



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

PÂMELA BEATRIZ DO ROSÁRIO ESTEVAM DOS SANTOS

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*) E QUILAIA (*Quillaja saponaria*) ISOLADOS E ASSOCIADOS SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS

PÂMELA BEATRIZ DO ROSÁRIO ESTEVAM DOS SANTOS

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*) E
QUILAIA (*Quillaja saponaria*) ISOLADOS E ASSOCIADOS SOBRE
Pseudomonas aeruginosa RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS**

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

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Prof^a Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. 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).

Santos, Pâmela Beatriz Do Rosário Estevam Dos
Ação antimicrobiana de extratos de gengibre (*Zingiber officinale*) e quilaia (*Quillaja saponaria*) isolados e associados sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos / Pâmela Beatriz Do Rosário Estevam Dos Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
85 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.
Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Biofilme. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Antibacterianos. 5. Fitoterapia. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof.^a Dr.^a Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo

Universidade Paulista (Unip)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Ricardo Mendonça Neves dos Santos

UNIFATEA

Centro Universitário Teresa D'Ávila

Campus de Lorena

Prof.^a Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof.^a Assoc. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 18 de janeiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu maior exemplo: minha vó, Dona Lúcia, que me criou com todo o amor e dedicação e que é a grande responsável por tudo o que tive a oportunidade de me tornar.

Agradeço minha mãe Maria Aparecida, sempre disposta a me ajudar no que for preciso com muito amor.

Agradeço à minha ex-professora, ex-colega, ex-chefe, mas sempre amiga, Janaína Mattos por sempre torcer por mim, de longe ou de perto e sempre me fornecer uma palavra de conforto quando necessário.

Agradeço à minha amiga Juliana Gonçale, uma grata surpresa que a vida me (nos) proporcionou e que sigo (seguimos) cultivando com muito carinho.

Agradeço ao meu amigo Bruno César, meu colega de faculdade, colega de monitoria, colega na docência e grande amigo na vida.

À minha amiga Damara que ajudou a guiar meu caminho no Mestrado e caminhou ao meu lado nos dois anos mais difíceis da minha vida.

À minha amiga Daphne, com quem aprendi tanto sobre pesquisa, sobre amizade e sobre a vida e com quem pude compartilhar a bancada e construir não só conhecimento, mas um forte laço.

À minha amiga Ana Luiza, minha dupla de doutorado (nesses dois doutorados feitos à quatro mãos), uma colega por obrigação e grande amiga por opção.

À minha amiga mineirinha Karolina, sempre mãezona me aconselhando, me ouvindo e me acolhendo nos dias mais nublados.

Agradeço também à minha amiga Thaís Ribeiro que sentiu tantas dores comigo nos últimos anos e que me mostrou que a amizade pode ser um dos vínculos mais fortes que cultivamos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Thaís, Lucas, Vanessa e Ellen por momentos em que compartilhamos frustrações, alegrias e aprendizados em todos estes anos sempre nos ajudando para chegar aos melhores resultados.

Às professoras Juliana Campos Junqueira e Marianne Spalding agradeço por terem me ensinado tanto em aulas, laboratórios, projetos e por tornarem minha

experiência da pós-graduação mais leve e tranquila tanto com seus conhecimentos quanto com sua gentileza.

Às professoras Maria Aparecida Neves Jardim e Andrea Carvalho agradeço porque, mesmo com curtos períodos de convivência, se mostram sempre tão simpáticas, gentis e dispostas a me ajudar.

Agradeço também à Nádia Domingues e ao Felipe Eduardo de Oliveira, ex-alunos da minha orientadora e com quem, infelizmente, tive pouca convivência como colegas de pós-graduação, mas que tive o prazer de conhecer e que tão gentilmente aceitaram participar deste momento comigo.

À professora Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo agradeço por ocupar tantas vagas no meu coração como uma querida professora da graduação, como grande amiga que levei para a vida e, mais recentemente como a pessoa que me deu a maior oportunidade profissional, que confiou na minha capacidade e que enfrentou profissionalmente comigo esses anos de pandemia, anos difíceis e que superamos agora em direção aos momentos mais leves e, com certeza, a um futuro brilhante da nossa Biologia.

Ao professor Ricardo Mendonça Neves dos Santos, meu professor de Zoologia da graduação e que me inspirou tanto a ser docente de Ensino Superior. Um professor que me cobrava sempre a ser a melhor aluna que eu podia ser e a quem devo muito da minha formação como professora.

À professora Luana de Vasconcellos que desde o Mestrado se mostrou sempre disposta a me ajudar, a me ensinar e a me lapidar no que poderia me tornar com a carreira acadêmica e como professora.

À professora Liliana Scorzoni com quem, felizmente, tive bastante contato no laboratório e pra quem sempre me senti confortável em pedir ajuda e que sempre se mostrou disposta a me ajudar e me ensinar com toda a paciência, carinho e dedicação.

À minha orientadora Professora Luciane Dias de Oliveira, que, mesmo antes de ser minha orientadora me auxiliava e me acolhia na pós-graduação mostrando grande empatia, buscando sempre me tranquilizar e me ajudar da melhor forma, me mostrando os caminhos que eu não era capaz de encontrar sozinha para que pudesse trilhar este caminho de Mestrado e Doutorado da melhor forma possível.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado no ano de 2019.

RESUMO

Santos PB. Ação antimicrobiana de extratos de gengibre (*Zingiber officinale*) e quilaia (*Quillaja saponaria*) isolados e associados sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

Extratos de plantas têm demonstrado diversos efeitos positivos para a saúde, incluindo ação antimicrobiana, no entanto, o uso clínico da fitoterapia ainda é discreto, de modo que mais estudos sobre os efeitos benéficos do sinergismo farmacológico de extratos poderiam contribuir para sua aplicação terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos extratos glicólicos de gengibre (EG) e quilaia (EQ) isolados e em associação sobre 7 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e uma cepa padrão em forma planctônica e biofilmes monotípicos. Para a análise antimicrobiana sobre cultura planctônica foram feitos testes para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) (CLSI, M07-A9) dos extratos isolados, além do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e do Índice de Concentração Microbicida Fracionada (ICMF) para os extratos combinados. A análise estatística foi feita com método ANOVA e teste de Tukey para dados com distribuição normal e Kruskal-Wallis com Teste de Comparação Múltipla de Dunn para dados sem distribuição normal (significância de 5%). Para cepa padrão foram determinadas CIM igual a 3,12 mg/mL e CMM igual a 6,25 mg/mL para ambos os extratos. Para cepas clínicas as CIM do EG foram 3,12 ou 6,25 mg/mL e de EQ 1,56 ou 3,12 mg/mL, enquanto os valores de CMM foram de 6,25 mg/mL para EG e de 1,56, 3,12 ou 6,25 mg/mL para EQ. Os resultados de ICIF indicaram 15 associações sinérgicas e 4 associações aditivas dos extratos contra a cepa padrão e, dentre cepas clínicas, foram obtidos 15 resultados aditivos. A partir dos resultados de ICMF foram identificadas 6 associações sinérgicas e 1 associação aditiva contra a cepa padrão, além de 8 associações com efeito aditivo contra cepas clínicas. A partir dos resultados de testes em culturas planctônicas foi avaliada a ação antibiofilme sobre as cepas em que foram observadas reduções de viabilidade de 36,7 e 34% para o EG (50 e 25 mg/mL) e 51,3 e 51,4% para EQ (25 e 12,5 mg/mL) contra cepa padrão. As reduções em cepas clínicas variaram de 43 a 73% com EG e de 36 a 79% para EQ. As associações dos extratos promoveram reduções de viabilidade de 8 a 35% contra 5 das 7 cepas clínicas. Conclui-se que os extratos glicólicos de gengibre e quilaia apresentam ação antimicrobiana de forma isolada e combinados com efeito aditivo sobre a forma planctônica de cepas clínicas resistentes de *P. aeruginosa*. De forma isolada, os extratos apresentaram importante ação preventiva na formação dos biofilmes dessas cepas, podendo ser considerados potenciais fitoterápicos com aplicações terapêuticas para o combate das infecções por *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilme; resistência microbiana a medicamentos; antibacterianos; fitoterapia.

ABSTRACT

Santos PB. Antimicrobial action of isolated and associated extracts of ginger (*Zingiber officinale*) and quilaia (*Quillaja saponaria*) on antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Plant extracts have demonstrated several positive health effects, including antimicrobial action, however, the clinical use of phytotherapy is still discreet, so that more studies on the beneficial effects of pharmacological synergism of extracts could contribute to its therapeutic application. The aim of this study was to evaluate the effects of glycolic extracts of ginger (EG) and quilaia (EQ) alone and in combination on 7 clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and a standard strain in planktonic form and monotypic biofilms. For the antimicrobial analysis on planktonic culture, tests were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (MMC) (CLSI, M07-A9) of the isolated extracts, in addition to the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and the Fractionated Microbicidal Concentration Index (FICM) for the combined extracts. Statistical analysis was performed using the ANOVA method and Tukey's test for data with normal distribution and Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test for data without normal distribution (5% significance). For the standard strain, MIC were determined equal to 3.12 mg/mL and MMC equal to 6.25 mg/mL for both extracts. For clinical strains the MIC of EG were 3.12 or 6.25 mg/mL and 1.56 or 3.12 mg/mL of EQ, while the MMC values were 6.25 mg/mL for EG and 1.56, 3.12 or 6.25 mg/ml for EQ. The FICI results indicated 15 synergistic and 4 additive associations of the extracts against the standard strain and, among clinical strains, 15 additive results were obtained. From the FICM results, 6 synergistic and 1 additive association against the standard strain were identified, in addition to 8 associations with additive effect against clinical strains. Based on the results of tests on planktonic cultures, the antibiofilm action were evaluated on the strains in which viability reductions of 36 and 34% were observed for EG (50 and 25 mg/mL) and 51% were observed for EQ (25 and 12, 5 mg/mL) against the standard strain. Reductions in clinical strains ranged from 43 to 73% with EG and from 36 to 79% for EQ. Associations of extracts promoted viability reductions of 8 to 35% against 5 out of 7 clinical strains. It is concluded that the glycolic extracts of ginger and quilaia have antimicrobial action in isolation and combined with additive effect on the planktonic form of resistant clinical strains of *P. aeruginosa*. Isolated, the extracts showed an important preventive action in the formation of biofilms of these strains and may be considered potential herbal medicines with therapeutic applications to combat *P. aeruginosa* infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; drug resistance, microbial; anti-bacterial agents; phytotherapy.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.1.1 Biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.1.2 Mecanismos de resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a antimicrobianos	17
2.1.2.1 Resistência intrínseca	17
2.1.2.2 Resistência adquirida	20
2.1.2.3 Resistência adaptativa	21
2.2 Fitoterápicos	22
2.2.1 Gengibre	24
2.2.2 Quilaia	25
3 PROPOSIÇÃO	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Extratos e associação	28
4.2 Cepas bacterianas	28
4.3 Ação antimicrobiana dos extratos isolados sob forma planctônica de <i>P. aeruginosa</i>	28
4.4 Ação antimicrobiana dos extratos associados sob forma planctônica de <i>P. aeruginosa</i> – Teste <i>checkerboard</i>	32
4.5 Atividade antimicrobiana dos extratos isolados e associados sobre biofilmes monotípicos de <i>P. aeruginosa</i>	36
4.5.1 Análise estatística	39
5 RESULTADO.....	40
5.1 Ação antimicrobiana dos extratos isolados sob forma planctônica de <i>P. aeruginosa</i>	40

5.2 Ação antimicrobiana dos extratos associados sob forma planctônica de <i>P. aeruginosa</i> – Teste <i>checkerboard</i>	43
5.3 Atividade antimicrobiana dos extratos isolados e associados sobre biofilmes monotípicos de <i>P. aeruginosa</i>	60
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de bactérias patogênicas multidroga resistentes (MDR) é uma das principais causas de preocupação global e em 2017 a Organização Mundial da Saúde publicou a lista de patógenos resistentes a antibióticos prioritários com foco em espécies Gram-negativas resistentes que representariam maior ameaça à saúde humana por apresentarem habilidades de encontrar novas formas de resistir ao tratamento, assim como de transferir geneticamente essas características (Nasser et al., 2020; World Health Organization, 2017). A lista foi dividida em três categorias (crítica, alta e média prioridade) formuladas de acordo com a urgência da necessidade de descoberta de novos antibióticos (World Health Organization, 2017)

Em relação às características da resistência bacteriana a antibióticos algumas definições foram criadas para que estes patógenos resistentes relacionados à assistência à saúde pudessem ser classificados (Magiorakos et al., 2012). Assim, o Centro Europeu para a Prevenção e Controle das Doenças (ECDC), os Centros para o Controle e Prevenção das Doenças (CDC) e diversos especialistas desenvolveram classificação com foco em *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* (exceto *Salmonella* e *Shigella*), *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (Magiorakos et al., 2012). Para a classificação apenas a resistência adquirida foi considerada definindo como bactérias MDR (multidroga resistente, em inglês “*multidrug-resistant*”) aquelas não suscetíveis a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos; XDR (extensivamente resistente a medicamentos, “*extensively drug-resistant*”) para aquelas não suscetíveis a pelo menos um agente em todas exceto duas ou menos categorias de antimicrobianos e PDR (pandroga resistente, “*pandrug-resistant*”) foi definida como bactéria não suscetível a todos os agentes em todas as categorias antimicrobianas (Magiorakos et al., 2012). É importante ressaltar que, para correta aplicação das definições, os isolados em estudo precisam ser testados para todos ou quase todos os agentes antimicrobianos disponíveis (Magiorakos et al., 2012).

P. aeruginosa é um bacilo Gram-negativo que se destaca por apresentar não só mecanismos de resistência intrínsecos, mas também adaptativos e adquiridos e *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos se encontra no grupo mais crítico de

bactérias multidroga resistentes (MDR), que representa ameaça especialmente em hospitais e lares de idosos, assim como entre pacientes que utilizam dispositivos médicos como ventiladores e cateteres sanguíneos bastante associados à formação de seus biofilmes (Lee, Yoon, 2017; Pang et al., 2019; Skariyachan et al., 2018; World Health Organization, 2017). Embora em indivíduos saudáveis só cause infecções consideradas leves, *P. aeruginosa* apresenta capacidade de causar graves infecções em diferentes partes do corpo humano em pacientes com o sistema imunológico comprometido, sendo, por exemplo, uma das principais causas de mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC) e considerado um patógeno oportunista que se adapta a diferentes condições ambientais com resistência à diversas classes de antibióticos (Lee, Yoon, 2017).

Além da crescente problemática da resistência a antimicrobianos sendo destacada e discutida ao redor do mundo, em dezembro de 2019, em Wuhan (China), foi reportada uma nova ameaça à saúde humana: a infecção por coronavírus (COVID-19) que se espalhou pelo mundo em pouco tempo e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, se tornou uma doença pandêmica em 3 meses (Boozari et al., 2021; Chong et al., 2021). Além de a infecção viral apresentar, de forma isolada, um grande problema para a saúde mundial, a resistência bacteriana a antibióticos foi considerada como um fardo adicional para o sistema de saúde neste novo cenário, pois a coinfeção por coronavírus associada à pneumonia representou problemática muito além das capacidades e recursos de unidades de saúde (Mirzaei et al., 2020), sendo importante ressaltar que diversos estudos demonstraram coinfeções de COVID-19 e *P. aeruginosa* (dentre outras espécies) alertando também para o potencial de associação entre estes diferentes patógenos que podem agravar ainda mais as problemáticas já presentes na área da saúde (Costa et al., 2022; Chong et al., 2021; Garcia-Vidal et al., 2021; Giacobbe et al., 2020; Lansbury et al., 2020; Reynolds, Kollef, 2021).

Assim, demonstra-se a importância clínica de *P. aeruginosa* como ameaça crítica à saúde humana, o que torna de grande interesse o estudo de substâncias antimicrobianas que tenham sucesso no combate da espécie. A humanidade tem utilizado remédios antimicrobianos por milênios antes do desenvolvimento da teoria dos germes de doenças no século XIX e combater patógenos resistentes exige um esforço coordenado global que envolve não só o desenvolvimento de novos

antibióticos convencionais, mas também o desenvolvimento de drogas alternativas com ação antimicrobiana, o gerenciamento de antimicrobianos existentes e a rápida detecção de patógenos resistentes a antimicrobianos (Enioutina et al., 2017) e uma opção interessante de estudo para este cenário é a fitoterapia (ou herbalismo na medicina ocidental), ou seja, o uso de plantas ou seus extratos para aplicações medicinais tanto para tratar doenças quanto para promover a saúde (Falzon, Balabanova, 2017; Kim, 2012).

Dentre diversos fitoterápicos disponíveis, destaca-se a potencial ação antimicrobiana e antibiofilme de gengibre (*Zingiber officinale*) e quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) contra *P. aeruginosa* resistente a antibióticos visto que produtos fabricados a partir dessas plantas e suas frações já demonstraram ação benéfica em diversas áreas da saúde, inclusive no combate a microrganismos (Abu El-Wafa et al., 2020; Chakotiya et al., 2017; Fleck et al., 2019; Kim et al., 2012; Lima et al., 2018; Sagar et al., 2020; Shukla et al., 2021; Silva et al., 2018; Talebi et al., 2021; Tippel et al., 2016).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um organismo Gram-negativo, ubíquo e ambiental (habitando superfícies bióticas e abióticas) normalmente isolado de plantas, frutas, solo, rios, lagos e piscinas e que pode promover doenças em plantas e animais (Alav et al., 2018; Azam, Khan, 2019; Lee, Yoon, 2017; Mielko et al., 2019). Em condições específicas *P. aeruginosa* pode ser um fator patogênico de infecções severas, e frequentemente oportunistas, em humanos infectando frequentemente as vias respiratórias e o trato urinário, além de promover infecções sanguíneas e ser a causa mais comum de infecções em queimaduras, dermatite de banheiras de hidromassagem e infecções do ouvido externo (conhecidas como orelha do nadador) (Mielko et al., 2019).

Microrganismos do gênero *Pseudomonas* apresentam alta capacidade de utilizar substratos variados, assim como alta tendência à resistência a antibióticos (Mielko et al., 2019). Dessa forma, grandes desafios vêm sendo enfrentados no controle da infecção por *P. aeruginosa*, devido à um constante surgimento de cepas resistentes a antibióticos, o que aumenta a ocorrência de doença e taxa de mortalidade pelo patógeno (Lee, Yoon, 2017).

Muitos estudos foram desenvolvidos sobre diferentes níveis de organização molecular de *P. aeruginosa*, fornecendo informação detalhada sobre sua estrutura genômica que conta com aproximadamente 6,5 milhões de pares de bases (Mpb) que codificam grande proporção de enzimas regulatórias importantes para o metabolismo, transporte e efluxo de componentes orgânicos (Mielko et al., 2019; Pang et al., 2019). Em seu extenso genoma, *P. aeruginosa* possui 5.021 genes, sendo o genoma central acompanhado por genes presentes em um número menor de cepas, sendo estimado que o completo conjunto de genes encontrado em diferentes cepas inclua entre 10.000 e 40.000 genes com diferenças no seu arranjo genômico (Mielko et al., 2019). Um importante fator para a importância clínica da espécie em infecções hospitalares é a sua habilidade de formar biofilmes, já sendo conhecida a capacidade de, a partir da conversão de forma planctônica para forma de biofilme mudar o padrão de

expressão de genes e aumentar a taxa da transferência gênica lateral em grande escala (Lee, Yoon, 2017).

2.1.1 Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*

A nomenclatura “biofilme” é utilizada desde 1975 e é definida como uma comunidade de microrganismos que habitam diversas superfícies e que são cercados de matrizes extracelulares secretadas pelos próprios microrganismos, assim, o biofilme forma um agregado semelhante a uma membrana de comunidades microbianas firmemente aderidas a uma superfície e incorporadas em matriz que constitui sua estrutura básica composta de substâncias poliméricas extracelulares: exopolissacarídeos (EPS), ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e outras biomoléculas (Lee, Yoon, 2017; Zhang et al., 2020). A descoberta da arquitetura complexa de biofilmes e a presença de seus canais de água atraíram a atenção dos microbiologistas por indicar que os biofilmes não são apenas uma coleção de bactérias, mas uma comunidade microbiana ativamente desenvolvida (Lee, Yoon, 2017).

A formação de biofilmes tem sido observada em diferentes espécies bacterianas patogênicas em ambientes clínicos, domésticos e industriais, sendo a formação da estrutura em dispositivos médicos uma das maiores causas de infecções nosocomiais que podem dificultar o tratamento devido ao crescimento de tolerância a antibióticos em concentrações mais altas do que aquelas aceitáveis para forma planctônica da bactéria, além de maior resistência ao sistema imune do hospedeiro (Alav et al., 2018; Zhang et al., 2020). Em *P. aeruginosa* o biofilme é considerado como um dos principais fatores de virulência com formas sésseis de crescimento da espécie descritas desde a década de 1990 e que pode ser desenvolvido em superfícies abióticas, como implantes médicos ou equipamentos industriais (Lee, Yoon, 2017; Thi et al., 2020).

Dadas as diferenças na disponibilidade de nutrientes e oxigênio, o crescimento das células bacterianas varia em diferentes regiões do biofilme: as células bacterianas que crescem na região superficial são metabolicamente mais

ativas, enquanto as células internas crescem mais lentamente (Azam, Khan, 2019). A maioria dos antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos são eficazes apenas contra células em crescimento (metabolicamente ativas), enquanto outros antibióticos, como polimixinas, matam células com condições de crescimento precárias (Azam, Khan, 2019). Uma das formas específicas de resistência do biofilme é a barreira física proporcionada pela matriz extracelular que retarda a distribuição de antibióticos por sua estrutura, sendo interessante ressaltar que baixas concentrações de antibióticos matam a maioria das células do biofilme de *P. aeruginosa*, mas mesmo com aumento de concentração, algumas células não são mortas formando uma subpopulação denominada como células persistentes: variantes fenotípicas que não são geneticamente resistentes a antibióticos, mas que apresentam tolerância a altas concentrações desses fármacos e que se proliferam de forma extremamente vagarosa ou estacionam completamente seu crescimento (metabolicamente menos ativas) (Azam, Khan, 2019; Lee, Yoon, 2017; Pang et al., 2019).

