habibipour R, Moradi-Haghighi L, Farmany A. Green synthesis of AgNPs@PPE and its *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation activity compared to pomegranate peel extract. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:6891–9. doi: 10.2147/IJN.S209912. PMID: 31695365.

Habtemariam S. Hamamelitannin from *Hamamelis virginiana* inhibits the tumour necrosis factor- α (TNF)-induced endothelial cell death in vitro. *Toxicol*. 2002;40(1):83–8. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00195-7.

Hacioglu M, Dosler S, Birtoksoz Tan AS, Otuk G. Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: An in vitro study. *PeerJ*. 2017;2017(7):e3467. doi: 10.7717/peerj.3467. PMID: 28761777.

Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):276–301. doi: 10.1093/femsre/fux010. PMID: 28369412.

Hameed F, Khan MA, Muhammad H, Sarwar T, Bilal H, Rehman TU. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: First report from Pakistan. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20190237. doi: 10.1590/0037-8682-0237-2019. PMID: 31508785.

Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(2):91–102. doi: 10.1038/nrmicro.2017.148. PMID: 29249812.

Jacob J, Lakshmanapermalsamy P, Illuri R, Bhosle D, Sangli G, Mundkinajeddu D. In vitro evaluation of antioxidant potential of isolated compounds and various extracts of peel of *Punica granatum* L. *Pharmacogn Res*. 2018;10(1):44–8. doi: 10.4103/pr.pr_36_17. PMID: 29568186.

Jain S, Jacob M, Walker L, Tekwani B. Screening North American plant extracts in vitro against *Trypanosoma brucei* for discovery of new antitrypanosomal drug leads. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):131. doi: 10.1186/s12906-016-1122-0.

PMID: 27193901.

Joshi C, Patel P, Kothari V. Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens. *F1000Res*. 2019;8:70. doi: 10.12688/f1000research.17430.2. PMID: 30828441.

Kaur K, Sidhu H, Capalash N, Sharma P. Multicopper oxidase of *Acinetobacter baumannii*: Assessing its role in metal homeostasis, stress management and virulence. *Microb Pathog*. 2020;143:104124. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104124. PMID: 32169492.

Keshi L, Weiwei X, Shoulin L, Xiadong L, Hao W, Junhai J, et al. Analysis of drug resistance of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children with urinary tract infection. *Saudi Med J*. 2019;40(11):1111–5. doi: 10.15537/smj.2019.11.24547. PMID: 31707407.

Khan I, Rahman H, Abd El-Salam NM, Tawab A, Hussain A, Khan TA, et al. *Punica granatum* peel extracts: HPLC fractionation and LC MS analysis to quest compounds having activity against multidrug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–6. doi: 10.1186/s12906-017-1766-4. PMID: 28468660.

Kiran MD, Adikesavan NV, Cirioni O, Giacometti A, Silvestri C, Scalise G, et al. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol Pharmacol*. 2008;73(5):1578–86. doi: 10.1124/mol.107.044164. PMID: 18314496.

Kirsch J, Jung A, Hille K, König B, Hannig C, Kölling-Speer I, et al. Effect of *fragaria vesca*, *hamamelis* and *tormentil* on the initial bacterial colonization in situ. *Arch Oral Biol*. 2020;118:104853. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104853. PMID: 32801033.

Kumar KP, Samlin SS, Siva B, Sudharshan R, Vignesswary A, Divya K. *Punica granatum* as a salutiferous superfruit in the treatment of oral candidiasis - An in-vitro study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020;24(1):188–9. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_268_19. PMID: 32508479.

Kurin E, Mućaji P, Nagy M. In vitro antioxidant activities of three red wine polyphenols and their mixtures: An interaction study. *Molecules*. 2012;17(12):14336–48. doi: 10.3390/molecules171214336. PMID: 23208468.

Lagha R, Abdallah F Ben, AL-Sarhan BO, Al-Sodany Y. Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules*. 2019;24(6):1161. doi: 10.3390/molecules24061161. PMID: 30909573.

Lai CC, Chen SY, Ko WC, Hsueh PR. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *Int J Antimicrob Agents*. 2021;57(4). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106324. PMID: 33746045.