Embora seja considerado complicado, contínuo, dinâmico e sem limites claros, o processo de desenvolvimento do biofilme é geralmente dividido em diferentes estágios: de adesão/fixação inicial, agregação, maturação e desprendimento ou liberação bacteriana do biofilme (Lee, Yoon, 2017; Zhang et al., 2020). *P. aeruginosa* desenvolve biofilmes robustos em que o estágio de fixação é mediado por adesinas, lipopolissacarídeos, flagelos, pili do tipo IV e PSL tendo como principal mecanismo regulatório o *quórum sensing* (O'Toole et al., 2000; Tolker-Nielsen, 2015). Os pili do tipo IV são apêndices filamentosos retráteis, semelhantes a cabelos, localizados polarmente na célula e caracterizados por serem estruturas essenciais para o início da infecção mediando a motilidade e a adesão do patógeno (Jurado-Martín et al., 2021). O PSL é um polissacarídeo composto por repetições de L-ramnose, D-glicose e D-manose que aumenta a reticulação e a elasticidade da matriz, o que reforça a estrutura de andaime e promove o estabelecimento de microcolônias sendo um importante componente da matriz para a iniciação e manutenção dos biofilmes de *P. aeruginosa* por fornecer fixação da superfície celular e interações intercelulares, além de promover suporte estrutural e permitir posterior dispersão (Lee, Yoon, 2017; Skariyachan et al., 2018).

Durante a maturação dos biofilmes de *P. aeruginosa* há diversas alterações para adaptação a um novo modo de vida: enquanto a bactéria fixada a uma superfície

cresce e forma microcolônias, começa também a formar estruturas e canais de água e a produzir a matriz extracelular (constituída de EPS, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos como o DNA extracelular ou eDNA) (Lee, Yoon, 2017; Reynolds, Kollef, 2021; Skariyachan et al., 2018).

O alginato ou exopolissacarídeo mucóide é o EPS mais estudado sendo constituído de um polímero de alto peso molecular com proporções variáveis de ácidos D-manurônico e L-gulurônico e cuja produção, é essencial para a formação do fenótipo mucoide de *P. aeruginosa* (encontrado na fibrose cística) protegendo as bactérias das adversidades ambientais e melhorando a adesão da superfície (Jurado-Martín et al., 2021; Reynolds, Kollef, 2021).

A lise celular, causada por estresse ambiental (como o tratamento antimicrobiano) libera DNA extracelular (eDNA) no ambiente, um dos constituintes cruciais da forma séssil bacteriana, cuja liberação pode ocorrer tanto no desenvolvimento inicial dos biofilmes quanto na fase planctônica, em bactérias em forma de bastonete que se transformam rapidamente em células redondas resultantes de danos estruturais da parede celular seguidas de lise (Thi et al., 2020). A importância do eDNA como componente estrutural do biofilme foi demonstrada em *P. aeruginosa* sendo associado a outro elemento principal do seu biofilme, o PSL, constituindo a malha de fibras PSL-eDNA (Lee, Yoon, 2017; Skariyachan et al., 2018).

A matriz extracelular, responsável por mais de 90% da biomassa do biofilme, atua como um andaime para adesão a superfícies bióticas e abióticas e abrigo para bactérias encapsuladas em condições ambientais adversas (presença de antibióticos e respostas imunes do hospedeiro), além de fornecer um repertório de bens públicos como nutrientes essenciais, enzimas e proteínas citosólicas para a comunidade do biofilme (Thi et al., 2020). Para formar e manter suas comunidades, *P. aeruginosa* tem a capacidade inerente de gerar variedade de macro e micromoléculas que constituem a matriz e, enquanto o biofilme amadurece, *P. aeruginosa* passa por alterações fisiológicas e se torna muito mais resistente aos estresses ambientais ou provenientes da ação de antibióticos (Lee, Yoon, 2017; Skariyachan et al., 2018).

A aquisição e manutenção da forma de crescimento como biofilme pela bactéria é regulada pelo mecanismo de *quorum sensing* (QS), um sistema de comunicação intercelular com várias vias de transdução de sinal interconectadas que permite comunicação entre as células individuais e que orchestra o comportamento

coletivo essencial para a adaptação e sobrevivência de comunidades inteiras, com coordenação de acordo com a densidade populacional a partir de síntese, reconhecimento e resposta à moléculas sinalizadoras extracelulares autoindutoras, cuja concentração possibilita monitoramento de alterações no número de células e coordene a expressão de genes específicos permitindo que *P. aeruginosa* coordene sua atividade contra o hospedeiro durante uma infecção (Alav et al., 2018; Reynolds, Kollef, 2021; Thi et al., 2020). Existem diferenças entre os tipos de moléculas autoindutoras utilizadas, porém, todos os sistemas de QS dependem de três princípios essenciais: a síntese dessas moléculas, a sua detecção por receptores e a ativação de genes específicos para quórum por fatores de transcrição (Alav et al., 2018). Nos períodos de baixa densidade populacional, as moléculas difundem pelo meio e sua concentração permanece abaixo do nível detectável, mas, com a elevação na densidade populacional, há muitas células próximas sintetizando as moléculas, o que resulta em acúmulo desse produto que acarreta a detecção pelos receptores (intracelulares ou associados à membrana) (Alav et al., 2018).

A fase de destacamento bacteriano do biofilme apresenta grande importância clínica pois, a formação de biofilme pode ocorrer, por exemplo, nos pulmões de pacientes com doença pulmonar crônica onde os organismos formam biofilme no muco espessado das vias aéreas e raramente precisam se deslocar para as superfícies celulares, porém, após a formação da colônia, algumas bactérias podem se libertar de infectar outras áreas e, inclusive, encontrar novos nichos para formação de biofilmes (Lee, Yoon, 2017; Reynolds, Kollef, 2021) .

As infecções agudas causadas por *P. aeruginosa* são predominantemente associadas com a forma planctônica da bactéria, enquanto as funções associadas à formação de biofilme apresentam papel importante em infecções persistentes e crônicas, sendo que a maior resistência em biofilmes está associada ao uso de vários mecanismos específicos dessa estrutura que são diferentes daqueles normalmente utilizados pela forma planctônica, tornando-se um relevante problema na medicina pelo fato de as infecções acarretarem maior resistência a antibióticos, à resposta imunológica do hospedeiro e aos desinfetantes utilizados em unidades de saúde (Lee, Yoon, 2017). Além disso, as infecções associadas a biofilmes podem estar relacionadas ao uso de dispositivos médicos como as infecções associadas a cateteres venosos centrais, cateteres urinários, cateteres de diálise peritoneal,

próteses articulares, marcapassos, lentes de contato, dispositivos intrauterinos etc. apresentando alto risco de progressão para infecção sistêmica e cujo único tratamento até o momento é a remoção do dispositivo, visto que a estrutura de biofilme pode permitir a sobrevivência durante a inflamação e o tratamento agressivo com antibiótico causando desenvolvimento de infecção persistente (Lee, Yoon, 2017).

2.1.2 Mecanismos de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* a antimicrobianos

Os principais mecanismos utilizados por *P. aeruginosa* para conter o ataque dos antibióticos podem ser classificados como resistência intrínseca, adquirida ou adaptativa (Pang et al., 2019).

2.1.2.1 Resistência intrínseca

A resistência intrínseca, em que microrganismos tendem a ser naturalmente resistentes a certas classes de agentes antimicrobianos, limita e complica a seleção de medicamentos para o tratamento além de ocorrer mais proeminentemente em biofilmes, incluindo baixa permeabilidade da membrana, expressão de bombas de efluxo (que expõem antibióticos para fora da célula) e produção de enzimas inativadoras de antibióticos (Alav et al., 2018; Codjoe, Donkor, 2017; Langendonk et al., 2021; Pang et al., 2019).

Sendo uma bactéria Gram-negativa, a baixa permeabilidade de *P. aeruginosa* se relaciona com sua bicamada fosfolipídica simétrica e membrana externa assimétrica (uma face fosfolipídica interna e uma camada lipopolissacarídica externa) que compõem um revestimento que promove uma barreira à permeabilidade (Chevalier et al., 2017; Lee, Yoon, 2017). Assim, a troca de nutrientes através da membrana externa é determinada por proteínas β -barril (também chamadas de porinas) que produzem canais de difusão cheios de água e promovem aparência de

peneira molecular à membrana, no entanto, o gênero *Pseudomonas* não possui porinas muito grandes (Chevalier et al., 2017).

Bombas de efluxo são proteínas de membrana que exportam substâncias nocivas de dentro para fora da célula bacteriana, podendo atuar sobre um substrato específico ou sobre ampla diversidade de substratos (Alav et al., 2018). O sistema de bombas é caracterizado por eficiente efluxo de antibióticos que permeiam lentamente a membrana externa da bactéria formando uma ação combinada do efluxo ativo com a barreira da membrana que protege as células de muitos compostos, permitindo que os microrganismos resistam a antimicrobianos e regulem o ambiente interno da célula expulsando agentes prejudiciais como metabólitos e antibióticos (impedindo ou limitando seu acesso ao local alvo dentro da célula) (Azam, Khan, 2019; Mehla et al., 2021; Ugwuanyi et al., 2021). Algumas das mais clinicamente significativas bombas de efluxo de bactérias Gram-negativas pertencem à superfamília resistência-nodulação-divisão que inclui a MexAB-OprM de *P. aeruginosa*, que confere resistência a beta-lactâmicos (exceto Imipenem e biapenem), fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfonamidas, cloranfenicol, tetraciclina, penicilinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, lincomicina, macrolídeos, novobiocina e carbapenems; enquanto as bombas MexXY-OprM são as maiores contribuintes para a resistência a aminoglicosídeos, sendo associadas também à resistência a cefepime, aminoglicosídeo, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfonamidas e macrolídeos (Alav et al., 2018; Langendonk et al., 2021; Lupo et al., 2018).

Estudos sugerem também que as bombas de efluxo podem atuar no mínimo de quatro maneiras na formação do biofilme: efluxo de EPS; moléculas de QS (para facilitar formação de matriz) e de extinção de quórum (para regular o QS); regulação indireta de genes envolvidos na formação de biofilme; efluxo de moléculas prejudiciais como antibióticos e intermediários metabólicos e influenciando agregação a superfícies e outras células (Alav et al., 2018). Em *P. aeruginosa*, bombas de efluxo podem atuar no transporte de componentes importantes para a formação dos biofilmes como lactonas de acil-homoserina (Alav et al., 2018).

Ao longo do tempo, as enzimas hidrolisadoras de β -lactâmicos tiveram seus espectros de atividade expandidos começando com as penicilinases, seguidas pelas cefalosporinases, β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), metalo- β -lactamases (MBLs) e outras carbapenemases (Codjoe, Donkor, 2017). Análises moleculares e

genéticas de isolados clínicos mostraram que *P. aeruginosa* pode produzir uma variedade de enzimas inativadoras de antibióticos do tipo β -lactamase, algumas codificadas por genes cromossômicos e outras transportadas por elementos genéticos móveis (como plasmídeos e transposons) (Espinoza Pesantez, Sanchez, 2021).

P. aeruginosa produtora de β -lactamase é aquela à qual a população humana é mais vulnerável, caracterizada pela capacidade de hidrolisar β -lactâmicos apresenta multirresistência a uma ampla gama de antimicrobianos, como penicilina, cefalosporina, cefamicina e carbapenem (Nasser et al., 2020). Estudos indicaram que dentre as β -lactamases reconhecidas em *P. aeruginosa*, as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), metalo- β -lactamases (MBLs) e Amp-C são as mais importantes clinicamente, dificultando ainda mais o tratamento antimicrobiano (Hosu et al., 2021; Nasser et al., 2020).

As ESBLs são um conjunto de β -lactamases que inativam β -lactâmicos, especialmente oximino- β -lactâmicos e monobactâmicos e surgimento de *P. aeruginosa* produtora dessas enzimas é cada vez mais relatado como uma das principais causas de infecções associadas à assistência à saúde, no entanto, embora a produção dessas enzimas seja uma preocupação constante para a supervisão do controle de infecções por restringir as escolhas terapêuticas, são enzimas reprimidas por inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico (Hosu et al., 2021).

Já as MBLs hidrolisam eficientemente carbapenêmicos e outros β -lactâmicos (exceto monobactams), mas se diferenciam por não serem inibidos pelos inibidores de β -lactamase clinicamente disponíveis, incluindo ácido clavulânico e tazobactam (Hong et al., 2015). Essas enzimas são consideradas muito importantes para *P. aeruginosa* e os genes que as codificam são mediados por plasmídeos ou cromossomos, geralmente transferíveis horizontalmente que classicamente se agrupam com outros determinantes de resistência a drogas (El-Far et al., 2021).

A cefalosporinase cromossômica AmpC é uma β -lactamase caracterizada por hidrólise eficiente de cefalosporinas e resistência à inativação por clavulanato, sulbactam e tazobactam, sendo uma enzima induzível em *P. aeruginosa* (Espinoza Pesantez, Sanchez, 2021). Já a cefalosporinase AmpC de espectro estendido é uma enzima variante mutacional da cefalosporinase AmpC que influencia na suscetibilidade a carbapenêmicos (Oliveira, Reygaert, 2022; Espinoza Pesantez, Sanchez, 2021).

A detecção da resistência a carbapenêmicos mediada por carbapenemases tem importância clínica pois permite otimizar a aplicação de medidas de controle de infecções (barreiras de contato) para conter disseminação e ajustar o tratamento considerando novas alternativas (Espinoza Pesantez, Sanchez, 2021). No entanto, a capacidade de sintetizar enzimas capazes de hidrolisar esses compostos, as carbapenemases, atualmente constitui o mecanismo de resistência mais importante, devido à capacidade de disseminação horizontal que os genes que codificam essas enzimas podem ter (Costa et al., 2021). A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode complicar os regimes de tratamento, dada a frequência com que *P. aeruginosa* é resistente a outros antimicrobianos (Reynolds, Kollef, 2021). A detecção de produtores de carbapenemases em *P. aeruginosa* é importante uma vez que muitos genes codificadores de carbapenemases são codificados por plasmídeos sendo facilmente transferíveis (García-Betancur et al., 2021).

Os carbapenêmicos estão entre as principais opções de tratamento para infecção grave por *P. aeruginosa*, mas o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer por resistência intrínseca, adquirida ou ambos e estudos indicam inibição da transpeptidase como o principal alvo dos carbapenêmicos durante a síntese da parede celular bacteriana: por meio da transpeptidase, uma ligação covalente é formada por proteínas de ligação de penicilina (PBPs) compreendendo enzimas carboxipeptidase e transpeptidase que, de fato, impedem suas atividades de reticulação peptídica durante a biossíntese de peptidoglicano (Codjoe, Donkor, 2017; El-Far et al., 2021). Além disso, a evolução de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos mediada pela aquisição de genes que codificam enzimas (como as enzimas hidrolisadoras de carbapenem) é uma preocupação global (El-Far et al., 2021).

2.1.2.2 Resistência adquirida

O desenvolvimento da resistência adquirida pode resultar da aquisição de genes externos responsáveis por resistência a partir da transferência horizontal e mutações de genes cromossômicos e, em *P. aeruginosa* diversos genes de

resistência, incluindo para diferentes classes de carbapenemases, têm se distribuído em número crescente por transferência horizontal (Azam, Khan, 2019; Colque et al., 2020).

O uso de antibióticos específicos durante o tratamento pode selecionar mutações que levam à superexpressão de sistemas de efluxo, que, associada à perda de porina OprD são os mecanismos mais comuns de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, sendo a porina OprD caracterizada como a principal via para a resistência a carbapenêmicos em isolados humanos do patógeno (Codjoe, Donkor, 2017; Lupo et al., 2018).

2.1.2.3 Resistência adaptativa

Os mecanismos de resistência adaptativa são aqueles induzidos por meio de estímulo externo como fatores estressantes e a presença de certos antibióticos, diferindo de mutações de resistência adquiridas por serem transitórias e instáveis e que frequentemente levando à expressão gênica alterada, mudanças em síntese proteica e alteração de alvos (Langendonk et al., 2021).

A regulação positiva de bombas de efluxo também pode ser um mecanismo adicional de resistência adaptativa, além da redução da permeabilidade a antibióticos, mutações que alteram sítios alvo e produção de enzimas que modificam antibióticos resultando na alteração química do antibiótico ou sua destruição (Azam, Khan, 2019).

P. aeruginosa apresenta significativas capacidades adaptativas como no caso de desenvolvimento de infecções crônicas em pacientes com fibrose cística, um estágio em que o patógeno é praticamente impossível de erradicar (Mielko et al., 2019).

Embora existam diversas enzimas e outros métodos de resistência já conhecidos em *P. aeruginosa*, as oito categorias de agentes antimicrobianos frequentemente usados para tratar suas infecções são aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, netilmicina, trobramicina), carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), fluoroquinolonas (Ciprofloxacin, levofloxacin), penicilinas com inibidores de beta-lactamase (ácido

ticarcilina-clavulânico, Tazobactam-piperaciclina), monobactams (aztreonam), ácidos fosfônicos (fosfomicina) e polimixinas (colistina e polimixina B) (Botelho et al., 2019). No entanto, com as infecções resistentes a antibióticos convencionais, o desenvolvimento de novos antibióticos ou estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* se tornou uma necessidade urgente e novos fármacos com novos modelos de ação têm sido explorados, assim como novas rotas de administração e resistência à modificação por enzimas bacterianas (Pang et al., 2019).

2.2 Fitoterápicos

Desde a antiguidade há um importante papel das plantas na história da humanidade participando da busca pela melhoria da saúde e com foco na atualidade retornando dos agentes sintéticos para agentes naturais devido ao interesse em propriedades antioxidantes, antibacterianas e anticarcinogênicas de plantas e seus extratos (Chakraborty, 2018; Nunes et al., 2017). A fitoterapia costuma preservar a composição e integridade original da planta de origem, de forma que toda a planta ou uma porcentagem de seus componentes minimamente adulterados são aplicados para propósitos medicinais, e, como as plantas contêm diversos constituintes químicos, o produto final é rotulado como padronizado para o marcador constituinte, assim há o processamento dos materiais vegetais para que o produto final contenha um constituinte marcador de referência em uma concentração verificada, sendo que o propósito de identificar um marcador constituinte é gerar produto final que possua a concentração desejada de um constituinte ativo (Falzon, Balabanova, 2017).

A medicina tradicional (medicina antropológica, medicina naturopática, medicina tradicional chinesa, medicina alopática ayurvédica) têm confiado em plantas medicinais por milênios e a humanidade aprendeu por experiência e observação a utilizar as plantas de forma correta, construindo uma extensa cultura tradicional de seu uso (Colalto, 2018; Falzon, Balabanova, 2017). Durante os últimos cem anos ou mais, o progresso científico e técnico, especialmente os estudos de farmacognosia, têm permitido a descoberta de grande número de novas moléculas e de seu

mecanismo de ação, e, enquanto a farmacologia moderna começou o estudo das plantas medicinais tradicionais, passando a estudar moléculas individuais e extratos padronizados, a farmacognosia moderna concentra-se em melhorar a pesquisa e descobrir novas propriedades de um número cada vez maior de plantas medicinais (Colalto, 2018).

Estratégias comuns no combate de resistência a antibióticos incluem a identificação de novos antimicrobianos, desenvolvimento de novas terapias combinadas com aumento da atividade contra microrganismos multidrogaresistentes e cuidadoso uso das drogas antimicrobianas já existentes para desacelerar a disseminação dos microrganismos resistentes, porém, houve um aumento significativo no uso de remédios naturais para diversas aplicações (Che, Zhang, 2019; Enioutina et al., 2017; Yeung et al., 2018).

Médicos e provedores podem aplicar a fitoterapia tanto usando uma única erva no tratamento quanto múltiplas ervas para complementar propriedades, além de poderem misturar também outros tipos de substâncias como minerais e vitaminas (Falzon, Balabanova, 2017). Ainda com grande importância na atualidade, o uso mais tradicional frequentemente utiliza uma parte inteira da planta, como ocorre com infusões (como o chá de camomila, por exemplo), enquanto a medicina herbal ocidental utiliza mais frequentemente ervas isoladas padronizadas a um componente de extrato, já as medicações farmacêuticas derivadas de plantas são tipicamente compostos isolados por meio de separação industrial e extração de componentes identificados como detentores de propriedades terapêuticas (Sen, Samanta, 2015; Falzon, Balabanova, 2017).

Dentre as diversas aplicações para diferentes funções preventivas e terapêuticas conhecidas popularmente e/ou cientificamente de fitoterápicos, uma importante função de extratos vegetais já demonstrada foi a ação antibacteriana já comprovada com tomilho (*Thymus vulgaris* L.), sálvia-comum (*Salvia officinalis*), própolis, guamirim (*Myrcia oblongata*), romã (*Punica granatum*), sarandi (*Phyllanthus emblica*), pimentas (*Capsicum* spp.), cerejeira (*Eugenia involucrata*), chá de java (*Orthosiphon stamineus*), dentre outros (de Oliveira et al., 2019; Makky et al., 2022; Oliveira et al., 2017; Santana et al., 2021; Santos et al., 2020; Toledo et al., 2021; Valková et al., 2021).

Assim, foram escolhidos para o presente estudo o gengibre (*Zingiber officinale*) e a quilaia (*Quillaja saponaria*) devido às suas propriedades benéficas.

2.2.1 Gengibre

Zingiber officinale (gengibre) é uma erva perene da família Zingiberaceae nativa do Sudeste Asiático que inclui mais de 45 gêneros e 800 espécies (Ahmed et al., 2022; Ozkur et al., 2022; Tarfaoui et al., 2022; Talebi et al., 2021). O gengibre é cultivado de forma ampla em aproximadamente 50 países, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, tendo como principais produtores a Índia, China e Nigéria sendo aplicado como especiaria e agente aditivo de sabor em alimentos e bebidas, tempero e adoçante na culinária local, além de aplicado como fitoterápico (Ahmed et al., 2022; Ozkur et al., 2022; Talebi et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Os rizomas tuberosos e espessos são as partes comestíveis do gengibre, uma das ervas medicinais mais consumidas no mundo, e diversos estudos confirmaram suas propriedades farmacológicas, principalmente atividades gastroprotetoras, imunomoduladoras, antialérgicas e hepatoprotetoras associadas à sua composição de bioativos que varia de acordo com o local de cultivo e técnicas de secagem, apresentando, em geral, rizoma composto por óleos essenciais em pequenas quantidades, oleorresinas, sais minerais, açúcares, mucilagem, gomas, ácidos orgânicos e amido (40-60% do peso seco) (Arcusa et al., 2022; Lima et al., 2018; Liu, Liu, Zhang, 2019; Talebi et al., 2021; Wang et al., 2017).

A espécie é frequentemente mencionada nas literaturas clássicas budista, árabe, grega e romana, sendo ainda utilizada na medicina tradicional chinesa, ayurvédica e nos sistemas de tratamento Unani-Tibb para tratar diversos problemas de saúde (dispepsia, desconfortos abdominais, vômito, diarreia constipação, náusea, catarro, diabetes, doenças nervosas, gengivite, dor de dente, dor de garganta, febre, entorses, dores musculares, artrites, reumatismos, doenças infecciosas, helmintíase e acidente vascular cerebral) (Lima et al., 2018; Talebi et al., 2021). Na medicina ocidental o gengibre é usado para aliviar problemas digestivos, mas também é conhecido por melhorar o pulso fraco e fortalecer o corpo após a perda de sangue,

além de sua atividade antioxidante ter sido reportada em diversos estudos (Talebi et al., 2021).

2.2.2 Quilaia

Quillaja saponaria Molina é uma espécie comumente encontrada no Peru, Chile e Bolívia, sendo descrita pela primeira vez em 1782 devido à sua casca apresentar alto teor de saponina, grupo de substâncias que apresenta diversas aplicações, tendo sido historicamente usado como detergente, mas com crescente interesse em sua aplicação como emulsificante natural e que tem sido amplamente estudado devido ao seu forte potencial imunoadjuvante (capazes de estimular respostas imunes celulares e humorais ampliando o espectro de alvos vacinais) (Fleck et al., 2019; Magedans et al., 2019).

Saponinas são moléculas de natureza anfipática derivadas do metabolismo especializado da planta, sendo as cascas e madeiras de *Q. saponaria* suas principais fontes de saponinas (Magedans et al., 2019). Os extratos de saponina de *Q. saponaria* são comercializados e produzidos por diferentes marcas (com composição variável de acordo com processo de obtenção) para utilização em alimentos, bebidas, cosméticos, fotografia, na indústria farmacêutica e como adjuvantes em formulações de vacinas (Fleck et al., 2019; Magedans et al., 2019).

Extratos derivados de *Q. saponaria* têm atraído grande interesse de pesquisa e a espécie foi incluída nas Farmacopeias europeia e brasileira por suas propriedades biológicas, sendo matéria-prima recomendada como antitussígeno e expectorante, anti-inflamatório, hipocolesterolêmico e hemolítico, sendo também indicados topicamente para tratar doenças do couro cabeludo (caspa e queda de cabelo) e outras doenças dermatológicas (Fleck et al., 2019; Tippel et al., 2016). Além disso, o banco de dados da Comissão Europeia de Ingredientes Cosméticos (CosIng) listou alguns produtos de *Q. saponaria* como ingredientes cosméticos, como casca, extrato de casca, extrato de raiz e extrato de madeira (Fleck et al., 2019).

Já foi demonstrada ação antimicrobiana de *Q. saponaria* contra *Piscirickettsia salmonis* (Cañon-Jones et al., 2020), ação de sua saponina contra *Salmonella* spp.

(Dev et al., 2020) e atividade antifúngica de membranas de nanofibras de celulose regeneradas suplementadas com saponinas (Fleck et al., 2019).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos extratos glicólicos *Zingiber officinale* (gengibre) e *Quillaja saponaria* (quilaia) isolados e em associação sobre 7 cepas clínicas e uma cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* em forma planctônica e biofilmes monotípicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar, *in vitro*, os efeitos antimicrobianos dos extratos de *Zingiber officinale* (gengibre) e *Quillaja saponaria* (quilaia) isolados e combinados sobre forma planctônica de cepa padrão (ATCC 15442) e 7 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à antibióticos.
- b) Avaliar, *in vitro*, os efeitos antibiofilmes dos extratos de *Zingiber officinale* (gengibre) e *Quillaja saponaria* (quilaia) isolados e combinados sobre a formação de biofilme monotípico de cepa padrão (ATCC 15442) e 7 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à antibióticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extratos e associação

Foram selecionados para a pesquisa os extratos glicólicos de gengibre - *Zingiber officinale* (Lote: 016797/23484, concentração de 200 mg/mL) e quilaia - *Quillaja saponaria* (Lote: 1475/23280, concentração de 200 mg/mL) obtidos da empresa Distriol (São Paulo, SP). Os extratos foram testados de maneira isolada e em associação dupla.

4.2 Cepas bacterianas

As cepas clínicas de *P. aeruginosa* foram fornecidas Bioclin do grupo Policlin de São José dos Campos – SP (Brasil) (Quadro 1). Todas as cepas clínicas foram fornecidas com seu perfil de resistência a antibióticos previamente identificado pelo laboratório responsável.

Testou-se também a ação dos extratos na cepa de referência (*P. aeruginosa* ATCC 15442) fornecida pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT - Unesp de São José dos Campos).

4.3 Ação antimicrobiana dos extratos isolados sob forma planctônica de *P. aeruginosa*

A atividade antibacteriana para a forma planctônica das bactérias foi avaliada com o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, norma M07-A9 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012), em que foram adicionados 100 µL de meio de cultura *Mueller Hinton* (HiMedia®, Mumbai,

Índia) em microplacas de 96 poços e 100 µL de cada extrato no primeiro poço da microplaca, de onde partiram 10 diluições seriadas (Figura 1 e 2A). O inóculo bacteriano para todos os microrganismos padronizado em 10^6 UFC/mL de solução salina (0,9% NaCl) estéril com espectrofotômetro foi adicionado (100 µL/poço), ficando em contato com as diluições de extrato em incubação por 24 h a 37 °C. Foi determinada Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos isolados considerando-se a presença ou ausência de turvação nos poços em que determinou-se a CIM como a menor concentração sem crescimento bacteriano visível de cada extrato. O teste foi realizado em triplicata em três momentos diferentes.

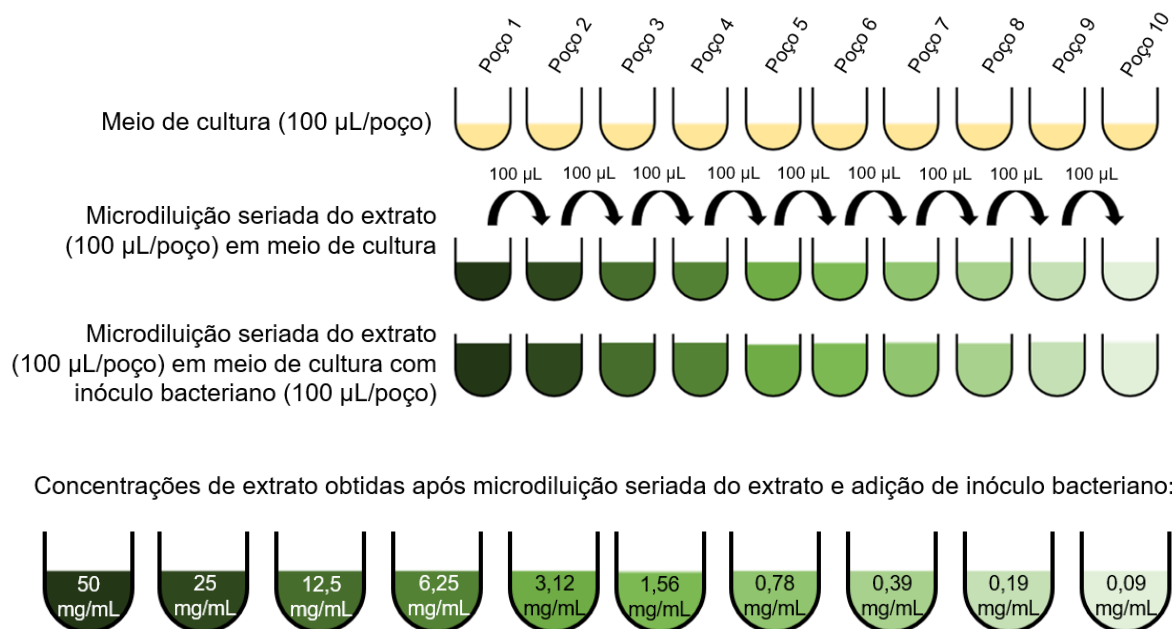
Quadro 1 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa* fornecidas pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin

Categoria de Antimicrobiano	Antimicrobiano	Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
		P1	P2	P3	P4*	P5*	P6	P7*
Aminoglicosídeos	Amicacina	S	S	S	R	S	S	S
Monobactam	Aztreonam	-	-	-	-	R	-	-
Cefalosporinas antipseudomonas	Cefepima	I	I	I	R	R	I	R
	Ceftazidima	I	I	I	R	R	I	R
Carbapenêmicos antipseudomonas	Imipenem	I	I	I	R		I	R
	Meropenem	S	S	S	R	R	S	R
Fluoroquinolonas antipseudomonas	Levofloxacina	I	R	I	R		I	R
	Ciprofloxacina	I	R	I	R	R	I	R
Penicilinas antipseudomonas + inibidores de beta-lactamases	Piperaciclina - Tazobactam	I	I	I	R	R	I	R

Legenda: S: sensível ao antimicrobiano; R: resistente ao antimicrobiano; I: Intermediário ao antimicrobiano; -: Teste não desenvolvido; *: cepa classificada como multidroga resistente (MDR).

Fonte: Bioclin do grupo Policlin (São José dos Campos – SP) e Magiorakos et al., 2012.

Figura 1 - Representação da microdiluição seriada a partir dos extratos puros (200 mg/mL) em meio de cultura (caldo *Mueller Hinton*) para determinação de CIM

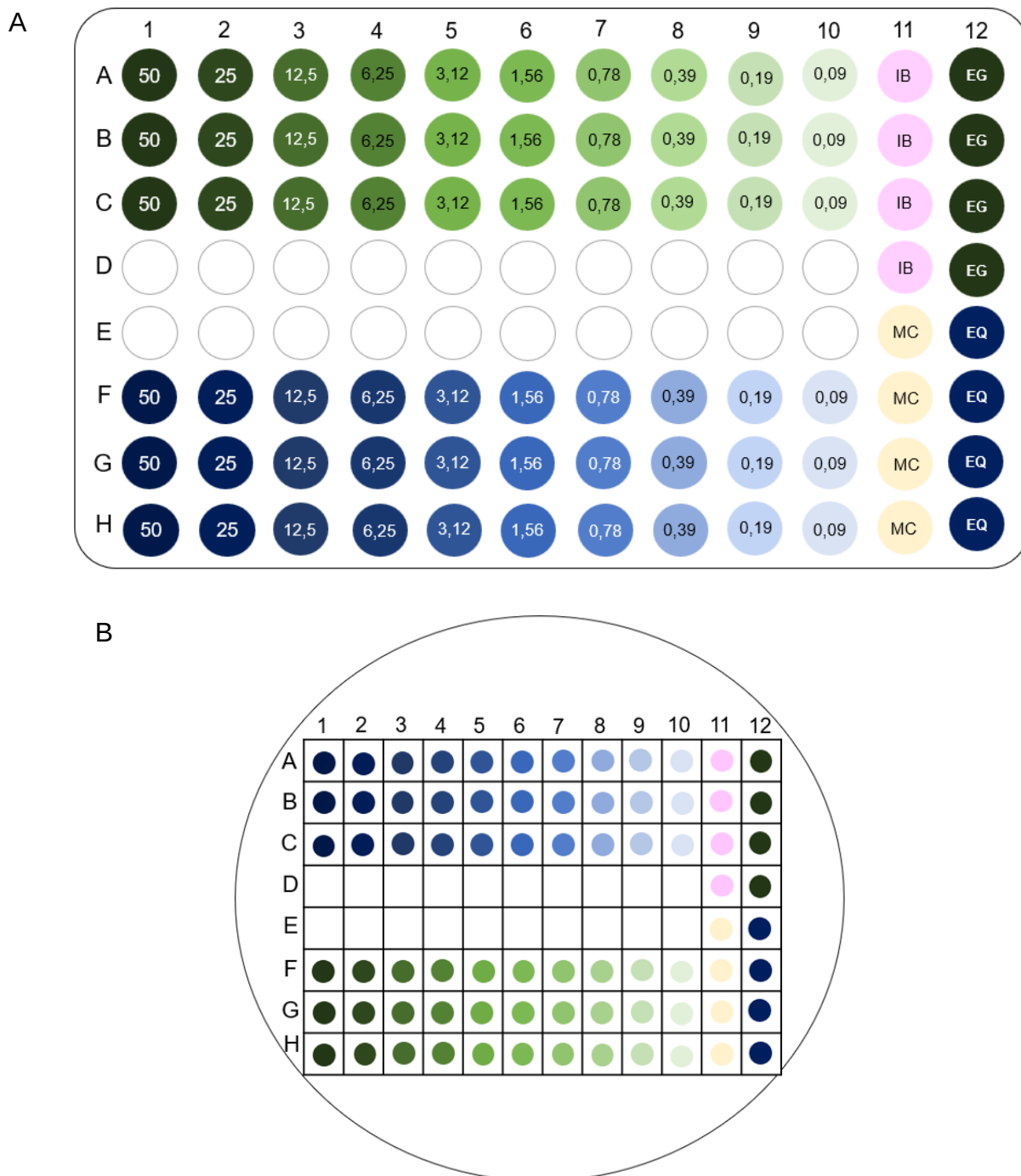


Fonte: Elaborado pela autora.

A Concentração Microbicida Mínima (CMM) foi determinada a partir de alíquotas dos conteúdos provenientes da microdiluição seriada (previamente utilizada para determinação da CIM) (Figura 2A) que foram semeados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) em que, a partir da presença ou ausência de crescimento de colônias, foi determinada como CMM a menor concentração sem crescimento bacteriano após 48 h de incubação (37 °C) (Figura 2B). O teste foi realizado em triplicata em três momentos diferentes.

Em todos os testes foram desenvolvidos controles de esterilidade dos extratos e meios de cultura e controles de crescimento bacteriano dos inóculos.

Figura 2 – Representação de microplaca de diluição preparada para determinação de CIM (A) e de placa de Petri com semeadura para determinação da CMM (B)



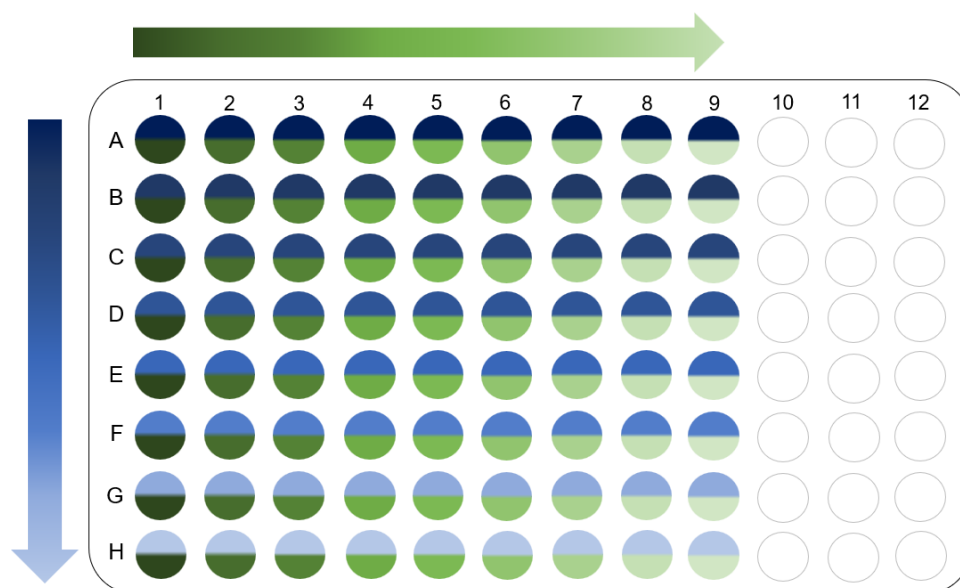
Legenda: As colunas 1 a 10 da microplaca constituem as diluições seriadas de extratos (A, B e C: diluições de extrato de gengibre; F, G e H: diluições de extrato de quilaia). IB: inóculo bacteriano com meio de cultura (controle de crescimento); MC: meio de cultura (caldo *Mueller Hinton*) como controle de esterilidade; EG: extrato de gengibre (200 mg/mL) como controle de esterilidade; EQ: extrato de quilaia (200 mg/mL) como controle de esterilidade.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Ação antimicrobiana dos extratos associados sob forma planctônica de *P. aeruginosa* – Teste *checkerboard*

Para avaliar o efeito dos extratos associados foi utilizada a técnica *checkerboard* de acordo com Fratini et al. (2017), Odds (2003) e Ušjak et al. (2019) com adaptações. As combinações dos extratos diluídos em caldo *Mueller Hinton* foram adicionadas a microplacas de 96 poços de forma que 50 µL de cada diluição do extrato de gengibre foi adicionada de forma decrescente no sentido horizontal (colunas 1 a 9) da microplaca enquanto 50 µL de cada diluição do extrato de quilaia foi adicionada de maneira decrescente em sentido vertical (linhas A a H), de modo a obter todas as combinações possíveis entre concentrações dos extratos previamente preparadas (Figura 3). O inóculo microbiano (100 µL/poço) padronizado a 10^6 UFC/mL foi adicionado aos poços preparados com as combinações dos extratos totalizando volume de 200 µL/poço e as placas foram levadas à estufa por 24 h a 37 °C. O teste foi realizado em triplicata em três momentos diferentes.

Figura 3 – Representação da preparação do teste *checkerboard* na microplaca

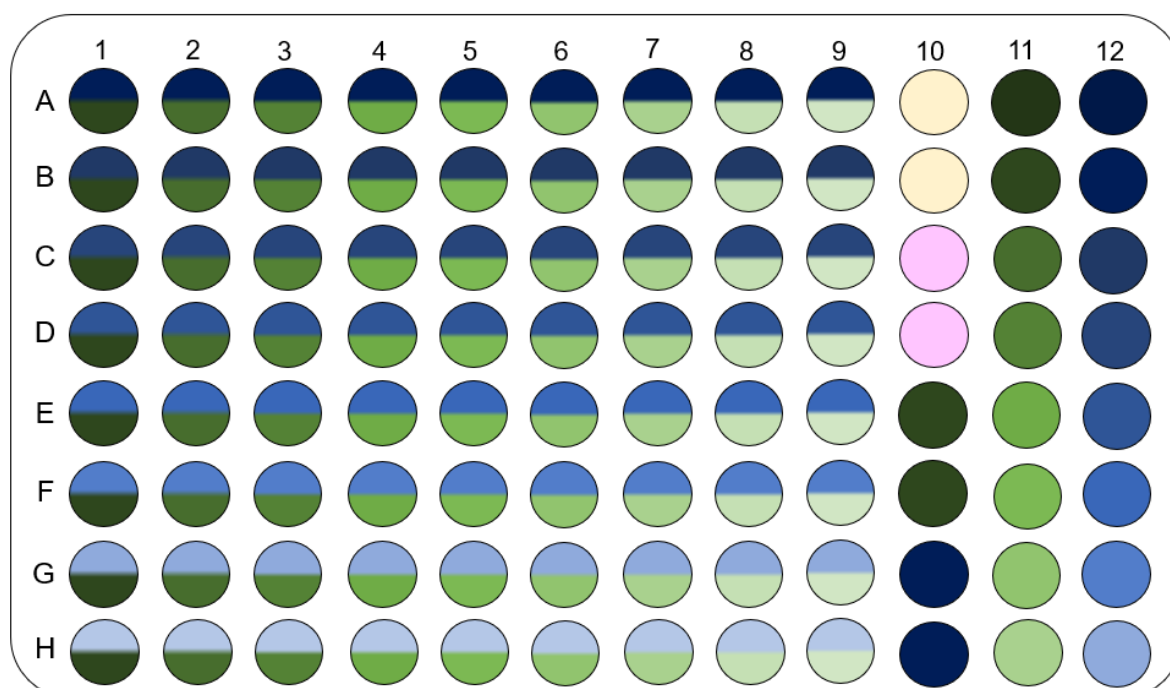


Legenda: A seta e a variação de cores representam o sentido das diluições dos extratos. Tons de verde representam concentrações decrescentes do extrato de gengibre. Tons de azul representam concentrações decrescentes do extrato de quilaia.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em todos os testes foram desenvolvidos controles de esterilidade dos extratos e do meio de cultura, assim como controles de crescimento bacteriano e repetição dos testes de CIM (Figura 4).

Figura 4 – Representação da preparação do teste *checkerboard* e grupos controle na microplaca de diluição



Legenda: As colunas 1 a 9 constituem representações de combinações de diluições dos extratos. Tons de verde representam concentrações decrescentes do extrato de gengibre. Tons de azul representam concentrações decrescentes do extrato de quilaia. Poços amarelos (10A e 10B) representam meio de cultura (caldo *Mueller Hinton*) como controle de esterilidade; Poços em rosa (10C e 10D) representam inóculo bacteriano com meio de cultura (controle de crescimento); Poços verdes (10E e 10F) representam extrato de gengibre (200 mg/mL) como controle de esterilidade; Poços verdes (10G e 10H) representam extrato de quilaia (200 mg/mL) como controle de esterilidade. Colunas 11 e 12 representam, respectivamente, a repetição dos testes de Concentração Inibitória Mínima dos extratos de gengibre e quilaia.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) de cada extrato foram definidos como a relação entre o seu valor de CIM na associação e CIM do extrato isolado (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh et al., 2019; Orhan et al., 2005 com adaptações). Os valores de CIF dos extratos foram somados para obtenção do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh

et al., 2019; Orhan et al., 2005 com adaptações) (Figura 5), de acordo com as fórmulas a seguir:

CIF Extrato 1 = CIM Extrato 1 Associado ao Extrato 2 / CIM Extrato 1 Isolado

CIF Extrato 2 = CIM Extrato 2 Associado ao Extrato 1 / CIM Extrato 2 Isolado

ICIF = CIF Extrato 1 + CIF Extrato 2

O valor obtido em cada ICIF foi interpretado da seguinte maneira: ação sinérgica quando $ICIF \leq 0,5$; aditiva quando $ICIF$ é $> 0,5$ e $< 1,0$; indiferente quando $ICIF \geq 1$ e < 4 e antagonista quando $ICIF \geq 4,0$ (Lewis et al., 2002).

Figura 5 – Esquematização do cálculo para determinação de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) para a associação de extratos de gengibre e quilaia

$$\begin{aligned}
 \text{Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)} &= \left(\frac{\text{Concentração Inibitória Fracionada (CIF) do Extrato de Gengibre}}{\text{Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato de Gengibre Isolado}} \right) + \left(\frac{\text{Concentração Inibitória Fracionada (CIF) do Extrato de Quilaia}}{\text{Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato de Quilaia Isolado}} \right)
 \end{aligned}$$

Fonte: Elaborado pela autora.