Lee HS, Moon J, Shin HR, Ahn SJ, Kim TJ, Jun JS, et al. Pneumonia in hospitalized neurologic patients: Trends in pathogen distribution and antibiotic susceptibility. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1–8. doi: 10.1186/s13756-019-0475-9. PMID: 30733859.

Lee YS, Jang KA, Cha JD. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:618081. doi: 10.1155/2012/618081. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21941436.

Li Z, Summanen PH, Komoriya T, Henning SM, Lee RP, Carlson E, et al. Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria invitro: Implications for prebiotic and metabolic effects. *Anaerobe*. 2015;34:164–8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.012. PMID: 26051169.

Liang W, Yuan-Run Z, Min Y. Clinical presentations and outcomes of post-operative central nervous system infection caused by multi-drug-resistant/extensively drug-resistant *acinetobacter baumannii*: a retrospective study. *Surg Infect*. 2019;20(6):460–4. doi: 10.1089/sur.2018.286. PMID: 30942663.

Lin M-F, Lan C-Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*. 2014;2(12):787–814. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.787. PMID: 25516853.

Liu J, Xiao X, Cen C, Yuan H, Yang M. Rare purulent pericarditis caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(38):e17034. doi: 10.1097/MD.00000000000017034. PMID: 31567940.

Liu X, Sai F, Li L, Zhu C, Huang H. Clinical characteristics and risk factors of catheter-associated urinary tract infections caused by *Klebsiella Pneumoniae*. *Ann Palliat Med*. 2020;9(5):2668–77. doi: 10.21037/apm-20-1052. PMID: 32921093.

Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale J Biol Med*. 2017;90(1):135–45. PMID: 28356901.

Lv L, Wan M, Wang C, Gao X, Yang Q, Partridge SR, et al. Emergence of a plasmid-encoded resistance-nodulation-division efflux pump conferring resistance to multiple drugs, including tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae*. *MBio*. 2020;11(2). doi: 10.1128/mBio.02930-19. PMID: 32127452.

Magangana TP, Makunga NP, Fawole OA, Opara UL. Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of pomegranate (*punica granatum* L.) peel waste: A review. *Molecules*. 2020;25(20):4690. doi: 10.3390/molecules25204690. PMID: 33066412.

Mallya L, Shenoy R, Mala K, Shenoy S. Evaluation of the antimicrobial efficacy of 20% *Punica granatum*, 0.2% chlorhexidine gluconate, and 2.5% sodium hypochlorite used alone or in combinations against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. *J Conserv Dent*. 2019;22(4):367–70. doi: 10.4103/JCD.JCD_43_19. PMID: 31802821.

Mason T, Trochez C, Thomas R, Babar M, Hesso I, Kayyali R. Knowledge and awareness of the general public and perception of pharmacists about antibiotic resistance. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1–10. doi: 10.1186/s12889-018-5614-3.

Meccatti VM, De Oliveira JR, Figueira LW, Lagareiro Netto AA, Zamarioli LS, Marcucci MC, et al. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract has antibiofilm effect similar to the antifungal nystatin on candida samples. *An Acad Bras Cienc*. 2021;93(2):e20190366. doi: 10.1590/0001-3765202120190366. PMID: 33950151.

Metan G, Zarakolu P, Otlu B, Tekin İ, Aytaç H, Bölek E, et al. Emergence of colistin and carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (CCR-Acb) complex in a neurological intensive care unit followed by successful control of the outbreak. *J Infect Public Heal*. 2020;13:564–70. doi: 10.1016/j.jiph.2019.09.013. PMID: 31672426.

Millo G, Juntavee A, Ratanathongkam A, Nualkaew N, Jomjai P, Chatchiwiwattana S. Antibacterial inhibitory effects of *Punica Granatum* gel on cariogenic bacteria: an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2017;10(2):152–7. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1426. PMID: 28890615.

Ministério da Saúde [internet]. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS 2009:2. [cited 2019 Jul 11]; Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>.

Möhlenkamp S, Thiele H. Ventilation of COVID-19 patients in intensive care units. *Herz*. 2020;45(4):329–31. doi: 10.1007/s00059-020-04923-1. PMID: 32313971.

Mohr KI. History of Antibiotics Research. How to overcome the antibiotic crisis. *Springer Int Publ*. 2016;398:237–72. doi: 10.1007/82_2016_499.

Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The antimicrobial effects of the alcoholic extracts of pomegranate (*Punica Granatum*) on the planktonic forms and biofilm structures of six pathogenic bacteria. *JBUMS*. 2015;17(1):77–84. doi: 10.22088/jbums.17.1.77.

Moradi M-T, Karimi A, Shahrani M, Hashemi L, Ghaffari-Goosheh M-S. Anti-influenza virus activity and phenolic content of Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and fractions. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2019;11(4):285–91. PMID: 31908736.

Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *acinetobacter baumannii* collected as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial, 2004 to 2009. *Clin Ther*. 2012;34(1):101–12. doi: 10.1016/j.clinthera.2011.11.028. PMID: 22177546.

Nakonieczna J, Wozniak A, Pieranski M, Rapacka-Zdonczyk A, Ogonowska P, Grinholc M. Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy. *Future Med Chem*. 2019;11(5):443–61. doi: 10.4155/fmc-2018-0329. PMID: 30901231.

Namikawa H, Niki Makoto, Niki Mamiko, Yamada K, Nakaie K, Sakiyama A, et al. Clinical and virulence factors related to the 30-day mortality of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia at a tertiary hospital: a case–control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(12):2291–7. doi: 10.1007/s10096-019-03676-y. PMID: 31605255.

Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, Grandini A, et al. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2016;238:33–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.024. PMID: 27591384.

O'Neill J. An audience with. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(8):526. doi: 10.1038/nrd.2016.160.

Oliveira MJR, Simoes MJS, Sassi CRR. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Plantas Med*. 2006;8(2):39–41.

Opoku-Temeng C, Kobayashi SD, DeLeo FR. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1360–6. doi: 10.1016/j.csbj.2019.09.011. PMID: 31762959.

Palharin LHDDC, Figueiredo Neto E, Camargo Lopes MP, Bosquê GG. Estudo sobre gengibre na medicina popular. *Rev Científica Eletronica Agron*. 2008;14:1–4.

Peršurić Ž, Martinović LS, Malenica M, Gobin I, Pedisić S, Dragović-Uzelac V, et al. Assessment of the biological activity and phenolic composition of ethanol extracts of pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. *Molecules*. 2020;25(24):5916. doi: 10.3390/molecules25245916. PMID: 33327473.

Rafiq Z, Narasimhan S, Vennila R, Vaidyanathan R. Punigratane, a novel pyrrolidine alkaloid from *Punica granatum* rind with putative efflux inhibition activity. *Nat Prod Res*. 2016;30(23):2682–7. doi: 10.1080/14786419.2016.1146883. PMID: 26912266.

Rahim GR, Gupta N, Maheshwari P, Singh MP. Monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis: an emerging life-threatening entity. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):316–23. doi: 10.1016/j.cmi.2018.05.008. PMID: 29787886.

Ramadan HKA, Mahmoud MA, Zakaria M, Aburahma, Elkhawaga AA, El-Mokhtar MA, et al. Predictors of severity and co-infection resistance profile in COVID-19 patients: First report from upper Egypt. *Infect Drug Resist*. 2020;13:3409–22. doi: 10.2147/IDR.S272605. PMID: 33116660.

Rasooly R, Choi HY, Do P, Morroni G, Brescini L, Cirioni O, et al. whISOBAX™ inhibits bacterial pathogenesis and enhances the effect of antibiotics. *Antibiotics*. 2020a;9(5):264. doi: 10.3390/antibiotics9050264. PMID: 32438609.

Rasooly R, Molnar A, Do P, Morroni G, Brescini L, Cirioni O, et al. Witch hazel significantly improves the efficacy of commercially available teat dips. *Pathogens*. 2020b;9(2):92. doi: 10.3390/pathogens9020092. PMID: 32024049.

Reuter J, Wölfl U, Korting HC, Schempp C. Which plant for which skin disease? Part 2: Dermatophytes, chronic venous insufficiency, photoprotection, actinic keratoses, vitiligo, hair loss, cosmetic indications. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010;8(11):866–73. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07472.x.

Rizk M, El-Khier NA. Aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Clin Lab.* 2019;65(7). doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.190103. PMID: 31307186.

Saga T, Yamaguchi K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Med Assoc J.* 2009;52(2):103–8.