Foi determinado também o Índice de Concentração Microbica Fracionada (ICMF) adaptado a partir das metodologias de Fratini et al. (2017), Odds (2003) e Ušjak et al. (2019), em que alíquotas dos conteúdos do teste *checkerboard* foram semeados em ágar BHI e incubados por 48 h para observar a ação microbica das

combinações de extrato e calcular o ICMF seguindo os cálculos para o ICIF (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh et al., 2019; Orhan et al., 2005), substituindo os dados de ação inibitória por dados de ação microbica: determinou-se a Concentração Microbica Fracionada (CMF) de cada extrato como a relação entre o seu valor de CMM na associação e seu valor de CMM isolado (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh et al., 2019; Orhan et al., 2005 com adaptações) e os valores de CMF de cada extrato foram somados para obter Índice de Concentração Microbica Fracionada (ICMF) (Figura 6) (Cha et al., 2007; Namivandi-Zangeneh et al., 2019; Orhan et al., 2005 com adaptações) conforme as fórmulas a seguir:

CMF Extrato 1 = CMM Extrato 1 Associado ao Extrato 2 / CMM Extrato 1 Isolado

CMF Extrato 2 = CMM Extrato 2 Associado ao Extrato 1 / CMM Extrato 2 Isolado

ICMF = CMF Extrato 1 + CMF Extrato 2

Figura 6 – Esquematização do cálculo para determinação de Índice de Concentração Microbica Fracionada (ICMF) para a associação de extratos de gengibre e quilaia

$$\begin{array}{c}
 \text{Índice de} \\
 \text{Concentração} \\
 \text{Microbica} \\
 \text{Fracionada (ICMF)} \\
 = \\
 \left(\frac{\text{Concentração Microbica Fracionada (CMF) do Extrato de Gengibre}}{\text{Concentração Microbica Mínima (CMM) do Extrato de Gengibre Isolado}} \right) + \left(\frac{\text{Concentração Microbica Fracionada (CMF) do Extrato de Quilaia}}{\text{Concentração Microbica Mínima (CMM) do Extrato de Quilaia Isolado}} \right)
 \end{array}$$

Fonte: Elaborado pela autora.

O ICMF foi interpretado da seguinte maneira: ação sinérgica quando ICBF $\leq 0,5$; aditiva quando ICBF é $> 0,5$ e $< 1,0$; indiferente quando ICBF ≥ 1 e < 4 e antagonista quando ICBF $\geq 4,0$ (Lewis et al., 2002 com adaptações).

4.5 Atividade antimicrobiana dos extratos isolados e associados sobre biofilmes monotípicos de *P. aeruginosa*

Para avaliar a ação dos extratos sobre a formação de biofilmes monotípicos foram selecionadas, a partir de testes prévios e de testes piloto, duas concentrações do extrato de gengibre, duas concentrações de extrato de quilaia e duas associações de ambos os extratos (diluídos em caldo BHI) (Quadro 2, Figura 7). O controle positivo foi feito com solução de clorexidina (0,06%, diluída em caldo BHI) e o controle negativo (crescimento bacteriano) com caldo BHI (Quadro 2, Figura 7). Todos os grupos foram feitos com 12 repetições ($n = 12$).

Os testes foram preparados em microplacas de 96 poços com os tratamentos (Quadro 2, Figura 7) para verificar a capacidade de inibição na formação do biofilme: em cada poço foram adicionados 100 μ L do tratamento diluído em meio de cultura (caldo BHI) e 100 μ L de suspensão microbiana padronizada em espectrofotômetro (comprimento de onda 625 nm) com 10^7 células/mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). As microplacas foram incubadas em estufa (37 °C) por 24 h e o sobrenadante foi trocado. Nova incubação foi desenvolvida nas mesmas condições por mais 24 h, para totalizar período de 48 h de formação do biofilme.

Após o período de formação do biofilme, foi feita a remoção do sobrenadante e duas lavagens dos poços com caldo BHI. Em seguida, foi realizado o teste de viabilidade celular da bactéria, por meio da análise da atividade metabólica, para verificar o efeito antimicrobiano dos tratamentos. Assim, foram adicionados 100 μ L da solução de MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (~98%, Sigma Aldrich Co.®, Alemanha) em cada poço tratado e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1 h e, após, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 μ L de álcool absoluto em cada poço. Uma nova incubação ao abrigo da luz foi feita durante 10 min em *shaker* e 10 min em estufa a 37 °C para revelar a coloração que demonstra a presença de microrganismos viáveis após o contato com os tratamentos. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nanômetros e as densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em redução de viabilidade celular (forma percentual) por meio da fórmula:

% de Redução de Viabilidade = 100 - (DO Poço Tratado x 100 / Média de DO Grupo Controle Negativo)

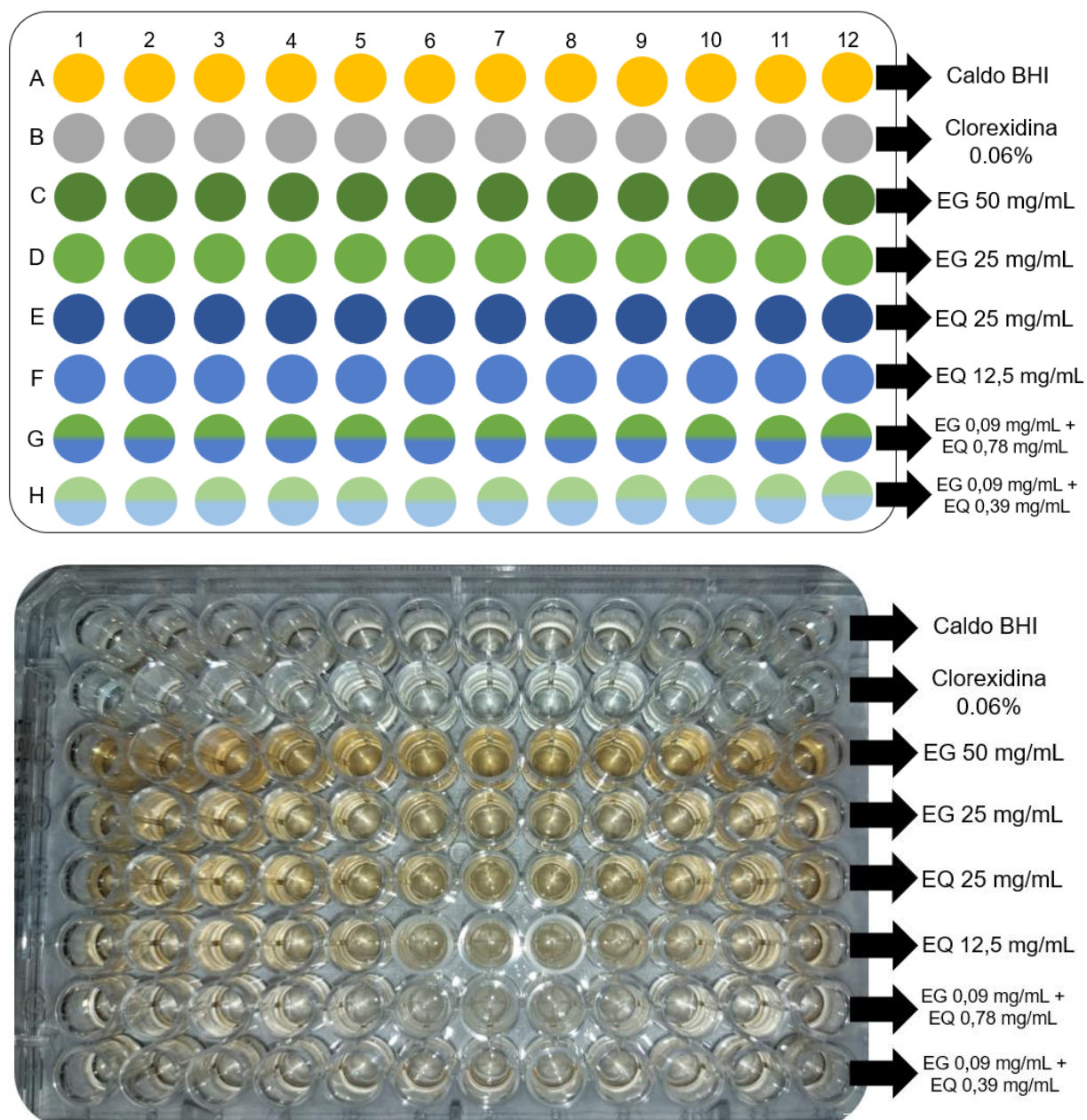
Quadro 2 – Grupos de tratamento para os testes em biofilmes monotípicos das cepas de *P. aeruginosa*

Grupos	Tratamentos	
Controle Negativo	Meio de Cultura BHI	
Controle Positivo	Solução de Clorexidina 0,06%	
Grupo 1	Extrato de Gengibre	50 mg/mL
Grupo 2		25 mg/mL
Grupo 3	Extrato de Quilaia	25 mg/mL
Grupo 4		12,5 mg/mL
Grupo 5: Associação 1	Extrato de Gengibre 0,09 mg/mL + Extrato de Quilaia 0,78 mg/mL	
Grupo 6: Associação 2	Extrato de Gengibre 0,09 mg/mL + Extrato de Quilaia 0,39 mg/mL	

Legenda: BHI: *Brain Heart Infusion*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7 – Esquematização e fotografia de microplaca com grupos de tratamento para desenvolvimento de testes em biofilmes monotípicos das cepas de *P. aeruginosa*



Legenda: BHI caldo *Brain Heart Infusion*; EG: extrato de gengibre; EQ: extrato de quilaia.
 Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.1 Análise estatística

Os dados de densidade óptica obtidos a partir das leituras dos testes de MTT em espectrofotômetro (570 nm) foram analisados estatisticamente por meio do *software Graphpad prism 5.0*.

Os dados referentes ao teste com a cepa P2 apresentaram normalidade e foram avaliados por método ANOVA com teste de *Tukey*. Para as demais cepas (padrão, P1, P3, P4, P5, P6 e P7) foi utilizado método *Kruskall-Wallis* complementado com o Teste de Comparação Múltipla de *Dunn* visto que não houve normalidade nos dados. A significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADO

5.1 Ação antimicrobiana dos extratos isolados sob a forma planctônica de *P. aeruginosa*

Os resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) de ambos os extratos glicólicos (gingibre e quilaia) para a forma planctônica das cepas de *P. aeruginosa* estão demonstrados na Tabela 1 e representados nas Figuras 8, 9 e 10.

Tabela 1 – CIM e CMM determinadas para cepas ATCC 15442 e clínicas de *P. aeruginosa*

Cepas de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Extrato de Gengibre (mg/mL)		Extrato de Quilaia (mg/mL)	
	CIM	CMM	CIM	CMM
ATCC 15442	3,12	6,25	3,12	6,25
P1	3,12	6,25	1,56	3,12
P2	6,25	6,25	1,56	3,12
P3	6,25	6,25	3,12	3,12
P4	6,25	6,25	3,12	3,12
P5	6,25	6,25	3,12	3,12
P6	6,25	6,25	1,56	6,25
P7	3,12	6,25	1,56	1,56

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CMM: Concentração Microbicida Mínima.
Fonte: Elaborado pela autora.

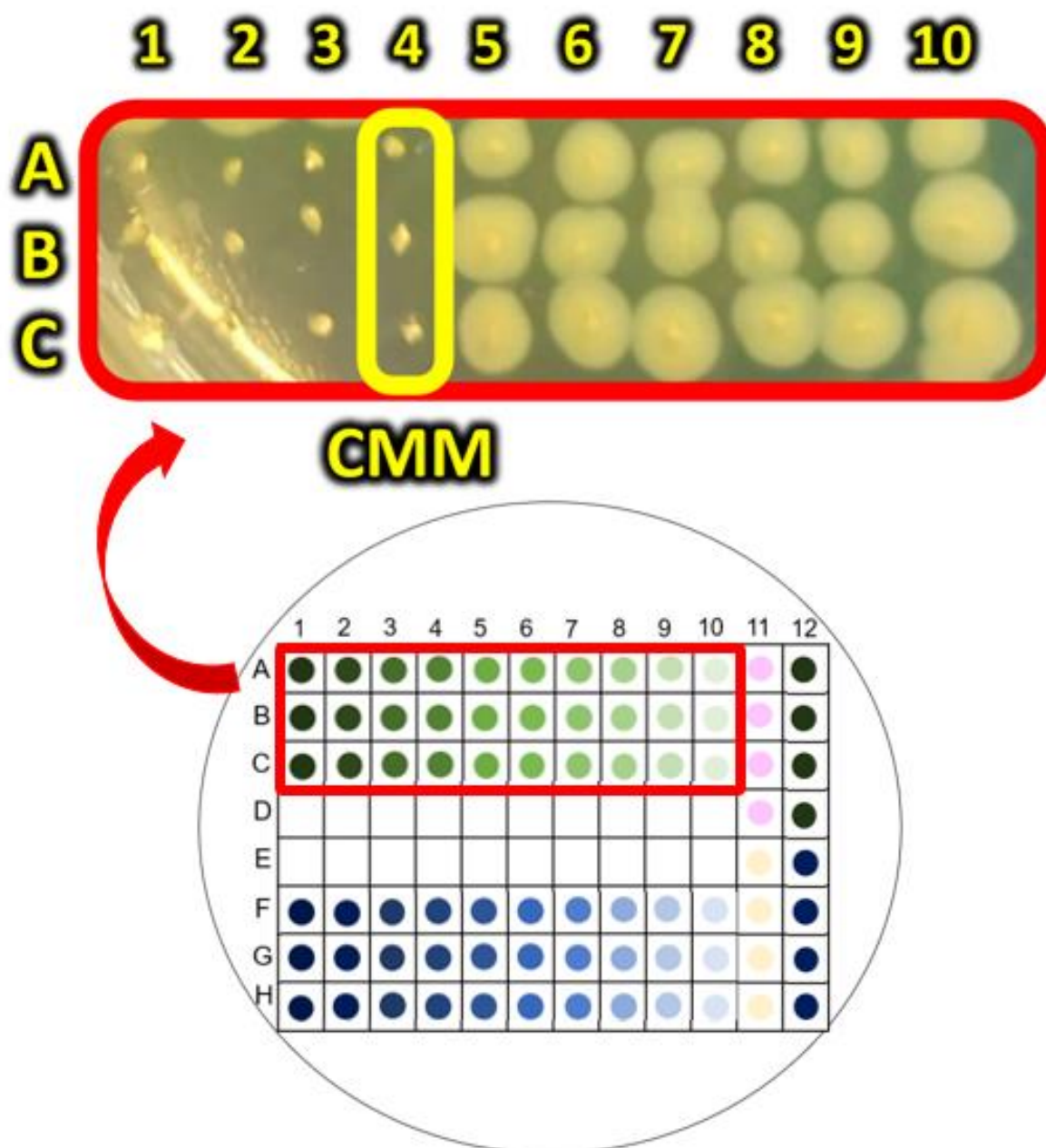
Figura 8 – Demonstração da metodologia aplicada para determinação da CIM a partir do teste de microdiluição em caldo



Legenda: As colunas 1 a 10 da microplaca constituem as diluições seriadas de extratos (A, B e C: diluições de extrato de gengibre; F, G e H: diluições de extrato de quilaia). IB: inóculo bacteriano com meio de cultura (controle de crescimento); MC: meio de cultura (caldo *Mueller Hinton*) como controle de esterilidade; EG: extrato de gengibre (200 mg/mL) como controle de esterilidade; EQ: extrato de quilaia (200 mg/mL) como controle de esterilidade. CIM: Concentração Inibitória Mínima. Em amarelo destaca-se a visualização da ação inibitória mínima nos testes.

Fonte: Elaborado pela autora.

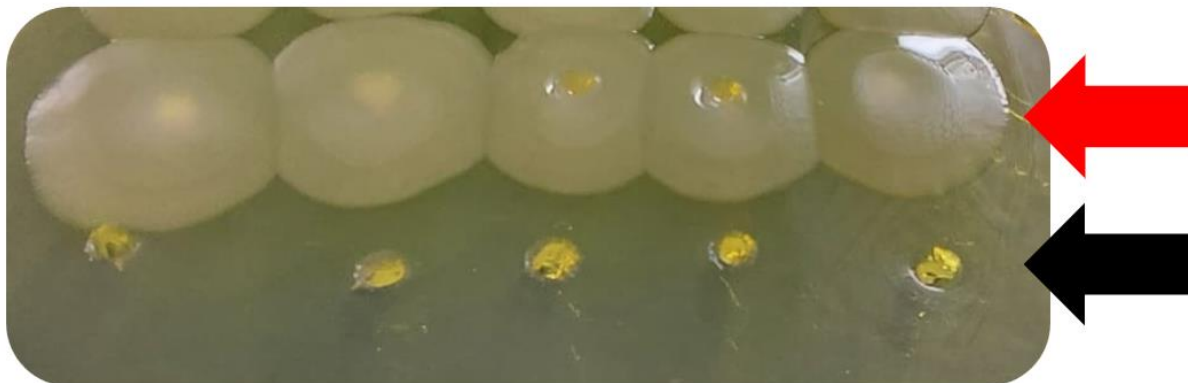
Figura 9 – Demonstração da metodologia aplicada para determinação da CMM a partir de sementeira de conteúdo do teste de microdiluição em caldo



Legenda: As colunas 1 a 10 da microplaca constituem as diluições seriadas de extratos (A, B e C: diluições de extrato de gengibre; F, G e H: diluições de extrato de quilaia). CMM: Concentração Inibitória Mínima. CMM: concentração Microbicida Mínima. Em amarelo destaca-se a visualização da ação microbicida mínima nos testes.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10 – Demonstração em detalhe da determinação da CMM a partir de semeadura de conteúdo do teste de microdiluição em caldo



Legenda: Fotografia demonstrando detalhe de teste para determinação da CMM. A seta vermelha indica sequência de semeadura com crescimento bacteriano (ausência de ação microbicida) e a seta preta indica sequência de semeadura sem crescimento bacteriano (ação microbicida).

Fonte: Elaborado pela autora.

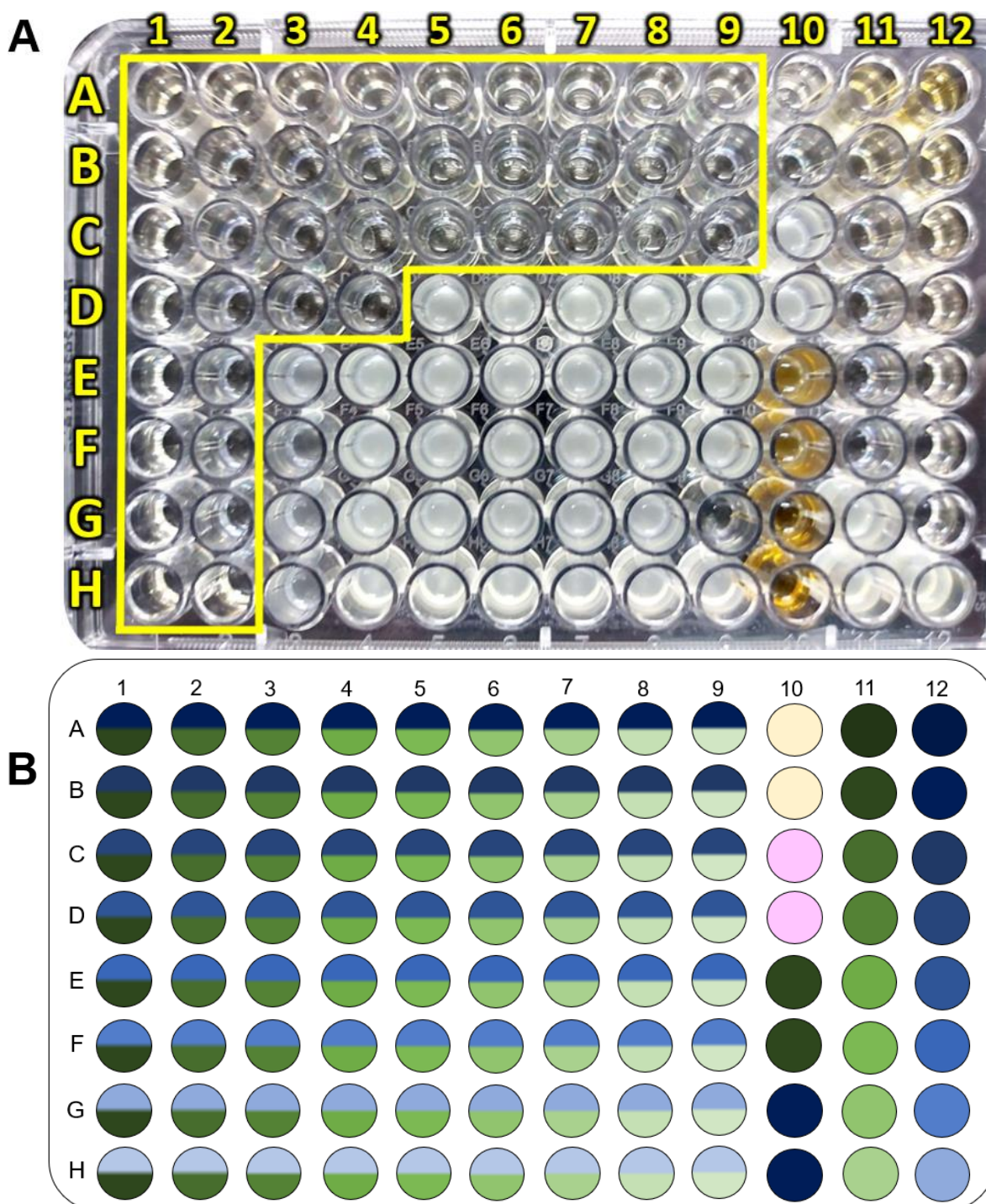
5.2 Ação antimicrobiana dos extratos associados sob forma planctônica de *P. aeruginosa* – Teste *checkerboard*

Os resultados dos testes *checkerboard*, em que foram testadas as ações inibitórias de diferentes associações entre os extratos de gengibre e quilaia sob a forma planctônica das cepas de *P. aeruginosa* estão demonstrados nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e a metodologia aplicada pode ser observada na Figura 11.

A partir dos resultados de ICIF foi possível identificar 15 associações com efeito sinérgico, 4 associações com efeito aditivo e 8 associações com efeito indiferente contra a cepa padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) (Tabela 2).

Nos testes para cepas clínicas não foi identificado efeito sinérgico das associações dos extratos, no entanto, foi identificado efeito aditivo de 5 associações contra a cepa P2 (Tabela 4), 2 contra P3 (Tabela 5), 6 contra P4 (Tabela 6), 1 contra P5 (Tabela 7) e 1 contra P7 (Tabela 9). Foram observadas também 19 associações indiferentes contra P1 e contra P2 (Tabelas 3 e 4), 24 contra P3 (Tabela 5), 25 contra P4 (Tabela 6), 27 contra P5 (Tabela 7), 18 contra P6 (Tabela 8) e 20 contra P7 (Tabela 9). Quanto às combinações antagônicas foi identificada 1 associação com este efeito sobre as cepas P1, P5 e P7 (Tabelas 3, 7 e 9) e 10 contra P6.

Figura 11 – Demonstração do teste *checkerboard* na microplaca de diluição



Legenda: As colunas 1 a 9 constituem as combinações de diluições dos extratos (A e B). Tons de verde representam concentrações decrescentes do extrato de gengibre e tons de azul representam concentrações decrescentes do extrato de quilaia (B). A coluna 10 constitui os controles de crescimento bacteriano e de esterilidade de meio de cultura (caldo *Mueller Hinton*) e dos extratos (A e B). As colunas 11 e 12 representam as repetições dos testes para determinação de Concentração Inibitória Mínima dos extratos de gengibre e quilaia, respectivamente (A e B). Em amarelo (A) destaca-se a visualização da ação inibitória nos testes.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa ATCC 15442 de *P. aeruginosa*

Cepa ATCC 15442							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
3,12	3,12	3,12	0,78	1	0,25	1,25	I
3,12	3,12	3,12	0,39	1	0,125	1,125	I
3,12	3,12	3,12	0,19	1	0,060897436	1,060897	I
3,12	3,12	3,12	0,09	1	0,028846154	1,028846	I
3,12	3,12	3,12	0,045	1	0,014423077	1,014423	I
3,12	3,12	3,12	0,022	1	0,007051282	1,007051	I
3,12	3,12	3,12	0,011	1	0,003525641	1,003526	I
3,12	3,12	3,12	0,0056	1	0,001794872	1,001795	I
3,12	3,12	1,56	0,78	0,5	0,25	0,75	A
3,12	3,12	1,56	0,39	0,5	0,125	0,625	A
3,12	3,12	1,56	0,19	0,5	0,060897436	0,560897	A
3,12	3,12	1,56	0,09	0,5	0,028846154	0,528846	A
3,12	3,12	0,78	0,78	0,25	0,25	0,5	S
3,12	3,12	0,78	0,39	0,25	0,125	0,375	S
3,12	3,12	0,78	0,19	0,25	0,060897436	0,310897	S
3,12	3,12	0,39	0,78	0,125	0,25	0,375	S
3,12	3,12	0,39	0,39	0,125	0,125	0,25	S
3,12	3,12	0,19	0,78	0,060897436	0,25	0,310897	S
3,12	3,12	0,19	0,39	0,060897436	0,125	0,185897	S
3,12	3,12	0,09	0,78	0,028846154	0,25	0,278846	S
3,12	3,12	0,09	0,39	0,028846154	0,125	0,153846	S
3,12	3,12	0,045	0,78	0,014423077	0,25	0,264423	S
3,12	3,12	0,045	0,39	0,014423077	0,125	0,139423	S
3,12	3,12	0,022	0,78	0,007051282	0,25	0,257051	S
3,12	3,12	0,022	0,39	0,007051282	0,125	0,132051	S
3,12	3,12	0,011	0,78	0,003525641	0,25	0,253526	S
3,12	3,12	0,011	0,39	0,003525641	0,125	0,128526	S

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo, S: Sinérgico.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P1 de *P. aeruginosa*

Cepa P1							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
3,12	1,56	6,25	3,12	2,00	2	4,00	AN
3,12	1,56	6,25	1,56	2,00	1	3,00	I
3,12	1,56	6,25	0,78	2,00	0,5	2,50	I
3,12	1,56	6,25	0,39	2,00	0,25	2,25	I
3,12	1,56	6,25	0,19	2,00	0,121794872	2,13	I
3,12	1,56	6,25	0,09	2,00	0,057692308	2,06	I
3,12	1,56	6,25	0,045	2,00	0,028846154	2,03	I
3,12	1,56	6,25	0,022	2,00	0,014102564	2,02	I
3,12	1,56	3,12	3,12	1,00	2	3,00	I
3,12	1,56	3,12	1,56	1,00	1	2,00	I
3,12	1,56	3,12	0,78	1,00	0,5	1,50	I
3,12	1,56	1,56	3,12	0,50	2	2,50	I
3,12	1,56	1,56	1,56	0,50	1	1,50	I
3,12	1,56	0,78	3,12	0,25	2	2,25	I
3,12	1,56	0,78	1,56	0,25	1	1,25	I
3,12	1,56	0,39	3,12	0,13	2	2,13	I
3,12	1,56	0,19	3,12	0,06	2	2,06	I
3,12	1,56	0,09	3,12	0,03	2	2,03	I
3,12	1,56	0,045	3,12	0,01	2	2,01	I
3,12	1,56	0,022	3,12	0,01	2	2,01	I

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, AN: Antagonista, I: Indiferente.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P2 de *P. aeruginosa*

Cepa P2							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	1,56	6,25	3,12	1,00	2	3,00	I
6,25	1,56	6,25	1,56	1,00	1	2,00	I
6,25	1,56	6,25	0,78	1,00	0,5	1,50	I
6,25	1,56	6,25	0,39	1,00	0,25	1,25	I
6,25	1,56	6,25	0,19	1,00	0,121794872	1,12	I
6,25	1,56	6,25	0,09	1,00	0,057692308	1,06	I
6,25	1,56	6,25	0,045	1,00	0,028846154	1,03	I
6,25	1,56	6,25	0,022	1,00	0,014102564	1,01	I
6,25	1,56	3,12	3,12	0,50	2	2,50	I
6,25	1,56	3,12	1,56	0,50	1	1,50	I
6,25	1,56	3,12	0,78	0,50	0,5	1,00	I
6,25	1,56	3,12	0,39	0,50	0,25	0,75	A
6,25	1,56	3,12	0,19	0,50	0,121794872	0,62	A
6,25	1,56	3,12	0,09	0,50	0,057692308	0,56	A
6,25	1,56	3,12	0,045	0,50	0,028846154	0,53	A
6,25	1,56	3,12	0,022	0,50	0,014102564	0,51	A
6,25	1,56	1,56	3,12	0,25	2	2,25	I
6,25	1,56	1,56	1,56	0,25	1	1,25	I
6,25	1,56	0,78	3,12	0,12	2	2,12	I
6,25	1,56	0,39	3,12	0,06	2	2,06	I
6,25	1,56	0,19	3,12	0,03	2	2,03	I
6,25	1,56	0,09	3,12	0,01	2	2,01	I
6,25	1,56	0,045	3,12	0,01	2	2,01	I
6,25	1,56	0,022	3,12	0,00	2	2,00	I

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P3 de *P. aeruginosa*

Cepa P3							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	12,5	3,12	2,00	1	3,00	I
6,25	3,12	12,5	1,56	2,00	0,5	2,50	I
6,25	3,12	12,5	0,78	2,00	0,25	2,25	I
6,25	3,12	12,5	0,39	2,00	0,125	2,13	I
6,25	3,12	12,5	0,19	2,00	0,060897436	2,06	I
6,25	3,12	12,5	0,09	2,00	0,028846154	2,03	I
6,25	3,12	12,5	0,045	2,00	0,014423077	2,01	I
6,25	3,12	12,5	0,022	2,00	0,007051282	2,01	I
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897436	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,028846154	1,03	I
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423077	1,01	I
6,25	3,12	6,25	0,022	1,00	0,007051282	1,01	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	1,56	1,56	0,25	0,5	0,75	A
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,39	3,12	0,06	1	1,06	I
6,25	3,12	0,19	3,12	0,03	1	1,03	I
6,25	3,12	0,09	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,045	3,12	0,01	1	1,0072	I

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P4 de *P. aeruginosa*

Cepa P4							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	6,25	6,25	1,00	2,003205128	3,00	I
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897436	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,028846154	1,03	I
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423077	1,01	I
6,25	3,12	3,12	6,25	0,50	2,003205128	2,50	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	3,12	0,39	0,50	0,125	0,62	A
6,25	3,12	3,12	0,19	0,50	0,060897436	0,56	A
6,25	3,12	3,12	0,09	0,50	0,028846154	0,53	A
6,25	3,12	3,12	0,045	0,50	0,014423077	0,51	A
6,25	3,12	1,56	6,25	0,25	2,003205128	2,25	I
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	1,56	1,56	0,25	0,5	0,75	A
6,25	3,12	0,78	6,25	0,12	2,003205128	2,13	I
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,39	6,25	0,06	2,003205128	2,07	I
6,25	3,12	0,39	3,12	0,06	1	1,06	I
6,25	3,12	0,19	6,25	0,03	2,003205128	2,03	I
6,25	3,12	0,19	3,12	0,03	1	1,03	I
6,25	3,12	0,09	6,25	0,01	2,003205128	2,02	I
6,25	3,12	0,09	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,045	6,25	0,01	2,003205128	2,01	I
6,25	3,12	0,045	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,022	6,25	0,00	2,003205128	2,01	I
6,25	3,12	0,022	3,12	0,00	1	1,00	I

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P5 de *P. aeruginosa*

Cepa P5							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	12,5	6,25	2,00	2,003205128	4,00	AN
6,25	3,12	12,5	3,12	2,00	1	3,00	I
6,25	3,12	12,5	1,56	2,00	0,5	2,50	I
6,25	3,12	12,5	0,78	2,00	0,25	2,25	I
6,25	3,12	12,5	0,39	2,00	0,125	2,13	I
6,25	3,12	12,5	0,19	2,00	0,028846154	2,03	I
6,25	3,12	12,5	0,09	2,00	0,014423077	2,01	I
6,25	3,12	12,5	0,045	2,00	0,014423077	2,01	I
6,25	3,12	6,25	6,25	1,00	2,003205128	3,00	I
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897436	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,060897436	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423077	1,01	I
6,25	3,12	3,12	6,25	0,50	2,003205128	2,50	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	1,56	6,25	0,25	2,003205128	2,25	I
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	0,78	6,25	0,12	2,003205128	2,13	I
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,39	6,25	0,06	2,003205128	2,07	I
6,25	3,12	0,39	3,12	0,06	1	1,06	I
6,25	3,12	0,19	6,25	0,03	2,003205128	2,03	I
6,25	3,12	0,09	6,25	0,01	2,003205128	2,02	I
6,25	3,12	0,045	6,25	0,01	2,003205128	2,01	I

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, AN: Antagonista I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P6 de *P. aeruginosa*

Cepa P6							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	1,56	12,5	6,25	2,00	4,006410256	6,01	AN
6,25	1,56	12,5	3,12	2,00	2	4,00	AN
6,25	1,56	12,5	1,56	2,00	1	3,00	I
6,25	1,56	12,5	0,78	2,00	0,5	2,50	I
6,25	1,56	12,5	0,39	2,00	0,25	2,25	I
6,25	1,56	12,5	0,19	2,00	0,121794872	2,12	I
6,25	1,56	12,5	0,09	2,00	0,121794872	2,12	I
6,25	1,56	12,5	0,045	2,00	0,028846154	2,03	I
6,25	1,56	6,25	6,25	1,00	4,006410256	5,01	AN
6,25	1,56	6,25	3,12	1,00	2	3,00	I
6,25	1,56	6,25	1,56	1,00	1	2,00	I
6,25	1,56	6,25	0,78	1,00	0,5	1,50	I
6,25	1,56	6,25	0,39	1,00	0,25	1,25	I
6,25	1,56	6,25	0,19	1,00	0,121794872	1,12	I
6,25	1,56	6,25	0,09	1,00	0,121794872	1,12	I
6,25	1,56	6,25	0,045	1,00	0,028846154	1,03	I
6,25	1,56	3,12	6,25	0,50	4,006410256	4,51	AN
6,25	1,56	3,12	3,12	0,50	2	2,50	I
6,25	1,56	3,12	1,56	0,50	1	1,50	I
6,25	1,56	1,56	6,25	0,25	4,006410256	4,26	AN
6,25	1,56	1,56	3,12	0,25	2	2,25	I
6,25	1,56	0,78	6,25	0,12	4,006410256	4,13	AN
6,25	1,56	0,78	3,12	0,12	2	2,12	I
6,25	1,56	0,39	6,25	0,06	4,006410256	4,07	AN
6,25	1,56	0,39	3,12	0,06	2	2,06	I
6,25	1,56	0,19	6,25	0,03	4,006410256	4,04	AN
6,25	1,56	0,09	6,25	0,01	4,006410256	4,02	AN
6,25	1,56	0,045	6,25	0,01	4,006410256	4,01	AN

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, AN: Antagonista.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9 – Efeito inibitório de associação de extratos sobre cepa clínica P7 de *P. aeruginosa*

Cepa P7							
CIM (mg/mL)				CIF Gengibre	CIF Quilaia	ICIF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
3,12	1,56	6,25	3,12	2,00	2	4,00	AN
3,12	1,56	6,25	1,56	2,00	1	3,00	I
3,12	1,56	6,25	0,78	2,00	0,5	2,50	I
3,12	1,56	6,25	0,39	2,00	0,25	2,25	I
3,12	1,56	6,25	0,19	2,00	0,121794872	2,13	I
3,12	1,56	6,25	0,09	2,00	0,057692308	2,06	I
3,12	1,56	6,25	0,045	2,00	0,028846154	2,03	I
3,12	1,56	6,25	0,022	2,00	0,014102564	2,02	I
3,12	1,56	3,12	3,12	1,00	2	3,00	I
3,12	1,56	3,12	1,56	1,00	1	2,00	I
3,12	1,56	3,12	0,78	1,00	0,5	1,50	I
3,12	1,56	3,12	0,39	1,00	0,25	1,25	I
3,12	1,56	3,12	0,19	1,00	0,121794872	1,12	I
3,12	1,56	3,12	0,09	1,00	0,121794872	1,12	I
3,12	1,56	1,56	3,12	0,50	0,057692308	0,56	A
3,12	1,56	1,56	1,56	0,50	2	2,50	I
3,12	1,56	0,78	3,12	0,25	2	2,25	I
3,12	1,56	0,039	3,12	0,01	2	2,01	I
3,12	1,56	0,19	3,12	0,06	2	2,06	I
3,12	1,56	0,09	3,12	0,03	2	2,03	I
3,12	1,56	0,045	3,12	0,01	2	2,01	I
3,12	1,56	0,022	3,12	0,01	2	2,01	I

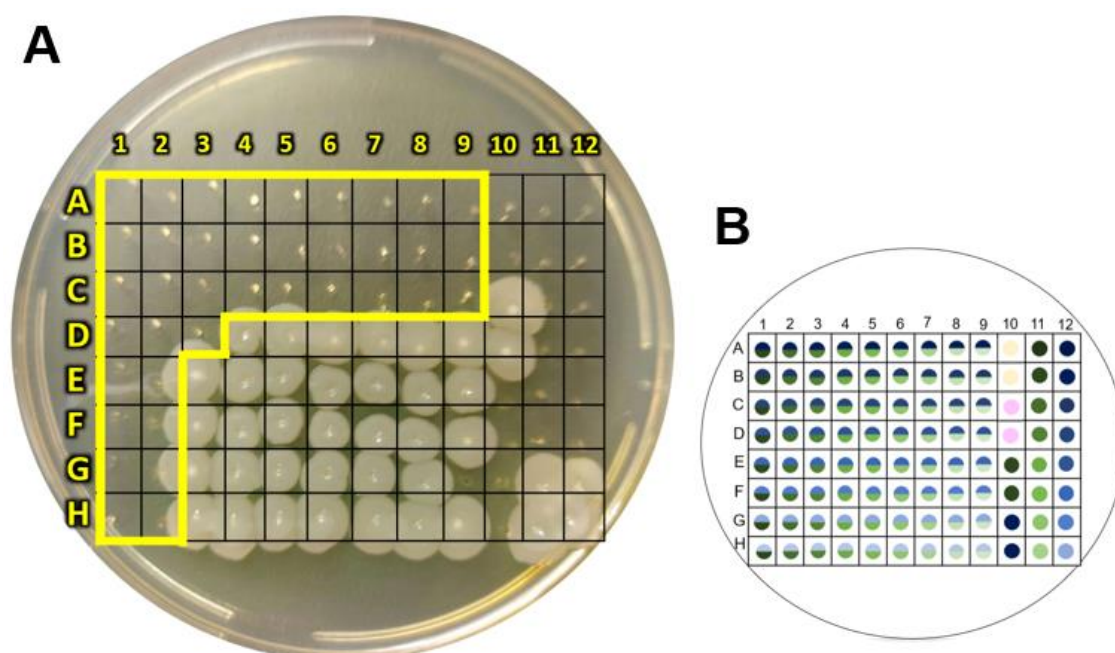
Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima, CIF: Concentração Inibitória Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, AN: Antagonista I: Indiferente, A: Aditivo.
 Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados de ação microbicida dos testes *checkerboard* estão demonstrados nas Tabelas 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 e a metodologia aplicada pode ser observada na Figura 12.

A partir dos resultados de ICMF foi possível identificar 6 associações com efeito sinérgico, 1 associação com efeito aditivo e uma associação com efeito indiferente contra a cepa padrão (Tabela 10).

Assim como nos resultados de ICIF, não foi identificado efeito sinérgico das associações dos extratos sob as cepas clínicas a partir dos dados de ICMF. Foi identificado efeito aditivo de 1 associação contra a cepa P1 (Tabela 11), contra P2 (Tabela 12) e contra a cepa P3 (Tabela 13), e de 5 associações contra a cepa P4 (Tabela 14). Foram identificadas 13 associações com efeito indiferente sobre as cepas P1 e P2 (Tabelas 11 e 12), 23 associações indiferentes para P3 e P5 (Tabelas 13 e 15), 25 para P4 (Tabela 14), 14 para P6 (Tabela 16) e 10 para P7 (Tabela 17). Contra a cepa P5 foi observada também uma combinação antagonista (Tabela 15).

Figura 12 – Demonstração da semeadura para determinação de Índice de Concentração Microbicida Fracionada a partir do teste *checkerboard*



Legenda: Observação de ausência ou presença de crescimento de colônias a partir do teste *checkerboard* (A) de forma correspondente ao conteúdo da microplaca de diluição (B e Figura 10.B). Em amarelo (A) destaca-se a visualização da ação microbicida nos testes.
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10 – Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa ATCC 15442 de *P. aeruginosa*

Cepa ATCC 15442							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
3,12	3,12	3,12	0,78	1	0,25	1,25	I
3,12	3,12	1,56	0,78	0,5	0,25	0,75	A
3,12	3,12	0,78	0,78	0,25	0,25	0,5	S
3,12	3,12	0,39	0,78	0,125	0,25	0,375	S
3,12	3,12	0,19	0,78	0,060897	0,25	0,310897	S
3,12	3,12	0,09	0,78	0,028846	0,25	0,278846	S
3,12	3,12	0,045	0,78	0,014423	0,25	0,264423	S
3,12	3,12	0,022	0,78	0,007051	0,25	0,257051	S

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo, S: Sinérgico.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 11 – Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P1 de *P. aeruginosa*

Cepa P1							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,028846	1,03	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,09	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,045	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,022	3,12	0,00	1	1,00	I

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 12 - Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P2 de *P. aeruginosa*

Cepa P2							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,028846	1,03	I
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423	1,01	I
6,25	3,12	6,25	0,022	1,00	0,007051	1,01	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,39	3,12	0,06	1	1,06	I

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 13 - Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P3 de *P. aeruginosa*

Cepa P3							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	12,5	3,12	2,00	1	3,00	I
6,25	3,12	12,5	1,56	2,00	0,5	2,50	I
6,25	3,12	12,5	0,78	2,00	0,25	2,25	I
6,25	3,12	12,5	0,39	2,00	0,125	2,13	I
6,25	3,12	12,5	0,19	2,00	0,060897	2,06	I
6,25	3,12	12,5	0,09	2,00	0,028846	2,03	I
6,25	3,12	12,5	0,045	2,00	0,014423	2,01	I
6,25	3,12	12,5	0,022	2,00	0,007051	2,01	I
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,028846	1,03	I
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423	1,01	I
6,25	3,12	6,25	0,022	1,00	0,007051	1,01	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,39	3,12	0,06	1	1,06	I
6,25	3,12	0,19	3,12	0,03	1	1,03	I
6,25	3,12	0,09	3,12	0,01	1	1,01	I

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 14 – Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P4 de *P. aeruginosa*

Cepa P4							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	6,25	6,25	1,00	2,003205	3,00	I
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	I
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	I
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	I
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	I
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897	1,06	I
6,25	3,12	6,25	0,09	1,00	0,028846	1,03	I
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423	1,01	I
6,25	3,12	3,12	6,25	0,50	2,003205	2,50	I
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	I
6,25	3,12	3,12	1,56	0,50	0,5	1,00	I
6,25	3,12	3,12	0,78	0,50	0,25	0,75	A
6,25	3,12	3,12	0,39	0,50	0,125	0,62	A
6,25	3,12	3,12	0,19	0,50	0,060897	0,56	A
6,25	3,12	3,12	0,09	0,50	0,028846	0,53	A
6,25	3,12	3,12	0,045	0,50	0,014423	0,51	A
6,25	3,12	1,56	6,25	0,25	2,003205	2,25	I
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	I
6,25	3,12	0,78	6,25	0,12	2,003205	2,13	I
6,25	3,12	0,78	3,12	0,12	1	1,12	I
6,25	3,12	0,39	6,25	0,06	2,003205	2,07	I
6,25	3,12	0,39	3,12	0,06	1	1,06	I
6,25	3,12	0,19	6,25	0,03	2,003205	2,03	I
6,25	3,12	0,19	3,12	0,03	1	1,03	I
6,25	3,12	0,09	6,25	0,01	2,003205	2,02	I
6,25	3,12	0,09	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,045	6,25	0,01	2,003205	2,01	I
6,25	3,12	0,045	3,12	0,01	1	1,01	I
6,25	3,12	0,022	6,25	0,00	2,003205	2,01	I
6,25	3,12	0,022	3,12	0,00	1	1,00	I

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente, A: Aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 15 – Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P5 de *P. aeruginosa*

Cepa P5							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	3,12	12,5	6,25	2,00	2,003205	4,00	AN
6,25	3,12	12,5	3,12	2,00	1	3,00	
6,25	3,12	12,5	1,56	2,00	0,5	2,50	
6,25	3,12	12,5	0,78	2,00	0,25	2,25	
6,25	3,12	12,5	0,39	2,00	0,125	2,13	
6,25	3,12	12,5	0,19	2,00	0,028846	2,03	
6,25	3,12	12,5	0,09	2,00	0,014423	2,01	
6,25	3,12	12,5	0,045	2,00	0,014423	2,01	
6,25	3,12	6,25	6,25	1,00	2,003205	3,00	
6,25	3,12	6,25	3,12	1,00	1	2,00	
6,25	3,12	6,25	1,56	1,00	0,5	1,50	
6,25	3,12	6,25	0,78	1,00	0,25	1,25	
6,25	3,12	6,25	0,39	1,00	0,125	1,13	
6,25	3,12	6,25	0,19	1,00	0,060897	1,06	
6,25	3,12	6,25	0,045	1,00	0,014423	1,01	
6,25	3,12	3,12	6,25	0,50	2,003205	2,50	
6,25	3,12	3,12	3,12	0,50	1	1,50	
6,25	3,12	1,56	6,25	0,25	2,003205	2,25	
6,25	3,12	1,56	3,12	0,25	1	1,25	
6,25	3,12	0,78	6,25	0,12	2,003205	2,13	
6,25	3,12	0,39	6,25	0,06	2,003205	2,07	
6,25	3,12	0,19	6,25	0,03	2,003205	2,03	
6,25	3,12	0,09	6,25	0,01	2,003205	2,02	
6,25	3,12	0,045	6,25	0,01	2,003205	2,01	