Sánchez-Tena S, Fernández-Cachón ML, Carreras A, Mateos-Martín ML, Costoya N, Moyer MP, et al. Hamamelitannin from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) displays specific cytotoxic activity against colon cancer cells. *J Nat Prod.* 2012;75(1):26–33. doi: 10.1021/np200426k. PMID: 22216935.

Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067. PMID: 27274985.

Sarda C, Fazal F, Rello J. Management of ventilator-associated pneumonia (VAP) caused by resistant gram-negative bacteria: which is the best strategy to treat? *Expert Rev Respir Med.* 2019;13(8):787–98. doi: 10.1080/17476348.2019.1632195. PMID: 31210549.

Scandorieiro S, de Camargo LC, Lancheros CAC, Yamada-Ogatta SF, Nakamura CV, de Oliveira AG, et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Front Microbiol.* 2016;7:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00760. PMID: 27242772.

Schmier JK, Hulme-Lowe CK, Semenova S, Klenk JA, DeLeo PC, Sedlak R, et al. Estimated hospital costs associated with preventable health care-associated infections if health care antiseptic products were unavailable. *Clin Outcomes Res.* 2016;197–205. doi: 10.2147 / CEOR.S102505. PMID: 27257390.

Shahryari S, Zahiri HS, Haghbeen K, Adrian L, Noghabi KA. High phenol degradation capacity of a newly characterized *Acinetobacter* sp. SA01: Bacterial cell viability and membrane impairment in respect to the phenol toxicity. *Ecotoxicol Env Saf.* 2018;164:455–66. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.051. PMID: 30144706.

Sharifipour E, Shams S, Esmkhani M, Khodadadi J, Fotouhi-Ardakani R, Koohpaei A, et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):646. doi: 10.1186/s12879-020-05374-z. PMID: 32873235.

Shekar BC, Nagarajappa R, Jain R, Singh R, Suma S, Thakur R. Antimicrobial Efficacy of *Acacia nilotica*, *Murraya koenigii* L. Sprengel, *Eucalyptus hybrid*, *Psidium guajava* extracts and their combinations on *Fusobacterium nucleatum* and

Porphyromonas gingivalis. Indian J Dent Res. 2018;29(5):641–5. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_52_17. PMID: 30409946.

Siebra ALA, Oliveira LR, Martins AOBPB, Siebra DC, Albuquerque RS, Lemos ICS, et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Saudi J Biol Sci. 2016;25(1):37–43. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.019. PMID: 29379354.

Silva DM, Costa PADA, Ribon AOB, Purgato A, Diaz-muñoz G, Diaz MAN. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. An Acad Bras Cienc. 2019;91(2):e20180117. doi: 10.1590/0001-3765201920180117.

da Silva PM, da Silva BR, de Oliveira Silva JN, de Moura MC, Soares T, Feitosa APS, et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. Int J Biol Macromol. 2019;135:931–9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.011. PMID: 31170488.

Skariyachan S, Taskeen N, Ganta M, Krishna BV. Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Crit Rev Microbiol. 2019;45(3):315–33. doi: 10.1080/1040841X.2019.1600472. PMID: 31012772.

Solarte AL, Astorga RJ, Aguiar F, Galán-Relaño Á, Maldonado A, Huerta B. Combination of antimicrobials and essential oils as an alternative for the control of salmonella enterica multiresistant strains related to foodborne disease. Foodborne Pathog Dis. 2017;14(10):558–63. doi: 10.1089/fpd.2017.2295. PMID: 28683217.

Solis-Arevalo KK, Garza-Gonzalez MT, Lopez-Calderon HD, Solis-Rojas C, Arevalo-Nino K. Electrospun membranes based on schizophyllan-pvoh and Hamamelis Virginiana extract: antimicrobial activity against microorganisms of medical importance. IEEE Trans Nanobioscience. 2019;18(4):522–7. doi: 10.1109/TNB.2019.2924166. PMID: 31226081.

Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, et al. Biofilm-associated infections: Antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. Future Microbiol. 2013;8(7):877–86. doi: 10.2217/fmb.13.58. PMID: 23841634.

Tang D, Liu L, Ajiakber D, Ye J, Xu J, Xin X, et al. Anti-diabetic effect of *Punica granatum* flower polyphenols extract in type 2 diabetic rats: Activation of Akt/GSK-3 β and inhibition of IRE1 α -XBP1 pathways. Front Endocrinol. 2018;9:586. doi: 10.3389/fendo.2018.00586. PMID: 30828441.