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, AN: Antagonista, I: Indiferente.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 16 - Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P6 de *P. aeruginosa*

Cepa P6							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	6,25	12,5	6,25	2,00	1	3,00	I
6,25	6,25	12,5	3,12	2,00	0,4992	2,50	I
6,25	6,25	12,5	0,78	2,00	0,1248	2,12	I
6,25	6,25	12,5	0,39	2,00	0,0624	2,06	I
6,25	6,25	12,5	0,19	2,00	0,0304	2,03	I
6,25	6,25	12,5	0,09	2,00	0,0304	2,03	I
6,25	6,25	12,5	0,045	2,00	0,0072	2,01	I
6,25	6,25	6,25	6,25	1,00	1	2,00	I
6,25	6,25	6,25	3,12	1,00	0,4992	1,50	I
6,25	6,25	3,12	6,25	0,50	1	1,50	I
6,25	6,25	0,78	6,25	0,12	1	1,12	I
6,25	6,25	0,19	6,25	0,03	1	1,03	I
6,25	6,25	0,09	6,25	0,01	1	1,01	I
6,25	6,25	0,045	6,25	0,01	1	1,01	I

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMF: Concentração Microbicida Fracionada, ICMF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 17 - Efeito microbicida de associação de extratos sobre cepa clínica P7 de *P. aeruginosa*

Cepa P7							
CMM (mg/mL)				CMF Gengibre	CMF Quilaia	ICMF	Efeito
Isolado		Em Associação					
EG	EQ	EG	EQ				
6,25	1,56	6,25	3,12	1,00	2	3,00	I
6,25	1,56	6,25	1,56	1,00	1	2,00	I
6,25	1,56	6,25	0,78	1,00	0,5	1,50	I
6,25	1,56	6,25	0,39	1,00	0,25	1,25	I
6,25	1,56	6,25	0,19	1,00	0,121795	1,12	I
6,25	1,56	6,25	0,09	1,00	0,057692	1,06	I
6,25	1,56	6,25	0,045	1,00	0,028846	1,03	I
6,25	1,56	6,25	0,022	1,00	0,014103	1,01	I
6,25	1,56	3,12	3,12	0,50	2	2,50	I
6,25	1,56	3,12	1,56	0,50	1	1,50	I

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima, CMM: Concentração Microbicida Mínima, CIF: Concentração Microbicida Fracionada, ICIF: Índice de Concentração Microbicida Fracionada, EG: Extrato de Gengibre, EQ: Extrato de Quilaia, I: Indiferente.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Atividade antimicrobiana dos extratos isolados e associados sobre biofilmes monotípicos de *P. aeruginosa*

A partir dos testes realizados em biofilmes foi possível observar que em todos os testes com cepas clínicas e com a cepa padrão houve maior redução de viabilidade a partir dos tratamentos com extratos isolados do que com a clorexidina ($p < 0.0001$). Nos testes de todas as cepas foi possível observar pelo menos um tratamento com extrato isolado que reduziu de forma estatisticamente significativa a viabilidade dos biofilmes monotípicos em comparação ao grupo controle ($p < 0.0001$). Contra a cepa ATCC 15442 apenas o extrato de quilaia (25 e 12,5 mg/mL) e a clorexidina promoveram redução significativa do biofilme (Tabela 18 e Figura 14) ($p < 0.0001$).

Tabela 18 – Redução de viabilidade em biofilmes de *P. aeruginosa* após crescimento em contato com tratamentos

Redução de Viabilidade Celular (%)								
Tratamento	Cepa							
	ATCC 15442	P1	P2	P3	P4*	P5*	P6	P7*
Clorexidina 0,06%	47,7	38,3	6,4	42,6	22,7	44,6	71	37
EG 50 mg/mL	36,7	59,8	60,5	73,6	49	72,2	71,8	43,4
EG 25 mg/mL	34	60,2	52,4	72,1	54,3	68,2	61,1	49,5
EQ 25 mg/mL	51,3	65	55,8	79,6	36,8	69,3	67,9	49,9
EQ 12,5 mg/mL	51,4	59,5	54,6	60	41,8	75,9	72	53,6
EG 0,09 mg/mL + EQ 0,78 mg/mL	-	35	10,4	9,4	-	-	24,7	10,1
EG 0,09 mg/mL + EQ 0,39 mg/mL	-	-	-	-	-	-	14,8	8,7

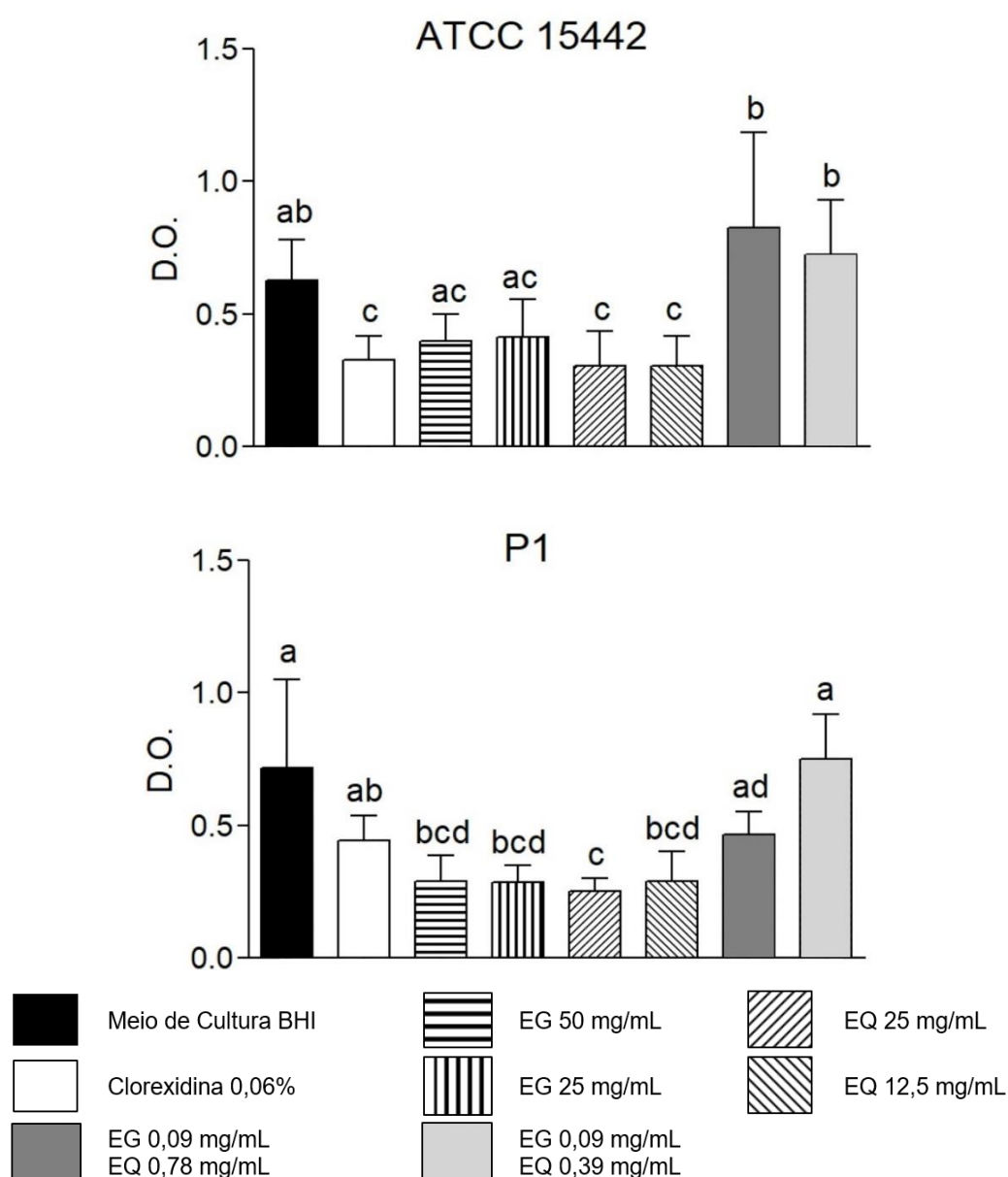
Legenda: Médias de redução de viabilidade apresentadas pelos biofilmes monotípicos de cepa ATCC 15442 e cepas clínicas de *P. aeruginosa* após crescimento do biofilme em contato com tratamentos. *: cepa classificada como multidroga resistente (MDR). EG: Extrato de Gengibre; EQ: Extrato de Quilaia. Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto às cepas clínicas, houve ação significativa na inibição do biofilme pela clorexidina contra apenas uma das cepas (P6) em comparação ao controle de crescimento (Figura 16) ($p < 0.0001$). Contra as cepas P1 (Figura 13), P2, P3 (Figura 14), P4, P5 (Figura 15) e P7 (Figura 16) apenas os extratos isolados promoveram significativa redução na formação do biofilme, enquanto os tratamentos de extratos combinados não promoveram redução, sendo importante ressaltar que dentre essas cepas estão as multirresistentes ($p < 0.0001$). O extrato de quilaia (25 mg/mL) reduziu de forma significativa a formação do biofilme das cepas P1 e P3 (Figuras 13 e 14) em comparação à clorexidina ($p < 0.0001$).

Ambos os extratos nas duas concentrações testadas (50 e 25 mg/mL de EG e 25 e 12,5 mg/mL de EQ) promoveram redução significativa no crescimento do biofilme da cepa P2 (Figura 14) em comparação com o efeito da clorexidina que não

apresentou redução estatisticamente significativa em comparação ao controle de crescimento, assim como comparada aos tratamentos com extratos em associação ($p < 0.0001$).

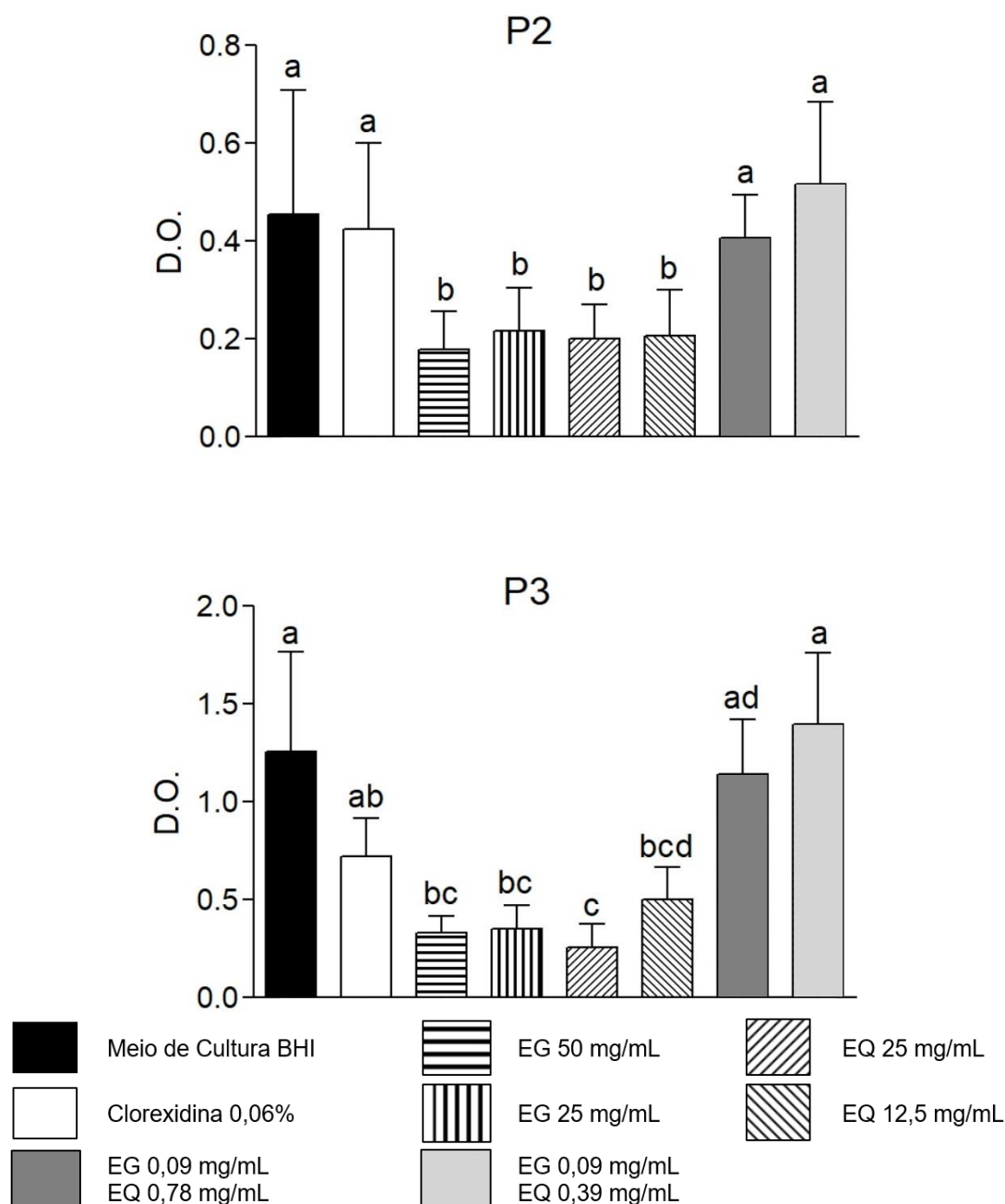
Figura 13 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após crescimento de biofilmes de *P. aeruginosa* (cepas ATCC 15442 e P1) em contato com diferentes tratamentos



Legenda: Os dados não apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método *Kruskal-Wallis* complementado com Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*; $p < 0.0001$. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. EG: extrato de gengibre. EQ: extrato de quilaia. D.O.: densidade óptica.

Fonte: Elaborado pela autora.

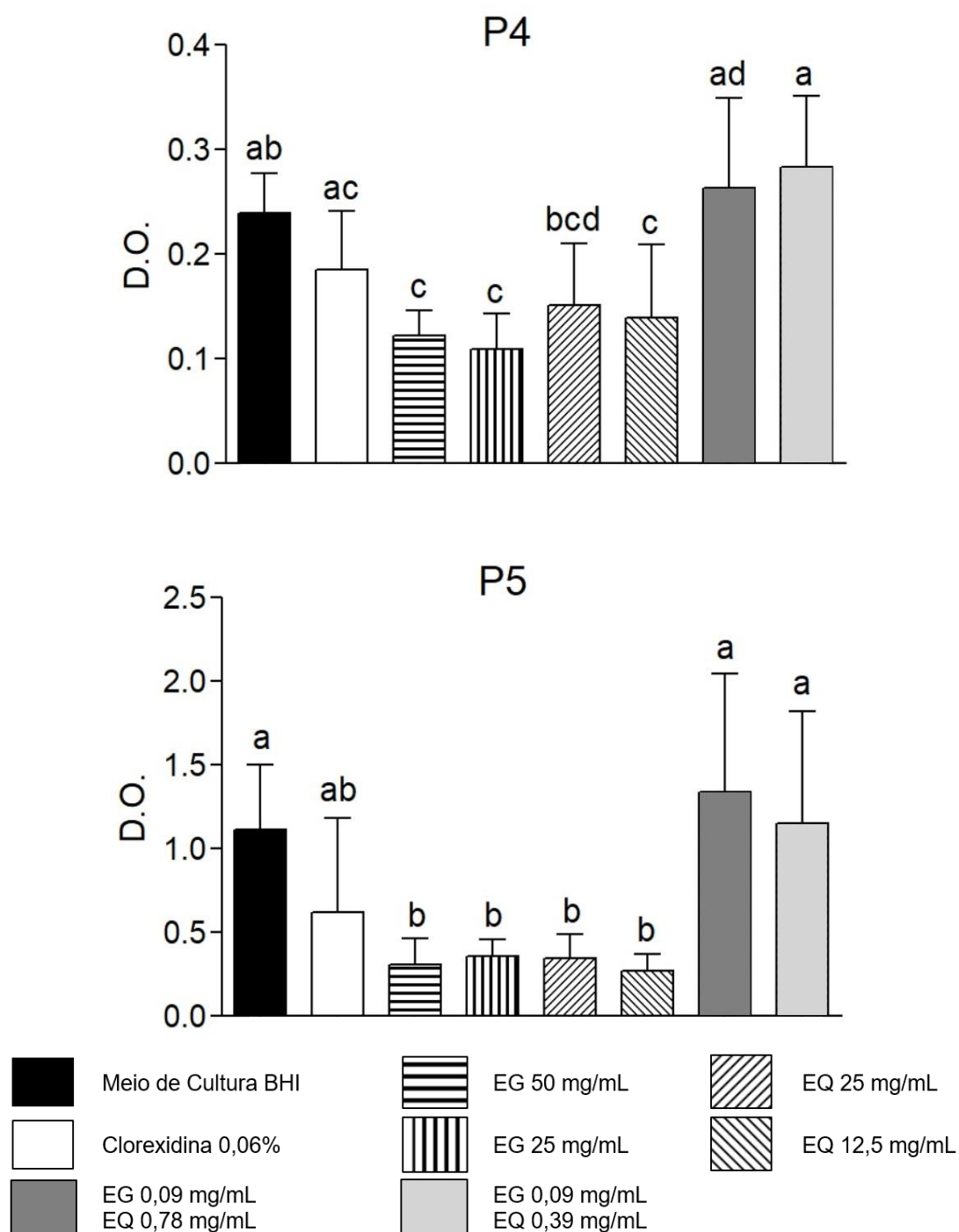
Figura 14 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após crescimento de biofilmes de *P. aeruginosa* (cepas P2 e P3) em contato com diferentes tratamentos



Legenda: Os dados apresentaram distribuição normal para a cepa P2 e foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey; $p < 0.0001$. Não foi observada distribuição normal para cepa P3 que foi analisada pelo método *Kruskal-Wallis* complementado com Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*; $p < 0.0001$. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. EG: extrato de gengibre. EQ: extrato de quilaia. D.O.: densidade óptica.

Fonte: Elaborado pela autora.

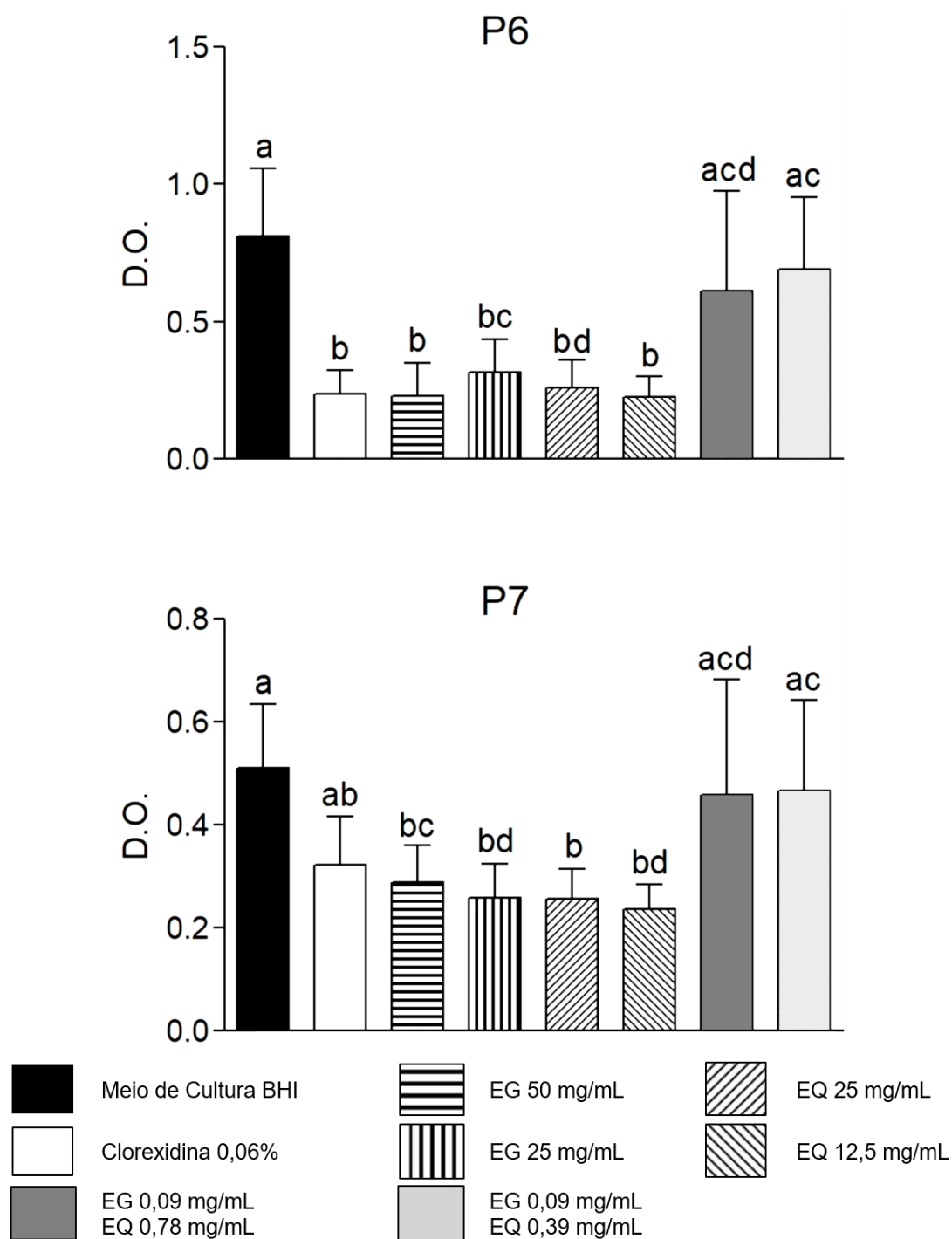
Figura 15 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após crescimento de biofilmes de *P. aeruginosa* (cepas P4 e P5) em contato com diferentes tratamentos



Legenda: Os dados não apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método *Kruskal-Wallis* complementado com Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*; $p < 0.0001$. As letras "a" e "b" demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. EG: extrato de gengibre. EQ: extrato de quilaia. D.O.: densidade óptica.

Fonte: Elaborado pela autora.

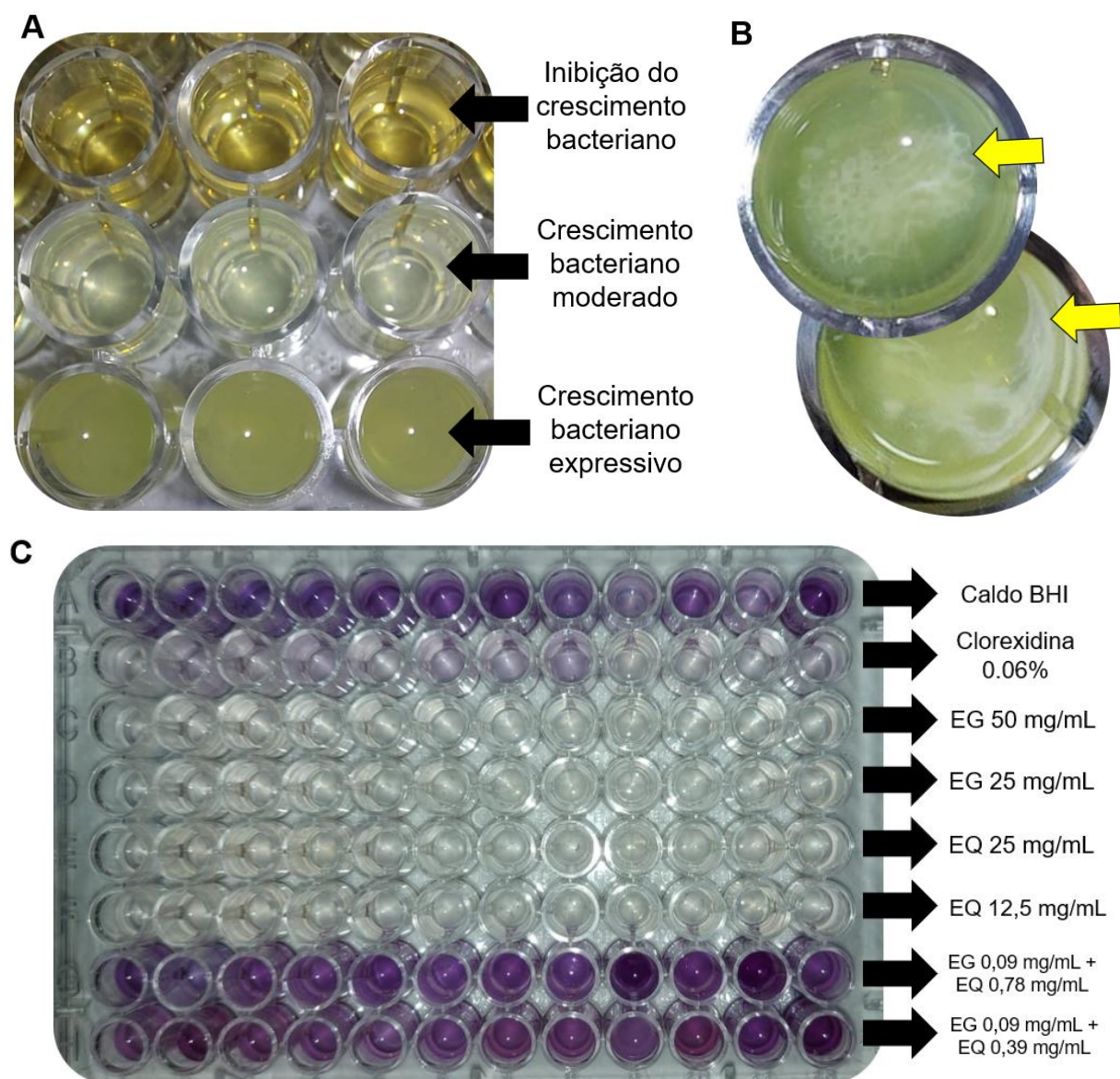
Figura 16 – Gráficos demonstrando a densidade óptica obtida em leitura de teste MTT após crescimento de biofilmes de *P. aeruginosa* (cepas P6 e P7) em contato com diferentes tratamentos



Legenda: Os dados não apresentaram distribuição normal e foram analisados pelo método *Kruskal-Wallis* complementado com Teste de Comparação Múltipla de *Dunn*; $p < 0.0001$. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. EG: extrato de gengibre. EQ: extrato de quilaia. D.O.: densidade óptica.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 – Demonstração em destaque de microplacas após maturação do biofilme de *P. aeruginosa* em contato com os tratamentos e do teste de MTT



Legenda: A: Poços demonstrando visualização da ausência ou presença de crescimento bacteriano após 48 horas de desenvolvimento do biofilme em contato com tratamentos. A turvação indica a presença da bactéria. B: Visualização em destaque de crescimento bacteriano expressivo em que é possível observar a olho nu a presença de biofilme (estruturas indicadas por setas amarelas). C: Visualização do resultado obtido após desenvolvimento de teste MTT em que a coloração indica a viabilidade das células bacterianas.

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Inicialmente é importante destacar que não foram encontradas pesquisas similares ao presente estudo quanto à aplicação de extratos de quilaia, no entanto, já é relatado na literatura que diversos fitoterápicos produzidos a partir de diferentes espécies de plantas apresentam ação contra microrganismos. Steglińska et al. (2022) demonstraram ação antimicrobiana de diversos extratos aquoso-glicólicos (como milefólio comum, hortelã-pimenta, sálvia, cavalinha, urtiga, dente-de-leão, alecrim, lúpulo, cominho, tomilho, lavanda, rábano, cebola, açafrão, capim, dentre outros), apresentando ação de destaque para o alho e o cravo que demonstraram efeito contra as bactérias *Streptomyces scabiei* DSM 40,778 e *Pectobacterium carotovorum* PCM 2056 e contra os fungos *Alternaria tenuissima* DSM 63,360, *Phoma exigua* DSM 62040, *Colletotrichum coccodes* DSM 62126, *Rhizoctonia solani* DSM 22843, *Alternaria alternata* LOCK, *Alternaria solani* Z184 e *Fusarium oxysporum* Z154.

Estudos anteriores também já indicaram que diversos fitoterápicos podem atuar contra cepas de *P. aeruginosa*. Em 2020, Cosa et al. demonstraram que extratos de *Calpurnia aurea* extraídos com acetona, etanol e acetato de etila apresentaram valores de CIM de 1,56; 1,56 e 6,25 mg/mL, respectivamente, contra *P. aeruginosa* ATCC 9721, enquanto os valores de CIM para extratos de cordão-de-frade (*Leonotis ocymifolia*) e moringa (*Moringa oleífera*) (com os mesmos solventes) foram de 6,25 mg/mL. Em teste com cepa padrão, a presente pesquisa apresentou valores de CIM para ambos os extratos glicólicos utilizados de 3,12 mg/mL, valor intermediário entre os obtidos por Cosa et al., no entanto, é importante destacar que esses extratos glicólicos de quilaia e gengibre também foram capazes de inibir cepas resistentes a antibióticos com os mesmos valores encontrados por Cosa et al. (2020) (1,56; 3,12 e 6,25 mg/mL), porém, utilizando um solvente sem citotoxicidade significativa (Pereira et al., 2005; Gentil et al., 2006).

Mombeshora et al. (2019) utilizaram cepa ATCC 27853 de *P. aeruginosa* e cepa isolada de infecção do trato urinário do (Harare, Zimbabwe) para testar a ação de diferentes extratos de folha de *Triumfetta welwitschii* Mast. na concentração de 100 µg/mL. Por meio de microdiluição em caldo e teste de MTT com a forma planctônica da bactéria foi demonstrado que, contra a cepa ATCC, o extrato de

acetona apresentou inibição igual a 96%, o etanólico igual a 81%, o diclorometano/metanólico igual a 99%, o metanólico com redução de aproximadamente 70% e o de acetato de etila e diclorometano de aproximadamente 60%, enquanto o extrato aquoso apresentou inibição de menos de 20% em comparação ao controle. Já contra o isolado clínico o extrato acetato de etila e diclorometano apresentaram menos de 10% de redução, o diclorometano/metanólico de aproximadamente 35%, e os extratos com maior desempenho, de acetona e etanólico, com aproximadamente 80% de redução, enquanto o extrato aquoso praticamente não produziu redução. Na pesquisa de Mombeshora et al. é interessante destacar que os extratos com diferentes solventes promoveram diferentes ações contra a forma planctônica de *P. aeruginosa*, e, embora tenham sido utilizadas concentrações baixas dos extratos, não houve total eliminação da bactéria, enquanto, no presente estudo, foi alcançada ação microbicida dos extratos glicólicos de quilaia e gengibre com concentrações de 1,56; 3,12 e 6,25 mg/mL contra cepa padrão e contra as cepas clínicas sendo os menores valores efetivos encontrados contra as cepas classificadas como multirresistentes.

Quanto à ação de fitoterápicos sobre biofilmes monotípicos, pode-se citar o estudo de Banerjee et al. (2017) que utilizou isolados clínicos de *P. aeruginosa* (produtora de MβL) e demonstrou que com dose de 1,25 mg/mL do extrato clorofórmico de *Andrographis paniculata* houve inibição da formação do biofilme em superfície abiótica em aproximadamente 75,2%, doses de 0,625 e 0,313 mg/mL reduziram a biomassa em aproximadamente 55,5% e 36,7% respectivamente, enquanto o extrato metanólico promoveu 51,9% de redução na formação do biofilme e o extrato aquoso reduziu em 24,1% nas mesmas dosagens. Alam et al. (2020) demonstraram que extrato metanólico de *Bergenia ciliata* (rizoma e pele) inibiu crescimento do biofilme da cepa PAO1 em 81% e extrato etanólico de *C. grata* (folhas) em 80%. Já Kamiya et al. (2019) testaram o efeito antibiofilme de trapoeraba-roxa (*Tradescantia pallida*) e observaram que com o extrato aquoso nas concentrações 0,27% e 0,135% o crescimento do biofilme reduziu em 55,8% e 62,2%, respectivamente, enquanto o extrato metanólico (0,25% e 0,125%) não inibiu o crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* (ATCC15692). O estudo de Cosa et al. (2020), mencionado anteriormente, também demonstrou inibição significativa do

biofilme de *P. aeruginosa* (ATCC 9721) ($\geq 60\%$) com 1 mg/mL de extrato etanólico e de acetato de etila de *C. aurea*.

A partir do descrito acima, observa-se que no estudo de Banerjee et al. (2017) o extrato aquoso, com menor potencial tóxico apresentou baixa inibição comparado a outros extratos utilizados pelos pesquisadores, assim como na pesquisa de Alam et al. (2020) em que extratos metanólico e etanólicos apresentaram resultados positivos, enquanto no estudo de Kamiya et al. (2019) o extrato aquoso promoveu mais redução do biofilme em comparação ao extrato metanólico que não apresentou ação efetiva. Embora não tenham sido citados extratos glicólicos para melhor comparação, extratos utilizados na presente pesquisa (quilaia e gengibre) promoveram reduções que variaram de 36,8 a 79,6% contra as cepas resistentes se aproximando da melhor ação observada nos estudos citados com diferentes tipos de fitoterápicos, sendo algumas reduções mais altas com solvente menos tóxico do que aqueles apresentados pelas diferentes pesquisas.

A ação antimicrobiana de produtos à base de gengibre foi demonstrada por Silva et al. (2018) que demonstraram CIM de 9,4 $\mu\text{L/mL}$ e CMM de 18,7 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial da espécie contra cepa ATCC 15443 de *P. aeruginosa*, além de demonstrar também ação contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (mesmos valores de CIM e CMM), *S. aureus* ATCC 25923 (CIM igual a 4,6 $\mu\text{L/mL}$ e CMM igual a 9,4 $\mu\text{L/mL}$); *Listeria monocytogenes* ATCC 766 e *E. coli* 0157:H7 NCTC 12900 (CIM igual a 2,3 $\mu\text{L/mL}$ e CMM igual a 4,7 $\mu\text{L/mL}$ para ambas as espécies). Sendo o óleo essencial outro tipo de fitoterápico é interessante observar ação do gengibre com concentrações tão reduzidas, no entanto, é importante ressaltar que o estudo utilizou apenas cepas padrão.

Quanto à ação de extratos de gengibre, Chakotiya et al. (2017) testaram extrato alcoólico-aquoso (70:30 de metanol para água) de rizoma da planta contra *P. aeruginosa* isolada de amostra clínica (New Delhi, Índia) e observaram CIM igual a 10 $\mu\text{g/mL}$, enquanto Sagar et al. (2020) demonstraram CIM de extrato metanólico de 15 a 30 mg/mL para cepas clínicas e aproximadamente 5 mg/mL para a cepa padrão (PA01). Embora Chakotiya et al. (2017) tenham observado CIM com baixa concentração, Sagar et al. (2020) apresentaram valores mais altos do que todos os valores de CIM e CMM encontrados na presente pesquisa com extrato glicólico da planta.

Em relação aos estudos com biofilmes são encontradas apenas pesquisas com extratos etanólicos. Abu El-Wafa et al. (2020) fizeram testes com cepa de *P. aeruginosa* resistente a mais de 90% dos antibióticos de referência (Cairo, Egito) e demonstraram que o extrato etanólico de gengibre apresentou redução de 71,56% na formação do biofilme com 6,25 mg/mL (sendo a CIM igual a 12,5 mg/ml). Já Miari et al. (2020) utilizaram isolado de *P. aeruginosa* de aspirado traqueal profundo (paciente com infecção nosocomial) e demonstraram inibição na formação de biofilme de 42,74% com extrato etanólico de gengibre (5%). Embora os extratos das pesquisas citadas tenham produzido valores de redução consideráveis com baixas concentrações, é importante ressaltar a utilização de um solvente citotóxico, diferentemente do propilenoglicol (solvente utilizado nos extratos glicólicos). Além do possível efeito contra células que não sejam o alvo da aplicação do fitoterápico (como de tecidos de um paciente), a utilização de extratos com solventes tóxicos pode promover uma potencial ação do solvente contra os microrganismos gerando resultados que não incluem apenas o efeito dos compostos ativos da planta de origem do fitoterápico, mas sim uma combinação de efeito do solvente e das frações extraídas. O propilenoglicol já foi investigado quanto à sua eficácia isolada contra microrganismos, em que demonstrou ausência de ação antimicrobiana, podendo ser utilizado até mesmo como grupo controle (Pereira et al., 2005; Gentil et al., 2006). Estudo de Meto et al. (2020), inclusive, demonstrou que o propilenoglicol por si só apresenta efeito irrelevante sobre biofilme de *P. aeruginosa* (cepa P1242 geneticamente modificada para produzir bioluminescência) comparado a um extrato glicólico de própolis utilizado pelos pesquisadores, o que demonstra que, com este tipo de solvente pode ser possível observar de forma mais clara a ação dos compostos ativos da planta utilizada e não uma interferência do solvente aplicado para a extração do fitoterápico.

Como demonstrado acima, muitas pesquisas desenvolvidas com fitoterápicos utilizam diferentes tipos de solventes em seus extratos, porém, alguns estudos de nosso grupo de pesquisa já demonstraram a ação de outros extratos glicólicos contra diversas espécies microbianas: Domingues et al. (2022) testaram extratos glicólicos de raiz de pfafia (*Pfaffia paniculata*); de folha de hamamelis (*Hamamelis virginiana*), de casca de árvore de barbatimão-verdadeiro (*Stryphnodendron barbatiman*) e de caule e folhas de gumar (*Gymnema sylvestre*) sobre biofilmes multiespécies de *Candida albicans* (ATCC 18804) combinada com uma das seguintes espécies

bacterianas: *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), *S. aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) ou *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Todos os extratos apresentaram ação significativa (especialmente em contato de 24 h), com destaque para *H. virginiana* (50 e 100 mg/mL) que eliminou praticamente todos os microrganismos do biofilme de *C. albicans* com *S. mutans*. Na associação com *P. aeruginosa* foram obtidos os melhores resultados em que o contato de 5 min com o extrato de *H. virginiana* (25, 50 e 100 mg/mL) eliminou completamente as colônias de *C. albicans*, além de o contato com todos os extratos utilizados (nas concentrações de 50 e 100 mg/mL) durante 24 h reduzir as colônias de *P. aeruginosa* de forma estatisticamente significativa.

Dos Santos Liberato et al. (2021) estudaram a ação do extrato glicólico de abacateiro (*Persea americana*) sobre *Acinetobacter baumannii* observando CIM de 3,12 mg/mL contra cepa ATCC 19606 e de 6,25 mg/mL contra quatro cepas clínicas (fornecidas pelo ValeClin Laboratório de Análises Clínicas de São José dos Campos, SP, Brasil). A CMM foi de 6,25 mg/mL para três cepas clínicas e para a cepa padrão, enquanto para uma das cepas clínicas foi igual a 12,5 mg/mL. Quanto aos testes em biofilmes monotípicos foi observada redução de viabilidade concentração dependente de aproximadamente 10 a 45% contra as cepas clínicas com as concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/mL (contato de 5 min).

Assim se observa que outros extratos glicólicos também apresentam potencial antimicrobiano contra cepas padrão e clínicas de diferentes patógenos, sendo observado que este solvente permite extração de compostos ativos contra os microrganismos investigados.

Com diversos efeitos benéficos para a saúde e muitas pesquisas a respeito de sua composição, já foram identificados mais de cem compostos no gengibre que são utilizados em diversos tipos de formulações farmacêuticas, sendo alguns exemplos de compostos biologicamente ativos o shogaol, paradol e zingerone e gingerol, sendo o 6-gingerol considerado o principal constituinte ativo do rizoma fresco com inúmeras atividades farmacológicas e fisiológicas importantes (efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos) já demonstradas (Jiang, 2019; Lima et al., 2018; Mao et al., 2019; Talebi et al., 2021; Wang et al., 2017).

Shukla et al. (2021a, 2021b) desenvolveram estudo com *P. aeruginosa* AM26 (GenBank accession no.: MN871520) e observaram que a concentração de 30 µg/mL

de gingerol não prejudicou o crescimento da espécie, mas suprimiu vias de *quórum sensing* testadas além de identificarem gingerol e curcumina como antagonistas de *quórum sensing* na mesma cepa demonstrando potencial para suprimir a produção de biofilme, exopolissacarídeos, piocianina e ramnolipídio, além de melhorar a suscetibilidade da bactéria a antibióticos (Shukla et al., 2021a; Shukla et al., 2021b). Os estudos de Shukla et al. (2021a, 2021b) concordam com a pesquisa desenvolvida em 2015 por Kim et al. que demonstraram que o 6-gingerol é um eficiente componente inibidor do *quórum sensing* de *P. aeruginosa* (PA14), além de observarem redução de biofilme de 19 a 53% em padrão concentração/dependente.

Já foi demonstrado também que o tratamento com composto análogo de 6-gingerol e trobamicina inibiu atividades associadas com a formação do biofilme de *P. aeruginosa* PA14, além de reduzir a infectividade da bactéria em modelo com larva de *Tenebrio molitor* (Ham et al., 2021). Além disso, Keyhani et al. (2021) demonstraram que associação de 6-gingerol e anfotericina B exerceu atividade anti-leishmania sinergicamente *in vitro* e *in vivo* além de potencializar a atividade leishmanicida de macrófagos.

A partir dos estudos citados se observa que o gingerol é um dos prováveis componentes ativos do gengibre, que poderia estar associado à eficaz ação antibacteriana e antibiofilme de fitoterápicos à base desta espécie.

Considerando a escassez de estudos a respeito da ação antimicrobiana da quilaia, foi investigado o efeito de suas saponinas, um grupo de substâncias considerado de grande relevância na composição deste fitoterápico. O estudo de Arabski et al. (2012) demonstrou que solução estoque de saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluída a 0.1–12 µg/mL não apresentou efeito antimicrobiano, mas promoveu crescimento de *E. coli* multidroga resistente (seis cepas isoladas de pacientes do Departamento de Microbiologia do Holy Cross Cancer Center em Kielce, Polônia) em padrão concentração dependente, além de aumentar o crescimento clínico de células de *E. coli* na presença de antibióticos. Já Khan et al. (2018) demonstraram ação antibacteriana de saponinas extraídas de extrato etanólico bruto da semente do chá verde contra *E. coli* (ATCC 25922), mas também contra cepas padrão de *S. aureus*, *S. typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella pullorum* e *Salmonella dublin*.

Tagousop et al. (2018) demonstraram que saponinas de *Melanthra elliptica* apresentam ação contra *E. coli* multidrogarresistente assim como contra *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Candida parapsilosis*, *C. albicans* e *C. neoformans*, sendo observada que a ação de duas saponinas contra *E. coli* multidrogarresistente e *S. flexneri* foi igual à observada com a vancomicina (antibiótico de referência). Além disso, é importante ressaltar que foi observada também ação sinérgica e aditiva entre combinações das saponinas estudadas pelos pesquisadores e antibióticos de referência (fluconazol para fungos e vancomicina para bactérias).

A partir das pesquisas discutidas é possível notar que ainda há poucos estudos que demonstrem a ação antibacteriana e antibiofilme de fitoterápicos à base de gengibre e uma escassez ainda maior de pesquisas com quilaia, especialmente se tratando de investigações com cepas clínicas de *P. aeruginosa* (ou outras cepas) resistentes e multirresistentes à antibióticos, de forma que este estudo apresenta informações inéditas e inovadoras sobre ação efetiva de fitoterápicos contra a forma planctônica e os biofilmes monotípicos desse patógeno que podem iniciar série de novos estudos que investiguem melhor o potencial destes e de outros fitoterápicos que apresentem ação para combater microrganismos de grande impacto na saúde mundial sem que prejudiquem a saúde de pacientes que façam o uso desses produtos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos glicólicos de gengibre e de quilaia apresentam ação antimicrobiana sobre a forma planctônica de cepas clínicas resistentes de *P. aeruginosa* de forma isolada com efeito inibitório nas concentrações de 3,12 e 6,25 mg/mL para o extrato de gengibre e de 1,56 e 3,12 mg/mL para o extrato de quilaia, além de ação microbicida com 6,25 mg/mL e 1,56 a 6,25 mg/mL para ambos os extratos, respectivamente. A ação combinada promoveu efeito sinérgico contra a cepa padrão e com cepas clínicas foi observado efeito aditivo, sendo uma das associações (3,12 mg/mL de extrato de gengibre com 0,78 mg/mL de extrato de quilaia) efetiva na inibição de três cepas e na ação microbicida contra quatro cepas.