Theisen LL, Erdelmeier CAJ, Spoden GA, Boukhallouk F, Sausy A, Florin L, et al. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: Characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. PLoS One. 2014;9(1):e88062. doi: 10.1371/journal.pone.0088062. PMID: 24498245.

Thotambailu AM, Bhandary BSK, Sharmila K. Protective effect of *Punica granatum* extract in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;71:s318–20. doi: 10.1007/s12070-018-1297-4. PMID: 31741979.

Touriño S, Lizárraga D, Carreras A, Lorenzo S, Ugartondo V, Mitjans M, et al. Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) bark: Electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(3):696–704. doi: 10.1021/tx700425n. PMID: 18311930.

Trabelsi A, El Kaibi MA, Abbassi A, Horchani A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of *punica granatum* (pomegranate) leaves. *Scientifica (Cairo).* 2020;2020:8271203. doi: 10.1155/2020/8271203. PMID: 32318311.

Trüeb RM. North American virginian witch hazel (*hamamelis virginiana*): Based scalp care and protection for sensitive scalp, red scalp, and scalp burn-out. *Int J Trichology.* 2014;6(3):100–3. doi: 10.4103/0974-7753.139079.

Vahid Dastjerdi E, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A. Effect of *punica granatum* l. flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Iran J Public Heal.* 2014;43(12):1688–94. PMID: 26171362.

Ventola CL. The Antibiotic Resistance: part 1: causes and treats. *P T a Peer Rev J Formul Manag.* 2015;40(4):277–83. PMID: 25859123.

Vijay S, Bansal N, Rao BK, Veeraraghavan B, Rodrigues C, Wattal C, et al. Secondary infections in hospitalized COVID-19 patients: indian experience. *Infect Drug Resist.* 2021 May 24;14:1893-903. doi: 10.2147/IDR.S299774. PMID: 34079300.

Vučić V, Grabež M, Trchounian A, Arsić A. Composition and potential health benefits of pomegranate: a review. *Curr Pharm Des.* 2019;25(16):1817–27. doi: 10.2174/1381612825666190708183941. PMID: 31298147.

Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.* 2003;1(1):65–70. doi: 10.1038/nrmicro727. PMID: 15040181.

Wang D, Özen C, Abu-Reidah IM, Chigurupati S, Patra JK, Horbanczuk JO, et al. Vasculoprotective effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Front Pharmacol.* 2018;1:544. doi: 10.3389/fphar.2018.00544. PMID: 29881352.

Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. *Int J Env Res Public Heal.* 2020;17(17):6278. doi: 10.3390/ijerph17176278. PMID: 32872324.

Westblade LF, Simon MS, Satlin MJ. Bacterial coinfections in coronavirus disease 2019. *Trends Microbiol.* 2021;8:S0966. doi: 10.1016/j.tim.2021.03.018. PMID: 33934980.

Xu M, Fu Y, Fang Y, Xu H, Kong H, Liu Y, et al. High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing meningitis in Eastern China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:641–53. doi: 10.2147/IDR.S191892. PMID: 30936727.

Xu Y, Shi C, Wu Q, Zheng Z, Liu P, Li G, et al. Antimicrobial activity of punicalagin against *Staphylococcus aureus* and its effect on biofilm formation. *Foodborne Pathog Dis.* 2017;14(5):282–7. doi: 10.1089/fpd.2016.2226. PMID: 28128637.

Yang Y, Zhang Z, Li S, Ye X, Li X, He K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia.* 2014;92:133–47. doi: 10.1016/j.fitote.2013.10.010. PMID: 24177191.

Yu X, Zhang W, Zhao Z, Ye C, Zhou S, Wu S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on antimicrobial resistance. *BMC Genomics.* 2019 Nov 7;20(1):822. doi: 10.1186/s12864-019-6225-9. PMID: 31699025.

Zhou H, Yao Y, Zhu B, Ren D, Yang Q, Fu Y, et al. Risk factors for acquisition and mortality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(13):e14937. doi: 10.1097/MD.00000000000014937. PMID: 30921191.

Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK, et al. Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern Med.* 2013 Dec 9-23;173(22):2039-46. doi: 10.1001/jamainternmed.2013.9763. PMID: 23999949.