Com relação à ação antibiofilme, os extratos de gengibre e quilaia isolados apresentaram importante ação preventiva na formação dos biofilmes de cepas clínicas de *P. aeruginosa* com valores de inibição de 43,4 a 73,6% para o extrato de gengibre (50 mg/mL) e de 36,8 a 79,6% para o extrato de quilaia (25 mg/mL), podendo ser considerados potenciais fitoterápicos com aplicações terapêuticas para o combate das infecções por *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

Abu El-Wafa WM, Ahmed RH, Ramadan MA. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol*. 2020 Sep;51(3):1079-92. doi: 10.1007/s42770-020-00284-3. Epub 2020 May 12. PMID: 32394240; PMCID: PMC7455646.

Ahmed N, Karobari MI, Yousaf A, Mohamed RN, Arshad S, Basheer SN, et al. The antimicrobial efficacy against selective oral microbes, antioxidant activity and preliminary Phytochemical Screening of *Zingiber officinale*. *Infect Drug Resist*. 2022;15:2773-85. doi: 10.2147/IDR.S364175. PMID: 35668854; PMCID: PMC9166953.

Al-Hilifi SA, Al-Ali RM, Petkoska AT. Ginger essential oil as an active addition to composite chitosan films: Development and Characterization. *Gels*. 2022;8(6):327. doi: 10.3390/gels8060327. PMID: 35735671; PMCID: PMC9222789.

Alam K, Farraj DA, Mah-E-Fatima S, Yameen MA, Elshikh MS, Alkufeidy RM, et al. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Infect Public Health*. 2020;13(11):1734-41. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.007. Epub 2020 Aug 2. PMID: 32753311.

Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(8):2003-20. doi:10.1093/jac/dky042

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

Arcusa R, Villaño D, Marhuenda J, Cano M, Cerdà B, Zafrilla P. Potential Role of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in the prevention of neurodegenerative diseases. *Front Nutr*. 2022;9:809621. doi: 10.3389/fnut.2022.809621. PMID: 35369082; PMCID: PMC8971783.

Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today*. 2019;24(1):350-9. doi: 10.1016/j.drudis.2018.07.003. PMID: 30036575.

Banerjee M, Moulick S, Bhattacharya KK, Parai D, Chattopadhyay S, Mukherjee SK. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of *Andrographis paniculata*. *Microb Pathog*. 2017;113:85-93. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.023. Epub 2017 Oct 14. PMID: 29042302.

Boozari M, Hosseinzadeh H. Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies. *Phytother Res*. 2021;35(2):864-76. doi: 10.1002/ptr.6873. PMID: 32985017.

Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640. doi: 10.1016/j.drup.2019.07.002. PMID: 31492517.

Cañon-Jones H, Cortes H, Castillo-Ruiz M, Schlotterbeck T, San Martín R. *Quillaja saponaria* (Molina) Extracts Inhibits In Vitro *Piscirickettsia salmonis* Infections. *Animals (Basel)*. 2020;10(12):2286. doi: 10.3390/ani10122286. PMID: 33287333; PMCID: PMC7761688.

Cantón R, Gijón D, Ruiz-Garbajosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr Opin Crit Care*. 2020 Oct;26(5):433-41. doi: 10.1097/MCC.0000000000000755. PMID: 32739970.

Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Lee KY. Antibacterial activity of Sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;17(5):858-64. PubMed PMID: 18051310.

Chakotiya AS, Tanwar A, Narula A, Sharma RK. Zingiber officinale: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. *Microb Pathog*. 2017 Jun;107:254-60. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.029. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28389345.

Chakraborty P. Herbal genomics as tools for dissecting new metabolic pathways of unexplored medicinal plants and drug discovery. *Biochimie Open*. 2018;6:9-16. doi:10.1016/j.biopen.2017.12.003.

Che CT, Zhang H. Plant natural products for human health. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):830. doi: 10.3390/ijms20040830. PMID: 30769917; PMCID: PMC6412953.

Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloy MG, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(5):698-722. doi: 10.1093/femsre/fux020. PMID: 28981745.

Chong WH, Saha BK, Ramani A, Chopra A. State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia. *Infection*. 2021;49(4):591-605. doi: 10.1007/s15010-021-01602-z. PMID: 33709380; PMCID: PMC7951131.

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [Internet]. Wayne; 2012 [cited 2018 Feb 17]. Available from: <https://clsi.org/>

Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem resistance: a review. *Med Sci (Basel)*. 2017;6(1):1. doi: 10.3390/medsci6010001. PMID: 29267233; PMCID: PMC5872158.

Colque CA, Albarracín Orio AG, Feliziani S, Marvig RL, Tobares AR, Johansen HK, et al. Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* exploits multiple genetic pathways to develop multidrug resistance during long-term infections in the airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(5):e02142-19. doi:10.1128/AAC.02142-19.

Colalto C. What phytotherapy needs: evidence-based guidelines for better clinical practice. *Phytother Res*. 2018;32(3):413-25. doi: 10.1002/ptr.5977. PMID: 29193357.

Cosa S, Rakoma JR, Yusuf AA, Tshikalange TE. *Calpurnia aurea* (Aiton) Benth extracts reduce quorum sensing controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 2020;25(10):2283. doi: 10.3390/molecules25102283. PMID: 32413961; PMCID: PMC7287703.

Costa JS, Lima CA, Vera-Leiva A, San Martín Magdalena I, Bello-Toledo H, Domínguez Yévenes M, et al. [Carbapenemases produced by Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Chile]. *Rev Chilena Infectol*. 2021 Feb;38(1):81-7. Spanish. doi: 10.4067/S0716-10182021000100081. PMID: 33844796.

Costa RL, Lamas CD, Simvoulidis LF, Espanha CA, Moreira LP, Bonancim RA, et al. Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2022 Feb 2;64:e6. doi: 10.1590/S1678-9946202264006. PMID: 35137900; PMCID: PMC8815857.

de Lima RM, Dos Reis AC, de Menezes AP, Santos JV, Filho JW, Ferreira JR, et al. Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018;32(10):1885-907. doi: 10.1002/ptr.6134. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30009484.

de Oliveira JR, Vilela PG, Almeida RB, de Oliveira FE, Carvalho CA, Camargo SE, et al. Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. *Gen Dent*. 2019;67(1):22-6. PMID: 30644826.

Dev Kumar G, Mis Solval K, Mishra A, Macarisin D. Antimicrobial Efficacy of pelargonic acid micelles against *Salmonella* varies by surfactant, serotype and stress response. *Sci Rep*. 2020;10(1):10287. doi: 10.1038/s41598-020-67223-y. PMID: 32581319; PMCID: PMC7314784.

Domingues N, Ramos LP, Pereira LM, do Rosário Estevam Dos Santos PB, Scorzoni L, Pereira TC, et al. Antimicrobial action of four herbal plants over mixed-species biofilms of *Candida albicans* with four different microorganisms. *Aust Endod J*. 2022. doi: 10.1111/aej.12681. Epub ahead of print. PMID: 36057926.

Dos Santos Liberato SF, da Cruz Vegian MR, Abu Hasna A, de Alvarenga JA, Dos Santos JG, Tini ÍRP, et al. Antibiofilm action of *Persea americana* glycolic extract over *Acinetobacter baumannii* and absence of toxicity in *Galleria mellonella*. J Complement Integr Med. 2021. doi: 10.1515/jcim-2021-0051. Epub ahead of print. PMID: 34265885.

El-Far A, Samir S, El-Gebaly E, Omar M, Dahroug H, El-Shenawy A, et al. High Rates of aminoglycoside methyltransferases associated with metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Tertiary Care Hospital in Egypt. Infect Drug Resist. 2021;14:4849-58. doi: 10.2147/IDR.S335582. PMID: 34848977; PMCID: PMC8613939.

El-Shouny WA, Ali SS, Sun J, Samy SM, Ali A. Drug resistance profile and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ES β L)-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. Essential oils and their potential for utilization. Microb Pathog. 2018 Mar;116:301-12. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.005. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29407236.

Enioutina EY, Teng L, Fateeva TV, Brown JC, Job KM, Bortnikova VV, et al. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. Expert Rev Clin Pharmacol. 2017;10(11):1203-14. doi: 10.1080/17512433.2017.1371591. PMID: 28836870.

Espinoza Pesantez DI, Esparza Sanchez GF. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio [Enzymatic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, clinical and laboratory aspects]. Rev Chilena Infectol. 2021;38(1):69-80. Spanish. doi: 10.4067/S0716-10182021000100069. PMID: 33844795.

Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy: an introduction to herbal medicine. Prim Care. 2017;44(2):217-7. doi: 10.1016/j.pop.2017.02.001. PMID: 28501226.

Fleck JD, Betti AH, da Silva FP, Troian EA, Olivaro C, Ferreira F, et al. Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: particular chemical characteristics and biological activities. Molecules. 2019;24(1):171. doi: 10.3390/molecules24010171. PMID: 30621160; PMCID: PMC6337100.

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.

García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Expert Rev Anti Infect Ther. 2021;19(2):197-213. doi: 10.1080/14787210.2020.1813023. PMID: 32813566.

Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, Garcia-Pouton N, Chumbita M, et al. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. Clin Microbiol Infect. 2021;27(1):83-8. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.041

Gentil M, Pereira JV, Sousa YTCS, Pietro R, Neto MDS, Vansan LP, et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. Phytotherapy Research. 2006; 20(3):184-6. doi: 10.1002/ptr.1829.

Giacobbe DR, Battaglini D, Ball L, Brunetti I, Bruzzzone B, Codda G, et al. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19. Eur J Clin Invest. 2020;50(10):e13319. doi: 10.1111/eci.13319. PMID: 32535894; PMCID: PMC7323143.

Ham SY, Kim HS, Jo MJ, Lee JH, Byun Y, Ko GJ, Park HD. Combined Treatment of 6-Gingerol Analog and Tobramycin for Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Microbiol Spectr. 2021 Oct 31;9(2):e0019221. doi: 10.1128/Spectrum.00192-21. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34704784; PMCID: PMC8549756.

Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Chemother. 2015;47(2):81-97. doi: 10.3947/ic.2015.47.2.81. PMID: 26157586; PMCID: PMC4495280.

Hosu MC, Vasaikar SD, Okuthe GE, Apalata T. Detection of extended spectrum beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in rural Eastern Cape Province, South Africa. Sci Rep. 2021;11(1):7110. doi: 10.1038/s41598-021-86570-y. PMID: 33782509; PMCID: PMC8007629.

Jiang TA. Health benefits of culinary herbs and spices. J AOAC Int. 2019;102(2):395-411. doi: 10.5740/jaoacint.18-0418. PMID: 30651162.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. Int J Mol Sci. 2021;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128. PMID: 33803907; PMCID: PMC8003266.

Kamiya M, Mori T, Nomura M, Inagaki T, Nonogaki T, Nagatsu A, et al. Tradescantia pallida extract inhibits biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Nagoya J Med Sci. 2019;81(3):439-52. doi: 10.18999/nagjms.81.3.439. PMID: 31579334; PMCID: PMC6728195.

Keyhani A, Sharifi I, Salarkia E, Khosravi A, Tavakoli Oliaee R, Babaei Z, et al. *In vitro* and *in vivo* therapeutic potentials of 6-gingerol in combination with amphotericin B for treatment of Leishmania major infection: Powerful synergistic and multifunctional effects. Int Immunopharmacol. 2021;101(Pt B):108274. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108274. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34688150.

Khan MI, Ahhmed A, Shin JH, Baek JS, Kim MY, Kim JD. green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of gram positive and gram negative bacteria, a comprehensive study *in vitro* and *in vivo*. Evid Based Complement Alternat Med. 2018;2018:3486106. doi: 10.1155/2018/3486106. PMID: 30598684; PMCID: PMC6287149.

Kim HS, Lee SH, Byun Y, Park HD. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. Sci Rep. 2015;5:8656. doi: 10.1038/srep08656. PMID: 25728862; PMCID: PMC4345325.

Kim SW. Phytotherapy: emerging therapeutic option in urologic disease. Transl Androl Urol. 2012;1(3):181-91. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2012.05.10.

Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL. The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for current resistance-breaking therapies. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:665759. doi:10.3389/fcimb.2021.665759

Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. J Infect. 2020;81(2):266-75. doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.046. PMID: 32473235; PMCID: PMC7255350.

Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. J Microbiol Biotechnol. 2017;27(6):1053-64. doi: 10.4014/jmb.1611.11056. PMID: 28301918.

Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2002;49(2):345-51. PubMed PMID: 11815578.

Liu Y, Liu J, Zhang Y. Research progress on chemical constituents of *Zingiber officinale* roscoe. Biomed Res Int. 2019;2019:5370823. doi:10.1155/2019/5370823

Lupo A, Haenni M, Madec JY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. Microbiol Spectr. 2018;6(3). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017. PMID: 30101740.

Magedans YV, Yendo AC, Costa F, Gosmann G, Fett-Neto AG. Foamy matters: an update on *Quillaja* saponins and their use as immunoadjuvants. Future Med Chem. 2019;11(12):1485-99. doi: 10.4155/fmc-2018-0438. PMID: 31304830.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21793988.

Makky EA, AlMatar M, Mahmood MH, Wen KX, Qi TBG. In vitro Antioxidant and antimicrobial studies of ethanolic plant extracts of *P. granatum*, *O. stamineus*, *A. bilimbi*, *M. nigra*, and *E. longifolia*. Curr Pharm Biotechnol. 2022;23(10):1284-312. doi: 10.2174/1389201022666210615113854. PMID: 34132178.

Mao QQ, Xu XY, Cao SY, Gan RY, Corke H, Beta T, Li HB. Bioactive compounds and bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Foods. 2019 May 30;8(6):185. doi: 10.3390/foods8060185. PMID: 31151279; PMCID: PMC6616534.

Mehla J, Malloci G, Mansbach R, López CA, Tsivkovski R, Haynes Ket al. Predictive rules of efflux inhibition and avoidance in *Pseudomonas aeruginosa*. mBio. 2021;12(1):e02785-20. doi: 10.1128/mBio.02785-20. PMID: 33468691; PMCID: PMC7845643.

Meto A, Colombari B, Meto A, Boaretto G, Pinetti D, Marchetti L, et al. Propolis Affects *Pseudomonas aeruginosa* growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: potential involvement of polyphenols. Microorganisms. 2020;8(2):243. doi: 10.3390/microorganisms8020243. PMID: 32059431; PMCID: PMC7074903.

Miari M, Rasheed SS, Haidar Ahmad N, Itani D, Abou Fayad A, Matar GM. Natural products and polysorbates: Potential Inhibitors of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dev Ctries. 2020;14(6):580-8. doi: 10.3855/jidc.11834. PMID: 32683348.

Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. World J Microbiol Biotechnol. 2019;35(11):178. doi:10.1007/s11274-019-2739-1

Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, Soltani A, Aljanabi HA, Jeda AS, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. IUBMB Life. 2020 Oct;72(10):2097-111. doi: 10.1002/iub.2356. PMID: 32770825; PMCID: PMC7436231.

Mombeshora M, Mukanganyama S. Antibacterial activities, proposed mode of action and cytotoxicity of leaf extracts from *Triumfetta welwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):315. doi: 10.1186/s12906-019-2713-3. PMID: 31744500; PMCID: PMC6862819.

Namivandi-Zangeneh R, Sadrearhami Z, Dutta D, Willcox M, Wong EH, Boyer C. Synergy between synthetic antimicrobial polymer and antibiotics: A promising platform to combat multidrug-resistant bacteria. ACS Infect Dis. [Internet]. 2019. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00049. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30939869. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.9b00049>

Nasser M, Gayen S, Kharat AS. Prevalence of β -lactamase and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Arab region. J Glob Antimicrob Resist. 2020;22:152-60. doi: 10.1016/j.jgar.2020.01.011. PMID: 32057979.

Nunes R, Pasko P, Tyszka-Czochara M, Szewczyk A, Szlosarczyk M, Carvalho IS. Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. *Pharm Biol.* 2017c;55(1):114-23. doi: 10.1080/13880209.2016.1230636. PMID: 27925492.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* [Internet]. 2003 Jul [cited 2019 Jun 17];52(1):1. Epub 2003 Jun 12. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/52/1/1/930000>

Oliveira J, Reygaert WC. Gram Negative Bacteria. 2022. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 30855801.

Oliveira JR, de Jesus Viegas D, Martins AP, Carvalho CA, Soares CP, Camargo SE, et al. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Arch Oral Biol.* 2017;82:271-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.031. PMID: 28683409.

Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):140-3. PubMed PMID: 15634962; PubMed Central PMCID: PMC540140.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49. PMID: 11018124.

Our World in Data [Internet] Our World in [cited 2022 Jul 24]. Available from: <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer>

Ozkur M, Benlier N, Takan I, Vasileiou C, Georgakilas AG, Pavlopoulou A, et al. Ginger for healthy ageing: a systematic review on current evidence of its antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:4748447. doi: 10.1155/2022/4748447. PMID: 35585878; PMCID: PMC9110206.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177-92. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013. PMID: 30500353.

Pereira JV, Bergamo DCB, Pereira JO, França SC, Pietro RCLR e Silva-Sousa YTC. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz Dent J.* 2005; 16(3): 192-6.

Reynolds D, Kollef M. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs.* 2021;81(18):2117-31. doi: 10.1007/s40265-021-01635-6. PMID: 34743315; PMCID: PMC8572145.

Sagar PK, Sharma P, Singh R. Antibacterial efficacy of different combinations of clove, eucalyptus, ginger, and selected antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Ayu*. 2020;41(2):123-9. doi: 10.4103/ayu.AYU_101_19. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34908797; PMCID: PMC8614201.

Santana CB, Souza JG, Toledo AG, Alves LF, Alves DS, Corrêa JM, et al. Antimicrobial and insecticidal effects of essential oil and plant extracts of *Myrcia oblongata* DC in pathogenic bacteria and *Alphitobius diaperinus*. *Braz J Biol*. 2021;82:e233425. doi: 10.1590/1519-6984.233425. PMID: 34105655.

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

Sen T, Samanta SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015;147:59-110. doi: 10.1007/10_2014_273. PMID: 25001990.

Shukla A, Parmar P, Patel B, Goswami D, Saraf M. Breaking bad: Better call gingerol for improving antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting multiple quorum sensing pathways. *Microbiol Res*. 2021;252:126863. doi: 10.1016/j.micres.2021.126863. PMID: 34530246.

Shukla A, Shukla G, Parmar P, Patel B, Goswami D, Saraf M. Exemplifying the next generation of antibiotic susceptibility intensifiers of phytochemicals by LasR-mediated quorum sensing inhibition. *Sci Rep*. 2021 Nov 17;11(1):22421. doi: 10.1038/s41598-021-01845-8. PMID: 34789810; PMCID: PMC8599845.

Silva FT, Cunha KF, Fonseca LM, Antunes MD, Halal SL, Fiorentini ÂM, et al. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. *Int J Biol Macromol*. 2018;118(Pt A):107-15. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.079. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29928909.

Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(4):413-32. doi: 10.1007/s12223-018-0585-4. PMID: 29352409.

Steglińska A, Bekhter A, Wawrzyniak P, Kunicka-Styczyńska A, Jastrzębek K, Fidler M, et al. Antimicrobial activities of plant extracts against *Solanum tuberosum* L. phytopathogens. *Molecules*. 2022 Feb 27;27(5):1579. doi: 10.3390/molecules27051579. PMID: 35268680; PMCID: PMC8911893.

Tagousop CN, Tamokou JD, Kengne IC, Ngnokam D, Voutquenne-Nazabadioko L. Antimicrobial activities of saponins from *Melanthra elliptica* and their synergistic effects with antibiotics against pathogenic phenotypes. *Chem Cent J*. 2018;12(1):97. doi: 10.1186/s13065-018-0466-6. PMID: 30238231; PMCID: PMC6768134.

Talebi M, İlğün S, Ebrahimi V, Talebi M, Farkhondeh T, Ebrahimi H, et al. *Zingiber officinale* ameliorates Alzheimer's disease and Cognitive Impairments: Lessons from preclinical studies. *Biomed Pharmacother.* 2021;133:111088. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111088. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33378982.

Tarfaoui K, Brhadda N, Ziri R, Oubihi A, Imtara H, Haida S, et al. Chemical profile, antibacterial and antioxidant potential of *Zingiber officinale* Roscoe and *Elettaria cardamomum* (L.) maton essential oils and extracts. *Plants (Basel).* 2022;11(11):1487. doi: 10.3390/plants11111487. PMID: 35684260; PMCID: PMC9182767.

Thi MT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8671. doi: 10.3390/ijms21228671. PMID: 33212950; PMCID: PMC7698413.

Tippel J, Gies K, Harbaum-Piayda B, Steffen-Heins A, Drusch S. Composition of Quillaja saponin extract affects lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 2017;221:386-94. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.055. Epub 2016 Oct 13. PMID: 27979218.

Toledo AG, Souza JG, Santana CB, Mallmann AP, Dos Santos CV, Corrêa JM, et al. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical prospection of *Eugenia involucrata* DC. leaf extracts. *Braz J Biol.* 2021;83:e245753. doi: 10.1590/1519-6984.245753. PMID: 34190760.

Tolker-Nielsen T. Biofilm development. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):MB-0001-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014. PMID: 26104692.

Ugwuanyi FC, Ajayi A, Ojo DA, Adeleye AI, Smith SI. Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021;20(1):11. doi:10.1186/s12941-021-00417-y

Ušjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* 2019;131:186-96. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.015. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30980878.

Valková V, Ďúranová H, Ivanišová E, Galovičová L, Godočíková L, Borotová P, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of fruit extracts from different fresh chili peppers. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2021;20(4):465-72. doi: 10.17306/J.AFS.0977. PMID: 34724370.

Wang J, Ke W, Bao R, Hu X, Chen F. Beneficial effects of ginger *Zingiber officinale* Roscoe on obesity and metabolic syndrome: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1398(1):83-98. doi: 10.1111/nyas.13375. PMID: 28505392.

World Health Organization [Internet] Geneva: World Health Organization [cited 2022 Jul 25]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Yaqub A, Malkani N, Shabbir A, Ditta SA, Tanvir F, Ali S, et al. Novel biosynthesis of copper nanoparticles using *Zingiber* and *Allium* sp. with synergic effect of doxycycline for anticancer and bactericidal activity. *Curr Microbiol*. 2020;77(9):2287-99. doi: 10.1007/s00284-020-02058-4. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32535649.

Yeung KS, Hernandez M, Mao JJ, Haviland I, Gubili J. Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. *Phytother Res*. 2018;32(5):865-91. doi: 10.1002/ptr.6033. PMID: 29464801; PMCID: PMC5938102.

Zhang Y, Pan X, Wang L, Chen L. Iron metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the involved iron-targeted anti-biofilm strategies. *J Drug Target*. 2021;29(3):249-58. doi: 10.1080/1061186X.2020.1824235. Epub 2020 Oct 7. PMID: 32969723.